

# Očuvanje točnosti biosinteze proteina: uloga popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA

---

Sumić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:795970>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-08-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**OČUVANJE TOČNOSTI BIOSINTEZE PROTEINA: ULOGA  
POPRAVKA PRIJE PRIJENOSA AMINOKISELINE NA tRNA**

**MAINTAINING FIDELITY OF PROTEIN BIOSYNTHESIS:  
THE ROLE OF PRETRANSFER EDITING**

**SEMINARSKI RAD**

Sara Sumić  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj

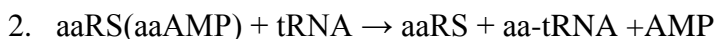
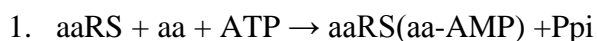
Zagreb, 2009.

## Sadržaj:

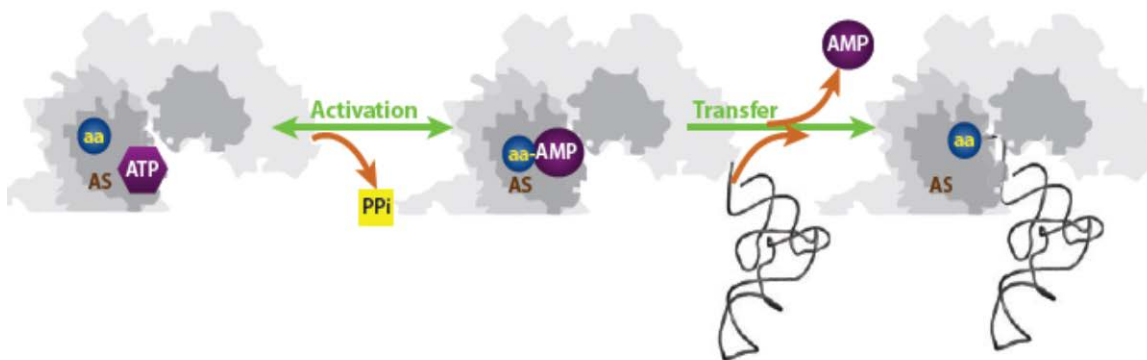
1. UVOD.....	2
2. PUTEVI POPRAVKA.....	3
2.1. Otkriće popravka.....	3
2.2. Domena za popravak.....	5
3. PUT POPRAVKA PRIJE PRIJENOSA AMINOKISELINE NA tRNA.....	6
3.1. Translokacijski model.....	6
3.2. Ostali načini popravka.....	8
4. MEĐUSOBNI ODNOS DVAJU PUTEVA POPRAVKA.....	9
5. LITERATURA.....	10
6. SAŽETAK.....	12
7. SUMMARY.....	13

# 1. UVOD

Informacija sadržana u genima koji kodiraju za proteine mora se dosljedno prevesti u pripadajući slijed aminokiselina. Točnost prevođenja od iznimne je važnosti za stanicu, jer pravilan slijed aminokiselina u proteinu omogućuje njegovu funkciju. (Döring i sur. 2001, Lee i sur. 2006). Interakcija kodona mRNA i antikodona tRNA omogućuje povezivanje odgovarajuće aminokiseline u rastući polipeptidni lanac na ribosomu. Stoga, svaki od izoakceptora tRNA treba prethodno vezati pripadnu aminokiselinu. Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) kataliziraju esterifikaciju tRNA pripadnom aminokiselinom (aa) u dva koraka (Schimmel, 1987):



U prvom koraku, nazvanom aktivacija aminokiseline, aaRS aktivira aminokiselinu pomoću ATP-a, te nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP), a otpušta se pirofosfat (PP<sub>i</sub>). U drugom koraku, aminokiselina se, aktivirana u obliku aa-AMP-a, prenosi na 3' kraj tRNA, čime nastaje aminoacilirana tRNA (aa-tRNA<sup>aa</sup>), a otpušta se AMP (Slika 1.).



