

Sinteza i popravak 3'-kraja molekule tRNA pomoću tRNA-nukleotidil-transferaze

Hajdinjak, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:256173>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**Sinteza i popravak 3'-kraja molekule tRNA
pomoću tRNA-nukleotidil-transferaze**

***Synthesis and repair of 3'-end of tRNA molecule by
tRNA nucleotidyltransferase***

SEMINARSKI RAD

Studentica : Mateja Hajdinjak

Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentor : doc. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2010.

Sadržaj

1.	Uvod	2
2.	Dva razreda enzima ATP(CTP):tRNA-nukleotidil-transferaze	4
2.1.	Strukturne razlike dvaju razreda CCA enzima	4
2.2.	Prepoznavanje i vezanje molekule tRNA kao supstrata	5
2.3.	Prepoznavanje i vezanje odgovarajućih nukleotida.....	6
2.4.	Završetak reakcije	9
3.	Specifična aktivnost CCA enzima.....	10
3.1.	Modeli sinteze slijeda CCA	10
3.2.	Model sinteze slijeda CCA za enzim iz bakterije <i>E. coli</i>	11
4.	Katalitička svojstva i mehanizam reakcije	14
5.	Usporedba ljudske i tRNA-nukleotidil-transferaze iz bakterije <i>E.coli</i>	18
5.1.	Osnovne karakteristike CCA enzima iz bakterije <i>E. coli</i>	19
5.2.	Karakteristike ljudskog CCA enzima	20
6.	Literatura	21
7.	Sažetak	23
8.	Summary	24

1. Uvod

Život u svim oblicima koje danas poznajemo uvelike ovisi o prijenosu genetičke informacije od molekule DNA do molekula RNA i proteina. Iako molekula DNA služi kao osnova genetičke informacije i stoga zauzima središnje mjesto među biološkim makromolekulama, kodirajući pri tome sve stanične molekule RNA i proteine, a time i veličinu, oblik i funkciju organizma, većinu aktivnosti u stanici obavljaju proteini. Upravo zbog toga je njihova točna sinteza izuzetno važna za pravilno funkcioniranje stanica i organizama. Slijed aminokiselina svakog proteina određuje njegovu trodimenzionalnu strukturu i aktivnost, što čini povezivanje aminokiselina ključnim korakom za proizvodnju funkcionalnih proteina.

Molekule *transfer* RNA (tRNA) donose odgovarajuće aminokiseline na rastući polipeptidni lanac tijekom proteinske sinteze, što ih čini izuzetno važnima u procesu translacije. 3'-kraj molekule tRNA sadrži očuvani slijed CCA na položajima 74, 75 i 76 (Hou 2000), potreban za prepoznavanje molekule tRNA kao supstrata od strane aminoacil - tRNA-sintetaze i translacijskog faktora EF-Tu (Völter i Müller 2010). Nadalje, pozicioniranje aminoacilirane tRNA na ribosom tijekom translacije, pa čak i otpuštanje peptida s ribosoma, ovise o netaknutom CCA kraju, koji je bitan za koordinaciju vode i efikasnu hidrolizu esterske veze translacijskog produkta. Osim u prepoznavanju i vezanju molekule tRNA od strane odgovarajućih enzima, CCA kraj je neophodan i kao sastavni dio određenih reakcijskih mehanizama i stoga od životne važnosti za stanicu (Völter i Müller 2010). Tu činjenicu potvrđuje podatak da je slijed CCA na 3'-kraju molekule tRNA pronađen u svim do sad analiziranim organizmima (Lizano i sur. 2008).

Iako neophodan, slijed CCA nije kodiran gotovo svim eukariotskim, kao i mnogim arhealnim i bakterijskim tRNA genima (Xiong i Steitz 2006). Posttranskripcijsku sintezu i popravak slijeda CCA katalizira enzim ATP(CTP):tRNA-nukleotidil-transferaza (CCA enzim), koji spada u obitelj nukleotidil-transferaza zajedno s poli(A)-polimerazom, terminalnom deoksinukleotidil-transferazom, DNA-polimerazom β i kanamicin-nukleotidil-transferazom (Hou 2000). U organizmima koji ne kodiraju slijed CCA u tRNA genima, tRNA-nukleotidil-transferaza odgovorna je za sintezu 3'-kraja molekule tRNA i stoga esencijalna, dok je u organizmima poput bakterije *Escherichia coli*, koji kodiraju slijed CCA

tRNA genima, odgovorna za popravak oštećenih 3'-krajeva molekule tRNA i stoga nije esencijalna (Hou 2000). Kolonije bakterije *E. coli* kojima nedostaje CCA enzim su vijabilne, ali smanjenog rasta (Zhu i Deutscher 1987).

tRNA-nukleotidil-transferaza se razlikuje od ostalih polimeraza u nekoliko karakteristika, od kojih je najzanimljivija činjenica da joj nije potrebna nukleinska kiselina kao kalup, za razliku od standardnih DNA- i RNA-polimeraza (Hou i sur. 2005). Također, ugrađuje samo strogo određen broj nukleotida u molekulu tRNA koja služi kao klica i zaustavlja polimerizaciju velikom efikasnošću i točnošću (Völter i Morl 2010), što je razlikuje od enzima poput poli(A)-polimeraze i terminalne deoksinukleotidil-transferaze kojima također nije potreban kalup (Hou 2000). Nadalje, CCA enzim za ugradnju odabire isključivo CTP i ATP, pri tome u potpunosti diskriminirajući druga dva nukleozid trifosfata (Xiong i Steitz 2006). Visoko je selektivan prema strukturama nalik molekuli tRNA kao polimerizacijskim supstratima (Hou 2000, Shi i sur. 1998), te uz *de novo* sintezu obavlja funkcije popravka i održavanja CCA kraja (Lizano i sur. 2008, Okabe i sur. 2003).

Iznenadjuće, ovaj se enzim pojavio dva puta tijekom evolucije, dovodeći do razvoja dvaju razreda enzima koji dijele sveukupnu strukturnu organizaciju i obavljaju identične funkcije, ali im se pojedinačne domene izrazito razlikuju i imaju drugačija mehanistička riješenja (Hou i sur. 2005, Völter i Morl 2010, Xiong i Steitz 2006). Ipak, katalitička srž je očuvana u oba razreda enzima i sadrži tri karboksilata u rasporedu karakterističnom za DNA- i RNA-polimeraze koje koriste mehanizam dvaju metalnih iona za prijenos fosforila (Hou i sur. 2005). I dok enzime razreda 1 nalazimo samo u arhejama, enzimi razreda 2 prisutni su u eukariotima i bakterijama (Xiong i Steitz 2006, Weiner 2004).

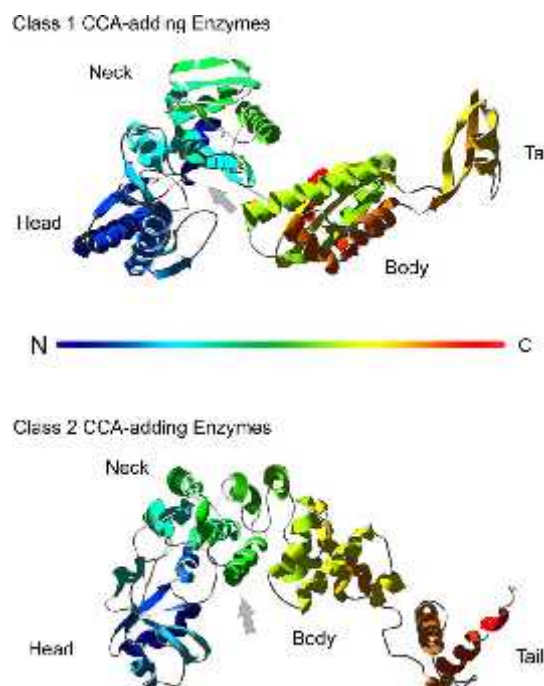
Kristalne strukture enzima, kao i enzima u kompleksu sa supstratima, dale su detaljan uvid u mehanizam reakcije kojim tRNA-nukleotidil-transferaza postiže specifičnost prema supstratu bez upotrebe nukleinske kiseline kao kalupa (Hou i sur. 2005, Shi i sur. 1998). Zbog prisutnosti samo jednog aktivnog mjesta na enzimu, to aktivno mjesto mora moći promijeniti specifičnost između ATP-a i CTP-a, ovisno o staničnoj koncentraciji nukleotida i slijedu na 3'-kraju molekule tRNA. Oba razreda enzima ovise o metalnim ionima, te upotrebljuju primarno Mg^{2+} i Mn^{2+} kao produktivne metalne ione (Hou i sur. 2005). Osim razlike između enzima koji pripadaju različitim razredima, postoje značajne razlike između enzima koji pripadaju istom razredu, što je vidljivo na primjeru ljudskog i CCA enzima iz bakterije *E.*

coli. I dok je ljudski CCA enzim neophodan za vijabilnost organizma, CCA enzim iz bakterije *E. coli* ima primarno popravljачku funkciju (Lizano i sur. 2008).

2. Dva razreda enzima ATP(CTP):tRNA-nukleotidil-transferaze

2.1. Strukturne razlike dvaju razreda CCA enzima

Dva razreda tRNA-nukleotidil-transferaze dijele malu homologiju u aminokiselinskom slijedu. Kristalna strukturna analiza pokazala je da se enzimi oba razreda sastoje od četiri domene sličnih dimenzija, nazvanih glava, vrat, tijelo i rep (Hou i sur. 2005, Okabe i sur. 2003, Xiong i Steitz 2006). Ipak, sveukupna građa enzima dvaju razreda je u potpunosti različita (slika 1.). Struktura enzima razreda 1 sastoji se većinom od β ploča i dimerizira kroz domene tijela i repa svakog monomera (Hou i sur. 2005), pri čemu se tRNA vezna domena tijela sastoji od β ploča s poprečnim α heliksima (Völter i Miel 2010). Domene glave i vrata formiraju aktivno mjesto, te se također sastoje od α heliksa i β ploča (Völter i Miel 2010, Xiong i Steitz 2006). U CCA enzimima razreda 2, samo domena glave sadrži β ploče i formira nukleotidil-transferaznu srž, dok se domene vrata, tijela i repa sastoje isključivo od α heliksa, dajući enzimu izgled nalik „morskom konjicu“ ili „kuki“ (Völter i Miel 2010).