**Slika 1.** Reakcija aminoacilacije tRNA. Prvo se aktivira aminokiselina (aa) pomoću ATP-a, te nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP), a otpušta se pirofosfat (PP<sub>i</sub>). Potom se aminokiselina, aktivirana u obliku aa-AMP-a, prenosi na 3' kraj tRNA, te nastaje aminoacil-tRNA<sup>aa</sup> (aa-tRNA<sup>aa</sup>), a otpušta se AMP. (preuzeto iz: Ling i sur. 2009)

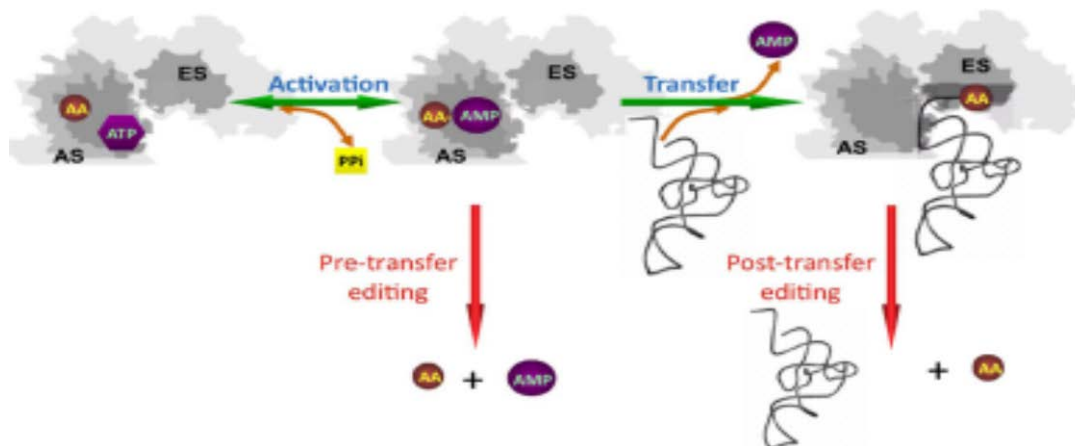
Da bi se očuvala točnost biosinteze proteina, svaka aaRS mora odabrati isključivo svoju pripadnu aminokiselinu i tRNA, te ih povezati kovalentnom vezom (Pauling, 1958). Aminoacil-tRNA-sintetaze s visokim stupnjem točnosti prepoznaju pripadnu tRNA zbog njene velike površine, s kojom dolaze u kontakt, te mnogih elemenata identiteta tRNA (Giegé i sur. 1998). Međutim, neke alifatske aminokiseline su vrlo slične. Stoga, neke aaRS imaju poteškoća u razlikovanju pripadne aminokiseline od njoj strukturno sličnih isključivo na temelju specifičnosti njihova vezanja u aktivno mjesto (Hendrickson i sur. 2004), budući da im se vezne energije vrlo malo razlikuju (Pauling, 1958). Povezivanje nepripadne aminokiseline i tRNA kompromitira točnost biosinteze proteina, te su određene aminoacil-tRNA-sintetaze razvile puteve popravka kojima se sprječava sinteza neodgovarajućeg aa:tRNA para. Popravak pogreške se može odvijati prije prijenosa aminokiseline na tRNA (hidroliza aa-AMP-a), ili nakon prijenosa aminokiseline na tRNA (hidroliza aa-tRNA<sup>aa</sup>) (Slika.2) (revijalno prikazano u: Ling i sur. 2009). Iako su mnogi mehanistički detalji popravka pogreške i dalje nepoznati, te su predmet tekućih istraživanja, tema ovog rada je prikazati međusobni odnos dvaju puteva popravka, te zbog čega je vrlo teško razlučiti koji od njih doista ima važnost kod pojedine aaRS.

## 2. PUTEVI POPRAVKA

### 2.1. Otkriće popravka

Linus Pauling je prilično rano predvidio poteškoće aminoacil-tRNA-sintetaza u razlikovanju strukturno sličnih aminokiselina (Pauling, 1958). Primjerice, izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) mora razlikovati pripadnu aminokiselinu izoleucin (Ile) od nepripadnog valina (Val), iako se razlikuju u samo jednoj metilnoj skupini. U aktivno mjesto se lako može vezati sterički manji valin, te ga IleRS aktivira samo ~180 puta manje učinkovito od izoleucina (Schmidt i Schimmel, 1994). Unatoč tome, samo se Ile-tRNA<sup>Ile</sup> sintetizira u značajnim količinama, ali ne i Val-tRNA<sup>Ile</sup>, što upućuje na postojanje popravka pogreške. Baldwin i Berg su 1966.g potvrdili da se IleRS ponaša kao ATP-aza u prisutnosti tRNA<sup>Ile</sup>, valina i ATP-a. To znači da IleRS aktivacijom nepripadnog valina troši puno više ATP-a, jer time nastaju nestabilni međuprodukti Val-AMP i/ili Val-tRNA<sup>Ile</sup>, koji su vrlo podložni hidrolizi putem popravka pogreške. Produkti