Slika 1. Strukturna organizacija CCA enzima razreda 1 i 2. Iako su enzimi oba razreda slične veličine i oblika nalik „kuki“, distribucija elemenata sekundarne strukture u domenama vrata, tijela i repa se veoma razlikuje. U enzimima

razreda 1, ove regije sadrže α helikse i β ploče, dok enzimi razreda 2, s druge strane, u istim regijama sadrži isključivo α helikalne strukture. Katalitička srž, koja se nalazi u domenama glave i vrata oba razreda enzima, označena je sivim strelicama. Plavo je označena N-terminalna regija, a crveno C-terminalna regija enzima (preuzeto iz Völter i Müller, 2010.).

Od četiri glavne domene, samo je N-terminalna domena glave strukturno homologna između dvaju razreda (Xiong i Steitz 2006) i sadrži tri konzervirana karboksilata u rasporedu karakterističnom za DNA- i RNA-polimeraze koje koriste karboksilate za koordinaciju dvaju metalnih iona, a koji kataliziraju prijenos fosforila (Hou i sur. 2005). Relativna orijentacija domene glave u odnosu na domene tijela i repa među ovim klasama razlikuje se za gotovo 90° (Xiong i Steitz 2006).

Predstavnik enzima razreda 1, arhealna tRNA-nukleotidil-transferaza iz *Archeoglobus fulgidus*, je strukturno homologna eukariotskoj poli(A)-polimerazi čitavom duljinom, što upućuje na mogućnost divergentne evolucije ovih dvaju enzima od zajedničkog pretka. U eukariotima je poli(A)-polimeraza važna za posttranskripcijsku doradu molekula mRNA, dok je sazrijevanje 3'-kraja tRNA katalizirano CCA enzimima razreda 2, koji su homologni onima nađenima u bakterijama. Nejasno je zbog čega je eukariotski CCA enzim homologan bakterijskom, a ne arhealnom CCA enzimu, budući da su arheje i eukarioti koevoluirali otprilike milijardu godina nakon divergencije od bakterija (Xiong i Steitz 2006).

2.2. Prepoznavanje i vezanje molekule tRNA kao supstrata

Oba razreda CCA enzima koriste komplementarnost oblika i naboja za prepoznavanje i vezanje molekule tRNA kao supstrata (Xiong i Steitz 2006). Enzimi razreda 2 prepoznaju supstratne molekule tRNA interakcijom njihovih C-terminalnih regija s gornjom polovicom strukture tRNA, koja se sastoji od akceptorske petlje i T-ruke (Lizano i sur. 2008). Na taj su način miniheliksi, koji oponašaju gornji dio molekule tRNA, prihvaćeni od strane CCA enzima kao supstrati za sintezu slijeda CCA (Hou 2000). Akceptorska peteljka i T-ruka molekule tRNA leže unutar proširene udubine na enzimu, dok je CCA kraj pozicioniran u aktivnom mjestu koje se nalazi unutar domene glave. T-ruka stupa u kontakt s domenom repa, pri čemu antikodonska omča strši dalje od enzima (Xiong i Steitz 2006). Ovakvo pozicioniranje, usko prijanjanje, objašnjava činjenicu da enzim prepoznaje samo molekulu tRNA ili strukture koje su joj nalik kao odgovarajuće supstrate (Hou 2000, Shi i sur. 1998, Xiong i Steitz 2006), budući da ostale molekule RNA u stanici ne formiraju dvolančane strukture odgovarajuće duljine s pogodnim 3'-nukleotidnim krajem. Osim slijeda CCA koji se nalazi na 3'-kraju molekule tRNA i O2 atoma citidina na položaju 72, koji stvara nespecifičnu

vodikovu vezu s bočnim ogrankom tirozina CCA enzima, enzim stupa u interakciju isključivo sa šećerno-fosfatnom okosnicom molekule tRNA. Postoji određena razlika između dvaju razreda enzima u orijentaciji vezane tRNA u odnosu na CCA kraj (Xiong i Steitz 2006).

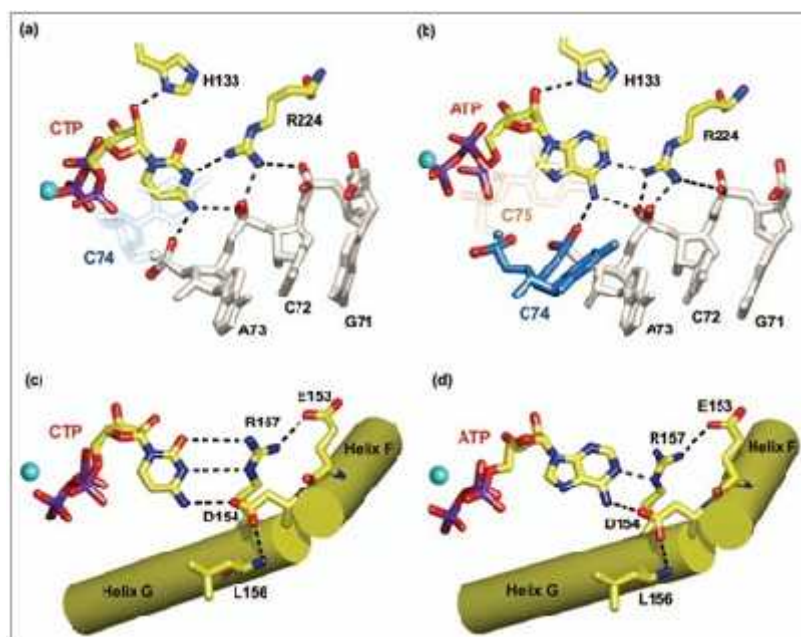
2.3. Prepoznavanje i vezanje odgovarajućih nukleotida