hidrolize su tRNA<sup>Ile</sup>, valin, AMP i PP<sub>i</sub>. Valin, u prisutnosti tRNA<sup>Ile</sup>, može tada opet ući u reakciju aktivacije uz pomoć novog ATP-a, koji se takvom cikličkom reakcijom intenzivno troši. Produkti tRNA-ovisne hidrolize Val-AMP-a i Val-tRNA<sup>Ile</sup> su isti, pa se na temelju njih ne može odrediti u kojem koraku dolazi do popravka pogreške. Dakle, postavlja se pitanje da li do hidrolize dolazi nakon prijenosa valina na tRNA<sup>Ile</sup>, ili se hidrolizira međuprodukt Val-AMP. To ne možemo zaključiti na temelju ATP-azne aktivnosti IleRS, budući da se hidroliza ATP-a prilikom aktivacije aminokiseline odvija neovisno o tome kojim od dva puta popravka će se odvijati nastala pogreška. Metodama brze kinetike nije bilo moguće detektirati nastajanje i nestajanje Val-tRNA<sup>Ile</sup>, što upućuje na to da se popravak pogreške ne odvija hidrolizom esterske veze Val-tRNA<sup>Ile</sup>, već hidrolizom Val-AMP-a. Predloženo je stoga da je put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA dominantan u IleRS sustavu (Fersht, 1977). Nadalje, DNA aptamer koji ne može biti aminoaciliran potiče hidrolizu Val-AMP kod IleRS, čime je također pokazano postojanje puta popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA (Hale i Schimmel, 1996). Iako se nije moglo dokazati da IleRS katalizira nastanak Val-tRNA<sup>Ile</sup>, enzim je u stanju hidrolizirati egzogenu Val-tRNA<sup>Ile</sup>, čime je moguće ispraviti pogreške nastale nakon aminoacilacije tRNA (Eldred i Schimmel, 1972). Putem popravka koji se odvija nakon prijenosa nepripadne aminokiseline na 3' kraj tRNA, hidrolizira se esterska veza između nepripadne aminokiseline i tRNA (Slika 2).



**Slika 2.** Putevi popravka prije (pretransfer editing) i poslije (posttransfer editing) prijenosa aminokiseline na tRNA. Aminokiselina(AA) se aktivira pomoću ATP-a u aktivnom mjestu, i nastaje aminoacil-adenilat (AA-AMP). Putem popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA (pretransfer editing) hidrolizira se nepripadni AA-AMP, sprječavajući tako nastanak nepripadne aminoacil-tRNA. U putu popravka poslije

prijenosa aminokiseline na tRNA (post-transfer editing), 3' kraj tRNA (prethodno esterificiran aminokiselinom) se translocira u domenu za popravak, gdje esterska veza biva hidrolizirana. AS, aktivno mjesto; ES, domena za popravak (editing site); PP<sub>i</sub>, pirofosfat (preuzeto iz: Yadavalli i sur. 2008).

Oba puta popravka osiguravaju točnost translacije. Pojedine sintetaze mogu posjedovati jedan ili oba, ili ih uopće nemaju u slučaju kada je dostatna specifičnost aktivnog mjesta u prepoznavanju i aktivaciji pripadne aminokiseline.

## 2.2. Domena za popravak

Kada je uočeno da neke aminoacil-tRNA-sintetaze obavljaju dvije funkcije (aminoacilacija tRNA i popravak pogreške), predložena su i dva zasebna mjesta unutar enzima koji bi obavljali pojedinu funkciju. Prema modelu “dvostrukog sita”, u aktivnom mjestu se odvija aktivacija aminokiseline (nastanak aa-AMP-a), zatim prijenos aminokiseline na tRNA (aminoacilacija tRNA, tj. nastanak aa-tRNA<sup>aa</sup>), dok se u domeni za popravak odvija hidroliza nepripadnih aa-AMP-a i/ili aa-tRNA<sup>aa</sup> (Fersht, 1977). Stoga, oba puta popravka mogu uključivati translokaciju supstrata (aa-AMP-a, odnosno aa-tRNA<sup>aa</sup>) iz aktivnog mjesta u domenu za popravak, gdje se odvija njegova hidroliza (Nomanbhoy, 1999).

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I, IleRS, ValRS, te LeuRS, dijele homolognu domenu za popravak. Identificirana je pomoću riješenih kristalnih struktura IleRS iz vrste *Thermus thermophilus*, u kompleksu s Val-AMS-om, analogom Val-AMP-a. Radi se o CP1 domeni (eng. *connective polypeptide 1*), globularnoj inserciji umetnutoj između 3. i 4. β-ploče Rossmanove strukture. Njena udaljenost od aktivnog mjesta je približno 35 Å (Fukai i sur. 2000). Samo se analozi nepripadnog Val-AMP-a i Val-tRNA<sup>Ile</sup> vežu unutar CP1 domene, no ne i pripadni Ile-AMP ili Ile-tRNA<sup>Ile</sup>, što potvrđuje ulogu domene za popravak. CP1 domena može spriječiti vezanje sterički većeg izoleucina (Schmidt i Schimmel, 1995). S druge strane, aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II imaju različite strukture domene za popravak. Otkriće hidrolize aa-AMP-a kod aaRS koje nemaju zasebne domene za popravak, kao što su SerRS i MetRS, upućuje na to da se hidroliza tog međuprodukta može odvijati i u aktivnom mjestu (Gruić-Sovulj, 2007, Jakubowski i Fersht, 1981).

### 3. PUT POPRAVKA PRIJE PRIJENOSA AMINOKISELINE NA tRNA

Put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA odnosi se na hidrolizu nepripadnog aa-AMP-a. Supstrat za hidrolizu je miješani anhidrid, a hidroliza može biti ovisna ili neovisna o tRNA (Hendrickson, 2002). Produkti hidrolize aa-AMP-a su aminokiselina, AMP, i pirofosfat (PP<sub>i</sub>). Način popravka može biti translokacija aa-AMP-a u domenu za popravak (opisan translokacijskim modelom), selektivno otpuštanje iz aktivnog mjesta u okolinu, kao i hidroliza u aktivnom mjestu. Svaki od njih završava hidrolizom aa-AMP-a, no mnogi mehanistički detalji su i dalje nepoznati. Kod IleRS bi mogla postojati sva tri načina ovog puta popravka (revijalno prikazano u Ling i sur. 2009).

#### 3.1. Translokacijski model

Translokacijski model podrazumijeva nastanak nepripadnog aa-AMP-a u aktivnom mjestu, koji se potom tRNA-ovisno translocira u ~30 Å udaljenu domenu za popravak, gdje se odvija njegova hidroliza. Posebice je proučavan u IleRS sustavu (Nomanbhoy, 1999). Mutacijske analize upućuju na zaključak da se hidroliza nepripadnog Val-AMP-a odvija u domeni za popravak IleRS (Hendrickson i sur, 2002). Već je spomenuto da je put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA dominantan u IleRS sustavu (Fersht, 1977), kao i da su riješene kristalne strukture *T. thermophilus* IleRS pokazale da CP1 domena veže Val-AMS, analog Val-AMP-a (Fukunaga i Yokoyama, 2006). Na temelju svega navedenog, provedeni su eksperimenti s dATP<sup>†</sup>, fluorescentnim analogom ATP-a, kako bi se potvrdilo postojanje same translokacije. Nakon translokacije supstrata iz aktivnog mjesta u domenu za popravak, na ispražnjeno aktivno mjesto se veže dATP<sup>†</sup>, te izaziva porast fluorescencije. Tako se indirektno može pratiti translokacija supstrata, koji može biti aa-AMP ili aa-tRNA<sup>aa</sup> (Slika 3.).