Budući da tRNA-nukleotidil-transferaza ne upotrebljava nukleinsku kiselinu kao kalup, koristi jedinstven način oponašanja interakcija Watson-Crickovog sparivanja baza za selekciju dolaznog CTP-a ili ATP-a (Lizano i sur. 2008, Völter i Müller 2010). Očaravajući aspekt oba razreda CCA enzima je činjenica da ovi enzimi znaju kad trebaju ugraditi koji nukleotid (Völter i Müller 2010). Kristalne strukture oba razreda enzima otkrile su skupinu visoko konzerviranih aminokiselina koje se nalaze u jednom nukleotidnom veznom mjestu i koje stupaju u interakciju s dolaznim nukleotidom stvarajući vodikove veze nalik Watson-Crickovim vezama (Lizano i sur. 2008, Völter i Müller 2010). Kod CCA enzima razreda 1 fosfatna okosnica molekule tRNA i bočni ogranak arginina sudjeluju u selekciji nukleotida, dok kod CCA enzima razreda 2 aminokiselinski bočni ogranci u potpunosti određuju specifičnost vezanja nukleotida (Lizano i sur. 2008, Xiong i Steitz 2006, Völter i Müller 2010).

Nukleotidno vezno mjesto enzima razreda 1 prepoznaje nukleotide samo jednim visoko očuvanim argininom i stoga je prilično neobično, u principu tolerirajući bilo koji tip nukleotida (Lizano i sur. 2008, Völter i Müller 2010). Specifičnost dolazi od 3'-kraja molekule tRNA koji stupa u interakciju s nukleotidom koji će biti ugrađen (Völter i Müller 2010, Weiner 2004). Naime, fosfatna okosnica molekule tRNA stupa u interakciju s vezanim CTP-om ili ATP-om i dodatno pomaže pozicionirati bočni ogranak arginina u pravilnu orijentaciju. Stoga, CCA enzimi razreda 1 prepoznaju i odabiru točan nukleotid ne kao čisti proteinski enzimi, već kao ribonukleoproteini, gdje molekula tRNA nije samo supstrat, već aktivni dio nukleotidnog veznog mjesta (Völter i Müller 2010).

Najzanimljivija činjenica u specifičnosti prepoznavanja nukleotida od strane CCA enzima je sposobnost diskriminacije ATP-a na položajima 74 i 75, i promjena specifičnosti enzima od citidina prema adenzinu nakon ugradnje drugog citidina (Xiong i Steitz 2006). Ova promjena događa se, u slučaju enzima razreda 1, promjenom veličine i oblika nukleotidnog veznog mjesta kao posljedice djelovanja rastućeg 3'-kraja molekule tRNA. Za adiciju prva dva nukleotida, vezno mjesto (džep) je odgovarajuće veličine da primi CTP, te se naknadno proširuje kako bi primilo ATP, pri čemu gubi sposobnost pravilnog pozicioniranja i

interakcije s CTP-om. Proširenje nukleotidnog veznog mjesta posljedica je interakcije između rastućeg 3'-kraja tRNA i domene glave enzima, što dovodi do progresivnog otvaranja fleksibilne domene glave (Xiong i Steitz 2006)..



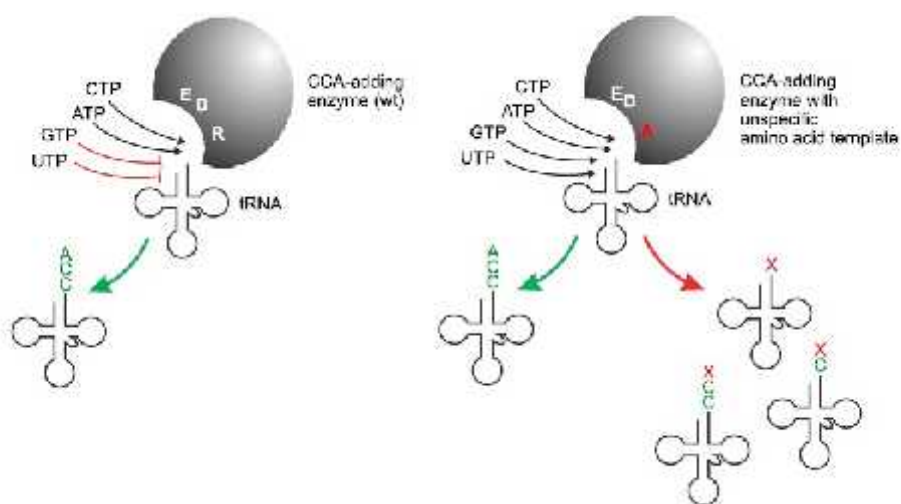
Slika 2. Obrazac vezanja proizlazi iz komplementarnosti između dušične baze dolaznog NTP-a i nukleotidnog veznog mjesta. Dolazni NTP-ovi i proteinski bočni ogranci prikazani su bojama, dok su vodikove veze prikazane crtanim linijama. Plave kuglice predstavljaju metalne ione. **A.)** CTP i **B.)** ATP se vežu na enzim razreda 1 iz *Archeoglobus fulgidus* s vezanom molekulom tRNA. Nukleotidi C74 i C75 su prikazani plavom i narančastom bojom, za razliku od ostalih nukleotida koji su prikazani sivom bojom. **C.)** CTP i **D.)** ATP se vežu na enzim razreda 2 iz *Bacillus stearothermophilus* bez vezane molekule tRNA (preuzeto iz Xiong and Steitz, 2006.).

CCA enzimi razreda 2, za razliku od enzima razreda 1, odabiru nukleotide koje će ugraditi pomoću pravog aminokiselinskog kalupa, koji se sastoji od tri visoko konzervirane aminokiseline: glutamata, aspartata i arginina (motiv EDXXR, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu). Arginin stvara vodikove veze s ATP-om (jedna veza) i CTP-om (dvije veze), uz pomoć aspartata koji doprinosi još jednom vodikovom vezom (Lizano i sur. 2008, Völter i Müller 2010).

Zamjena arginina alaninom poništava selektivnost nukleotidnog veznog mjesta i dovodi do dramatičnog povećanja broja krivih ugradnji (Lizano i sur. 2008, Völter i Müller 2010). No, mutirani enzim i dalje sintetizira značajan broj točnih CCA krajeva, što ukazuje da molekula tRNA ponovno ima značajnu ulogu, ali ne u odabiru točnih nukleotida koji će stupiti u interakciju s veznim mjestom. Umjesto toga, čini se da je ugrađeni citidin na 3'-kraju prepoznat od drugog seta aminokiselina, dovodeći do specifične orijentacije 3'-hidroksilne skupine riboze. Ovakvo pozicioniranje potrebno je za nukleofilni napad 3'-hidroksilne skupine na α -fosfat vezanog NTP-a. No, ako je krivi nukleotid već ugrađen na 3'-kraj tRNA,

takav 3'-kraj se ne može pravilno pozicionirati za nukleofilni napad i nema ugradnje drugih nukleotida (Vlter i Mrl 2010).

Upotrebom mehanizma pozicioniranja 3'-kraja molekule tRNA, enzimi razreda 2 produljuju samo one tRNA koje sadrže točno dodane nukleotide. Pri tome ovakav tip selektivne polimerizacije predstavlja učinkoviti *back-up* mehanizam (slika 3.) za sintezu slijeda CCA. Iznenadujuće postojanje *back-up* sustava u CCA enzimima omogućuje učinkovitu i točnu sintezu esencijalnog CCA kraja u slučaju da nukleotidno vezno mjesto više nije u mogućnosti razlikovati točne od pogrešnih nukleotida (Lizano i sur. 2008). Predložen je model sinteze slijeda CCA kataliziranog CCA enzimom razreda 1, prema kojem uz vezno mjesto enzima, rastući 3'-kraj i fosfatna okosnica molekule tRNA imaju važnu ulogu u selekciji nukleotida. Preslagivanje produljene molekule tRNA, koja služi kao klica, u aktivnom mjestu enzima inducira „prekidač“ (eng. *switch*) veznog mjesta prema ATP-u, uspostavljajući na taj način suradnju dinamičnog ribonukleoproteinskog kompleksa. Selekcija nukleotida od strane CCA enzima razreda 2 oslanja se isključivo na aminokiselinski kalup u nukleotidnom veznom mjestu. Pokazano je kako i u enzimima razreda 2 dolazi do suradnje 3'-kraja molekule tRNA s veznim mjestom. Naime, ugradnje nukleotida koje ne dovode do sinteze točnog CCA kraja su prepoznate i odbačene jer se ne mogu pravilno orijentirati u aktivnom mjestu enzima na način da pomognu u prepoznavanju sljedećeg nukleotida (Lizano i sur. 2008).



Slika 3. Back-up mehanizam za sintezu slijeda CCA. Suradnja enzima i molekule tRNA kao supstrata omogućuje uspješnu sintezu slijeda CCA, čak i u prisutnosti mutiranog, nespecifičnog NTP veznog mjesta, naglašavajući time vitalnu važnost ove reakcije. I dok divlji tip enzima (lijevo) prihvaća samo CTP i ATP u definiranom redosljedu (zeleni strelica) i sintetizira CCA krajeve vrlo visokom vjerošću, CCA enzim s greškom u aminokiselinskom kalupu (desno) ima opuštenu specifičnost prema NTP-u. No, zbog suradnje molekule tRNA koja služi kao klica i CCA enzima, molekule tRNA s krivo ugrađenim nukleotidima (crveni X) su prepoznate i odbačene (crvena strelica), dok su tRNA s točno ugrađenim nukleotidima (zeleno) dovršene dajući funkcionalne molekule tRNA (preuzeto iz Lizano i sur., 2008.)