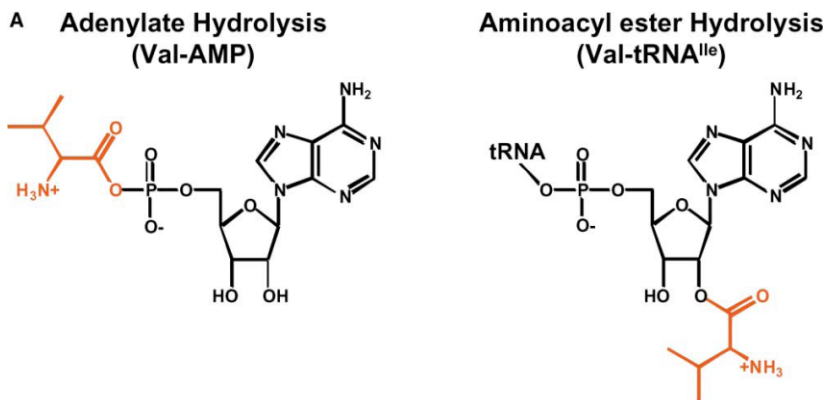




**Slika 3.** Shema praćenja translokacije supstrata (Val<sup>+</sup>) uz pomoć fluorescentnog dATP<sup>+</sup>. Val<sup>+</sup> je aktivirani oblik valina. On može predstavljati aa-AMP ili aa-tRNA<sup>aa</sup>. Translokacija Val<sup>+</sup> iz aktivnog mjesta u domenu za popravak omogućuje brzo vezanje dATP<sup>+</sup> za aktivno mjesto, te promjenu fluorescencije zbog interakcije sa triptofanskim ostacima u aktivnom mjestu koja se može pratiti (preuzeto iz: Nomanbhoy I sur. 1999).

Porast fluorescencije je opažen samo kod Val-AMP-a u prisustvu tRNA<sup>Ile</sup>, ali ne i kod Ile-AMP, što upućuje na to da se translocira samo nepripadni Val-AMP (Nomanbhoy, 1999). Pripadna tRNA<sup>Ile</sup> vjerojatno omogućuje konformacijsku promjenu IleRS potrebnu za translokaciju supstrata (Hale i sur, 1997) Navedena konformacijska promjena je potencijalno ključna u određivanju ukupne brzine translokacijskog koraka. Na temelju riješenih kristalnih struktura *T. thermophilus* IleRS (u odsustvu tRNA<sup>Ile</sup>), nije se uspio otkriti translokacijski put unutar strukture enzima (Nureki i sur. 1998), točnije aminokiselinski ostaci koji bi sudjelovali u translokaciji supstrata i onemogućili njegovo otpuštanje u otopinu. To upućuje na važnost tRNA<sup>Ile</sup> u popravku, te je čak moguće da translokacijski put uključuje aminokiselinske ostatke enzima i nukleotide tRNA<sup>Ile</sup> (Nomanbhoy, 1999).

Međutim, neke stavke translokacijskog modela i dalje ostaju nerazjašnjene. Sam mehanizam translokacije i hidrolize supstrata je nepoznat (Fukunaga i Yokoyama, 2006). Na temelju navedene metode koja koristi dATP<sup>+</sup>, ne može se sa sigurnošću odrediti da li se radi o putu popravka prije ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA, tj. translocira li se aa-AMP ili aa-tRNA<sup>aa</sup>. Također, navedenom metodom se ne može potvrditi da je put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA jedini put popravka kod IleRS, kako je predložio Fersht 1977. Domena za popravak bi stoga trebala vezati i hidrolizirati 2 različita supstrata: miješani anhidrid (aa-AMP) i ester (aa-tRNA<sup>aa</sup>) (Hendricskon, 2002) (Slika 4.)



**Slika 4.** Dva supstrata za hidrolizu u domeni za popravak IleRS. Valin (označen crveno) se otpušta nakon hidrolize (Preuzeto iz: Hendrickson i sur. 2002).

Iako je to neobično za enzimsku katalizu, predložene su dvije zasebne, ali preklapajuće regije unutar domene za popravak koje vežu dva različita supstrata (Fukai, 2000). Mutacijske analize upućuju na zaključak da su bar neki aminokiselinski ostaci unutar mjesta popravka specifični za pojedini supstrat (Hendrickson i sur. 2002) Mogućnost postojanja jedinstvenog katalitičkog mjesta (čak aminokiselinskog ostatka), koji bi omogućio dvije zasebne kemijske reakcije, je intenzivno istraživano mutagenetskim analizama, ali ono i dalje nije dokazano (Shmidt i Schimmel, 1994, 1995; Nureki i sur., 1998; Hendrickson, 2000, Doring, 2001).

### 3.2. Ostali načini popravka

Dok se translokacijskim modelom predlaže tRNA-ovisna hidroliza nepripadnog aa-AMP-a u domeni za popravak, hidroliza se može odvijati i tRNA-neovisno (bez prisutnosti tRNA) u aktivnom mjestu ili u okolini, nakon otpuštanja nepripadnog aa-AMP-a. Primjer su SerRS i ProRS, aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II (Gruić-Sovulj, 2007, Hati i sur. 2006). Budući da SerRS ne posjeduje zasebnu domenu za popravak (Cusack i sur. 1990), može se naslutiti da se on hidrolizira u aktivnom mjestu (Gruić-Sovulj, 2007). Selektivno otpuštanje nepripadnog aa-AMP-a iz aktivnog mjesta u okolinu pokazano je kod ProRS ( Hati i sur. 2006). U oba slučaja nije razjašnjen sam mehanizam hidrolize. Nepripadni aa-AMP, vezan unutar aktivnog mjesta, bi mogao dopustiti ulaz molekule vode, nakon čega bi uslijedila hidroliza (Gruić-Sovulj, 2005), no konformacijske promjene koje pritom inducira nepripadni aa-AMP nisu razjašnjene. Iako