Dakle, dok enzimi razreda 1 odabiru nukleotide samo na temelju vezanja NTP-a, enzimi razreda 2 odabiru nukleotide na temelju vezanja i katalize. Zajednička karakteristika oba razreda je dodatan doprinos *stacking* interakcija molekule tRNA i vezanih nukleotida u visokoj nukleotidnoj selektivnosti tijekom sinteze slijeda CCA. Postojanje samo jednog nukleotidnog veznog mjesta zahtijeva određenu fleksibilnost oba razreda CCA enzima. Za enzime razreda 2, promjena specifičnosti veznog mjesta od CTP-a prema ATP-u dovodi do značajne konformacijske promjene enzima, što je potvrđeno opažanjima da se kokristalu tRNA-nukleotidil-transferaze i vezane tRNA (koja završava CC- slijedom) dodatkom ATP-a narušava konformacija (Völter i Miel 2010).

2.4. Završetak reakcije

Posljednji problem s kojim se susreću CCA enzimi je prepoznavanje točne duljine tRNA produkta i završetak reakcije. Pretpostavlja se da građa nukleotidnog veznog mjesta doprinosi ograničenom broju nukleotida koji se ugrađuju (Xiong i Steitz 2006), jer pri standardnim uvjetima gotovo nikad ne dolazi do ugradnje dodatnih nukleotida (Hou i sur. 2005). Uzimajući u obzir da je tRNA-nukleotidil-transferaza blisko srodna poli(A)-polimerazi (Völter i Miel 2010, Xiong i Steitz 2006) nejasno je zbog čega samo u CCA enzimima dolazi do ograničenja duljine dodanog slijeda.

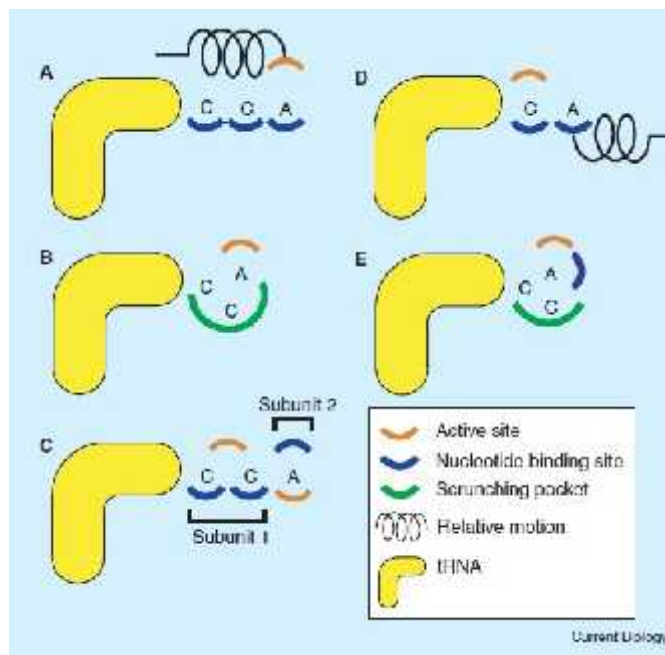
Korak terminacije reakcije razjašnjen je samo za enzime razreda 1, na primjeru enzima iz arheje *Archeoglobus fulgidus*, koji u kompleksu s tRNA pune duljine pokazuje ograničenu veličinu nukleotidnog veznog mjesta, a koja je nedovoljna za smještaj dvaju nukleotida potrebnih za pozicioniranje adenzina na položaju 76 (A76) u aktivno mjesto za daljnju ugradnju nukleotida. Nadalje, konformacija slijeda CCA, koji je smješten između tRNA akceptorske petlje i enzima, također smanjuje mogućnost ispadanja adenzina na položaju 76 iz aktivnog mjesta. No, kako je tRNA pune duljine produkt zadnje reakcije ugradnje, koja se može revertirati pirofosforolizom, slijed CCA se mora moći maknuti i promijeniti konformaciju koja pozicionira adenzin na položaju 76 u nukleotidno vezno mjesto i citidin na položaju 75 na kranji položaj molekule tRNA (Xiong i Steitz 2006). Čini se da CCA enzimi koriste energiju vodikovih veza, energiju *stacking* interakcija i veličinu aktivnog mjesta za kontrolu procesa polimerizacije, terminacije i pirofosforilacije.

3. Specifična aktivnost CCA enzima

3.1. Modeli sinteze slijeda CCA

U konvencionalnoj proteinski kataliziranoj, kalupom usmjerenoj RNA ili DNA sintezi, selekcija dolaznog nukleotida predstavlja suradnju između proteina i nukleinske kiseline. Točan nukleotid je preferiran, a pogrešni nukleotidi diskriminirani pomoću najmanje četiri različita tipa interakcija: sparivanjem s komplementarnom bazom kalupa, *stacking* interakcijama novoformiranog baznog para s prethodnim baznim parom, interakcijama dolaznih nukleotida s ostatkom enzima ili slaganjem nukleotida između prethodnog baznog para i kritičnog tirozina koji formira hidrofobni zid ispred aktivnog mjesta kao u *Taq*, T7 ili DNA-polimerazi iz *E. coli*. Ni protein, a ni dupleks početnice i kalupa ne sadrži neovisno nukleotidno vezno mjesto, već se ono formira suradnjom proteina i nukleinske kiseline (Shi i sur. 1998).

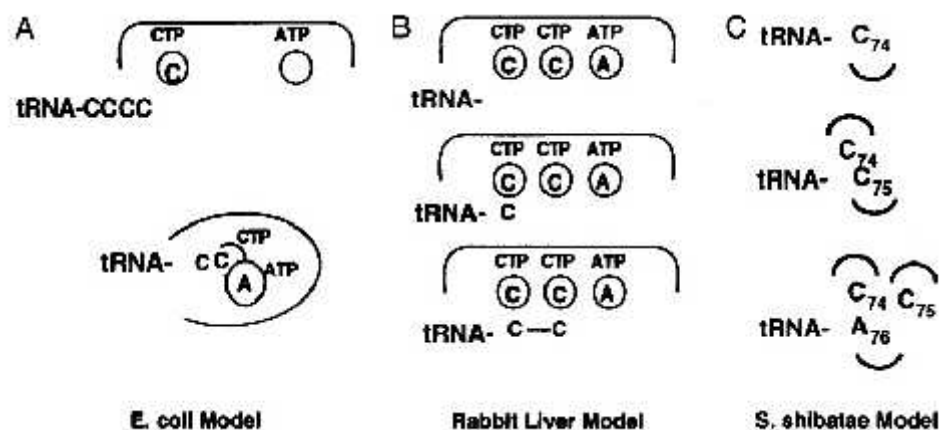
U prošlosti su predlagani brojni modeli za objašnjenje jedinstvene enzimske aktivnosti CCA enzima (Hou 2000, Weiner 2004) dajući pri tome prednost većem broju veznih mjesta za nukleotide CTP i ATP na monomernom ili dimernom enzimu (slika 4.). Ni jedan od navedenih pet modela nije u potpunosti točan, ali ni sasvim pogrešan (Weiner 2004). Predložena su dva modela enzima s jednim veznim mjestom za nukleotide, *collaborative templating* model i *scrunching* model (Xiong i Steitz 2006), pri čemu oba govore da se rastući 3'-kraj molekule tRNA zapravo postupno presavija, omogućujući pri tome upotrebu samo jednog aktivnog mjesta na enzimu (Shi i sur. 1998, Xiong i Steitz 2006). Glavna razlika između ova dva modela je da se specifičnost selekcije dolaznog nukleotida u *collaborative templating* modelu postiže suradnjom s kalupom, dok u *scrunching* modelu enzim sam po sebi diktira selekciju supstrata. Kako bi se otkrio misterij mehanizma kojim CCA enzim postiže svoju specifičnost, potrebne su strukturne informacije odgovarajućih kompleksa enzim-supstrat. Ove strukture pružaju detaljan opis elegantnog mehanizma kojim CCA enzim postiže supstratnu specifičnost bez upotrebe nukleinske kiseline kao kalupa (Xiong i Steitz 2006).



Slika 4. Prijašnji modeli za sintezu slijeda CCA: **A) Model s više veznih mjesta za nukleotide:** Enzim ima dva ili čak tri različita vezna mjesta za nukleotide, s jednim aktivnim mjestom koje se pomiče relativno prema ovim mjestima i molekuli tRNA. **B) Collaborative templating model:** tRNA je stacionirana na površini enzima. Nukleotidno vezno mjesto se sastoji od molekule RNA i proteina. Rastući CCA kraj se presavija za postizanje specifičnosti ugradnje nukleotida od strane fiksiranog aktivnog mjesta. **C) Scrunching-shuttling model:** dva CTP-a se ugrađuju pomoću jedne podjedinice homomultimernog enzima, dok se ATP ugrađuje pomoću druge podjedinice. 3'-kraj molekule tRNA-CC se prebacuje iz jednog aktivnog mjesta u drugo. **D) Model poli(C)-polimeraze:** Enzim je poli(C)-polimeraza koja prolazi konformacijsku promjenu omogućujući na taj način ugradnju jednog ATP-a vezanog negdje drugdje na enzimu. **E) Proteinski potpomognut scrunching model :** Nukleotidno vezno mjesto mijenja specifičnost od CTP-a prema ATP-u (preuzeto iz Weiner, 2004.)