je pokazano da je moguća tRNA-neovisna hidroliza nepripadnog aa-AMP-a u aktivnom mjestu, ostaje pitanje da li se to događa i kod tRNA-ovisne hidrolize.

#### 4. MEĐUSOBNI ODNOS DVAJU PUTEVA POPRAVKA

Međusobni odnos dvaju puteva popravka ostaje i dalje nejasan kod većine aminoacil-tRNA-sintetaza. Posebice su nepoznati detalji mehanizma puta popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA, kao i njegoa fiziološka važnost (Yadavalli i sur. 2008). Jasno je da na temelju krajnjih produkata navedenih puteva popravka ne možemo zaključiti koji je od njih dominantan, ili koji je eventualno jedini put popravka kod pojedine aaRS. Dok je ustanovljeno da se esterska veza aa-tRNA<sup>aa</sup> hidrolizira nakon translokacije 3' kraja u domenu za popravak, translokacija vrlo nestabilnog aa-AMP-a prije naredne hidrolize je upitna. Može se reći da se u CP1 domeni IleRS, ValRS, i LeuRS odvija hidroliza esterske veze aa-tRNA, no da li se u njoj odvija i hidroliza aa-AMP-a nije još jasno (revijalno prikazano u Ling i sur. 2009).

Prema "postpre-prepre" modelu (Bishop i sur. 2002, Nordin i Schimmel, 2003), da bi se mogao odvijati put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA, potrebno je započeti s jednim krugom puta popravka poslije prijenosa aminokiseline na tRNA, tijekom kojeg se 3' kraj tRNA translocira u ~35Å udaljenu domenu popravka. Tada se esterska veza aa-tRNA<sup>aa</sup> hidrolizira u domeni za popravak, a tRNA pridonosi konformaciji enzima koja dozvoljava daljnju translokaciju nepripadnog aa-AMP-a. Ovaj model umanjuje značaj puta popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA, jer da bi se isti uopće odvijao, potrebno ga je započeti drugim putem popravka. To znači da aaRS mora uzastopno vezati i aktivirati nepripadnu aminokiselinu, što je malo vjerojatno obzirom da primjerice IleRS 100 puta bolje veže pripadni izoleucin od nepripadnog valina (Bishop i sur. 2002). Stoga je ovaj model vrlo upitan i ostaje predmet istraživanju.

LeuRS predstavlja dobar sustav za proučavanje uloge obaju puteva popravka, kao i njihov međusobni odnos (Yadavalli i sur. 2008). Predloženo je da LeuRS kod *Escherichia coli* koristi samo put popravka poslije prijenosa aminokiseline na tRNA (Englisch, 1986). Delecijom čitave CP1 domene očuvana je specifičnost u sintezi pripadne Leu-tRNA<sup>Leu</sup> (u prisustvu pripadne tRNA<sup>Leu</sup>) zbog pojavljivanja latentnog puta popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA (Boniecki i sur. 2008). No, da li je zaista

taj put popravka latentan ili se odvija simultano s drugim putem i u fiziološkim uvjetima ostaje upitno. Mijenjanjem sustava aaRS uvođenjem mutacija ili delecijom čitave domene, može se naslutiti postojanje određenog puta popravka, no ne možemo dobiti realnu sliku o njihovom međusobnom odnosu. Dominantnost jednog od puteva popravka kod određene aaRS može ovisiti o nizu faktora, kao što je mjesto insercije CP1 domene, koje se donekle razlikuje kod IleRS, LeuRS, i ValRS (Cusack i sur. 2000). Također je moguće da se jedan put popravka odvija pri aktivaciji jedne nepripadne aminokiseline, a drugi kod neke druge (Boniecki i sur. 2008).

Rezultati dobiveni s fluorescentnim dATP<sup>†</sup> pokazuju da je translokacijski korak najsporiji (Nomanbhoy, 1999.). U tom slučaju, moguć je brzi prijenos aminokiseline na tRNA prije translokacijskog koraka, što rezultira translokacijom aa-tRNA<sup>aa</sup>, a ne aa-AMP-a. Ukoliko je put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA evolucijski stariji, moguće je da se put popravka poslije prijenosa aminokiseline na tRNA razvio da ispravi pogrešku onda kad se nije stigao hidrolizirati nepripadni aa-AMP (Boniecki i sur. 2008). Također, postoji mogućnost da se put popravka prije prijenosa aminokiseline na tRNA nastavio odvijati u evolucijski starijem aktivnom mjestu, odakle se nepripadni aa-AMP može selektivno otpustiti u okolinu, ili hidrolizirati u aktivnom mjestu. Daljnjim istraživanjima se nastoje razotkriti detalji mehanizma popravka pogreške, kao i njihova fiziološka važnost kod različitih aminoacil-tRNA-sintetaza i organizama. Nova saznanja na tom polju mogla bi omogućiti borbu protiv bolesti potencijalno izazvanih aminoaciliranjem tRNA nepripadnom aminokiselinom.

## 5. LITERATURA:

Baldwin AN, Berg P. 1966. Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. *J. Biol. Chem.* 241:839–45

Bishop AC, Nomanbhoy TK, Schimmel P. 2002. Blocking site-to-site translocation of a misactivated amino acid by mutation of a class I tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:585–90

Boniecki MT, Vu MT, Betha AK, Martinis SA. 2008. CP1-dependent partitioning of pretransfer and posttransfer editing in leucyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:19223–28

- Cusack S, Berthet-Colominas C, Hartlein M, Nassar N, Leberman R. 1990. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* 347:249–55
- Döring V, Mootz HD, Nangle LA, Hendrickson TL, de Crécy-Lagard V, et al. 2001. Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine coding pathway. *Science* 292:501–4
- Fersht AR. 1977. Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 16:1025–30
- Fukai S, Nureki O, Sekine S, Shimada A, Tao J, et al. 2000. Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA<sup>Val</sup> and valyl-tRNA synthetase. *Cell* 103:793–803
- Fukunaga R, Yokoyama S. 2006. Structural basis for substrate recognition by the editing domain of isoleucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* 359:901–12
- Giegé R, Sissler M, Florentz C. 1998. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* 26:5017–35
- Gruic-Sovulj I, Rokov-Plavec J, Weygand-Durasevic I. 2007. Hydrolysis of noncognate aminoacyladenylates by a class II aminoacyl-tRNA synthetase lacking an editing domain. *FEBS Lett.* 581:5110–14
- Gruic-Sovulj I, Uter N, Bullock T, Perona JJ. 2005. tRNA-dependent aminoacyl-adenylate hydrolysis by a nonediting class I aminoacyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 280:23978–86
- Hale SP, Auld DS, Schmidt E, Schimmel P. 1997. Discrete determinants in transfer RNA for editing and aminoacylation. *Science* 276:1250–52
- Hale SP, Schimmel P. 1996. Protein synthesis editing by a DNA aptamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2755–58
- Hati S, Ziervogel B, SternJohn J, Wong FC, Nagan MC, et al. 2006. Pre-transfer editing by class II prolyl-tRNA synthetase: role of aminoacylation active site in “selective release” of noncognate amino acids. *J. Biol. Chem.* 281:27862–72
- Hendrickson TL, Nomanbhoy TK, de Crécy-Lagard V, Fukai S, Nureki O, et al. 2002. Mutational separation of two pathways for editing by a class I tRNA synthetase. *Mol. Cell* 9:353–62
- Hendrickson TL, Nomanbhoy TK, Schimmel P. 2000. Errors from selective disruption of the editing center in a tRNA synthetase. *Biochemistry* 39:8180–86

- Jakubowski H, Fersht AR. 1981. Alternative pathways for editing noncognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 9:3105–17
- Lee JW, Beebe K, Nangle LA, Jang J, Longo-Guess CM, et al. 2006. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 443:50–55
- Ling J, Reynolds N, Ibba M. 2009. Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. 63:61–78
- Nomanbhoy TK, Hendrickson TL, Schimmel P. 1999. Transfer RNA-dependent translocation of misactivated amino acids to prevent errors in protein synthesis. *Mol. Cell* 4:519–28
- Nordin BE, Schimmel P. 2003. Transiently misacylated tRNA is a primer for editing of misactivated adenylates by class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* 42:12989–97
- Nureki O, Vassilyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, et al. 1998. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 280:578–82
- Pauling L. 1958. The probability of errors in the process of protein molecules. In *Festschrift fuer Professor Dr. Arthur Stoll Siebzigsten* (Basel, Switzerland: Birkhayser-Verlag), pp. 597–602.
- Schmidt E, Schimmel P. 1994. Mutational isolation of a sieve for editing in a transfer RNA synthetase. *Science* 264:265–67
- Schmidt E, Schimmel P. 1995. Residues in a class I tRNA synthetase which determine selectivity of amino acid recognition in the context of tRNA. *Biochemistry* 34:11204–10
- Yadavalli SS, Musier-Forsyth K, Ibba M. 2008. The return of pretransfer editing in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:19031–32

## 6. SAŽETAK

Očuvanje točnosti biosinteze proteina je od iznimne važnosti za stanicu. Prvi korak u biosintezi proteina je sinteza odgovarajućeg para aminokiseline i tRNA pomoću aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS). Ti enzimi moraju prepoznati pripadnu aminokiselinu i tRNA, te u reakciji aminoacilacije prenijeti aminokiselinu na 3' kraj tRNA. Odabir pripadne aminokiseline predstavlja problem nekim aminoacil-tRNA-sintetazama, pa one mogu aktivirati i nepripadne aminokiseline koje su kemijski, odnosno strukturno slične pripadnoj. U nekim slučajevima nepripadna aminokiselina se može prenijeti i na tRNA.

Da bi se održao dovoljno visok stupanj točnosti biosinteze proteina, te su aminoacil-tRNA-sintetaze razvile dodatne hidrolitičke puteve popravka pogreške. Popravak se može odvijati prije ili poslije prijenosa aminokiseline na tRNA. U prvom slučaju hidrolizira se nepripadni aminoacil-adenilat (aktivirani oblik aminokiseline), a u drugom misacilirana tRNA (tRNA aminoacilirana nepripadnom aminokiselinom). Mnoge aaRS imaju prostorno odijeljenu domenu za popravak pogreške u kojoj dolazi do hidrolize misacilirane tRNA. Novija istraživanja na ovom polju dovode u pitanje predloženi mehanizam tRNA-ovisnog puta popravka koji se odvija prije prijenosa aminokiseline na tRNA. Neka od osnovnih pitanja na koja se još nastoji odgovoriti su: gdje se događa hidroliza nepripadnog aminoacil-adenilata, da li također u domeni za popravak ili unutar aktivnog mjesta? Koja je uloga pripadne tRNA u tom procesu? Budući da oba puta popravka imaju iste produkte i ovisnost o tRNA, teško ih je neovisno istraživati. Zbog toga je međusobni odnos dvaju puteva popravka još uvijek nepoznat kod većine aaRS. Ipak, metodama mehanističke enzimologije nastoji se razjasniti mehanizam popravka pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA, kao i njegova uloga u očuvanju točnosti biosinteze proteina.

## 7. SUMMARY

Maintaining fidelity of protein biosynthesis is an essential feature of a cell. The first step of translation is synthesis of cognate amino acid:tRNA pairs by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS). These enzymes have to recognize and covalently link corresponding amino acid to its cognate tRNA. Selection of cognate amino acid represents a problem for some of aaRS, so they can misactivate near-cognate amino acids that are chemically and structurally similar to the cognate ones. In some cases, misactivated amino acid can be attached to tRNA. To maintain satisfying degree of translational quality, some aaRS have developed additional hydrolytic editing mechanisms to correct errors in the selection of amino acids. Editing can occur either before (pretransfer editing) or after aminoacylation to tRNA (posttransfer editing). In pretransfer editing, noncognate aminoacyl-adenylate is hydrolyzed, while in the posttransfer editing, misacylated tRNA is hydrolyzed. Many aaRS have separated and

structurally distinct editing domain, where hydrolysis of misacylated tRNA takes place. With latest findings in this field of research, proposed mechanism for tRNA-dependent pretransfer editing becomes questionable. Some of the main issues are: where does aminoacyl-adenylate hydrolysis take place, within editing domain as misacylated tRNA, or within synthetic active site? What is the exact role for tRNA in that process? Both of the editing processes yield same final products, and both are tRNA dependent, so researches have difficulties with investigating them independently of one another. Still, mechanistic enzymology methods are used to further investigate pretransfer editing mechanism, and consequently to determine its role in maintaining fidelity of protein biosynthesis.