3.2. Model sinteze slijeda CCA za enzim iz bakterije *E. coli*

Prema ranije predloženom modelu (slika 5.), enzim posjeduje jedno CTP vezno mjesto blizu katalitičkog (aktivnog) mjesta i jedno ATP vezno mjesto, koje je ujedno i ATP donorsko mjesto i kontrolira konformaciju enzima. Kad je ATP mjesto slobodno, enzim je u otvorenoj formi i katalizira sintezu slijeda poli(C) kao poli(C)-polimeraza. Kad je ATP vezan u odgovarajućem ATP veznom mjestu, enzim je u zatvorenoj formi i katalizira sintezu slijeda CCA. Konformacijska promjena iz otvorene u zatvorenu formu dovodi ATP vezno mjesto u blizinu katalitičkog mjesta. Suprotno, konformacijska promjena događa se kako bi se formirao zid koji blokira sintezu slijeda poli(C). U oba slučaja, vezani ATP regulira položaj katalitičkog mjesta CCA enzima u odnosu na citidine na položajima 74 i 75 u molekuli tRNA. Nakon ugradnje dva CTP-a, enzim katalizira ugradnju ATP-a na 3'-kraj molekule tRNA. Prisutnost krajnjeg adenzina signalizira završetak reakcije i otpuštanje produkta. Integracija poli(C)-polimerazne aktivnosti i regulatorni efekt ATP-a omogućuju sintezu slijeda CCA bez prisutnosti lanca kalupa (Hou 2000).



Slika 5. Modeli sinteze slijeda CCA. A.) Model CCA enzima iz bakterije *E. coli* predlaže da je enzim u otvorenoj formi kad je ATP vezno mjesto slobodno i ponaša se kao poli(C)-polimeraza. Enzim je u zatvorenoj formi kad je ATP vezan i katalizira sintezu slijeda CCA na 3'-kraju molekule tRNA. B.) Model enzima iz zečje jetre pretpostavlja da enzim upotrebljava dva CTP vezna mjesta i jedno ATP vezno mjesto, poredana linearno jedno pored drugog, usmjeravajući na taj način ulazak 3'-kraja molekule tRNA. C.) Model enzima iz *Sulfolobus shibatae* pretpostavlja da enzim i 3'-kraj molekule tRNA stvaraju dinamičan kompleks koji se presavija svakom ugradnjom nukleotida kako bi se postigla specifičnost sljedeće ugradnje (preuzeto iz Hou, 2000.)

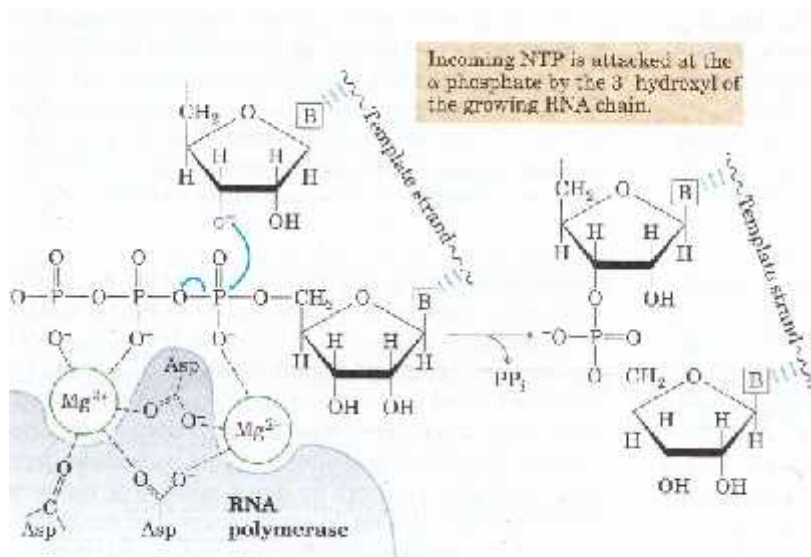
Glavna obilježja predloženog modela su postojanje jednog aktivnog mjesta i alosterički efekt ATP-a na konformaciju enzima. Analizom aminokiselnog slijeda članova nukleotidil-transferazne superobitelji utvrđeno je da katalitičko mjesto sadrži očuvani DXD motiv (Hou 2000, Hou i sur. 2005). U kristalnim strukturama DNA-polimeraze β i kanamicin-nukleotidil-transferaze, aspartati u DXD motivu koordiniraju dva metalna iona odgovorna za katalizu. Supstitucijom ovih aminokiselina eliminirana je aktivnost dodatka CTP-a i ATP-a, potvrđujući pretpostavku da su njihovi bočni ogranci smješteni u aktivnom mjestu enzima. DXD motiv pojavljuje se samo jednom u aminokiselinskom slijedu CCA enzima, što potvrđuje postojanje samo jednog aktivnog mjesta (Hou 2000).

Novije analize kristalnih struktura CCA enzima razreda 2, kojima pripada i enzim iz *E. coli*, otkrile su set od tri aminokiseline (motiv EDXXR) u N-terminalnoj regiji enzima i za koje se smatra da su odgovorne za selekciju točnih nukleotida koji će biti ugrađeni na 3'-kraj molekule tRNA (Lizano i sur. 2008). Zamjena glutamata i aspartata u EDXXR motivu nije pokazala nikakav efekt na ugradnju nukleotida, dok je zamjena arginina na trećoj očuvanoj poziciji aminokiselnog kalupa dovela do značajnog efekta smanjenja broja ugradnji. Naime, argininski bočni ogranak u nukleotidnom veznom mjestu je glavno mjesto interakcije enzima s dolaznim CTP-om i ATP-om, formirajući jednu (ATP) ili dvije (CTP) vodikove veze s dušičnim bazama nukleotida. Dakle, umjesto prije predložena dva nukleotidna vezna mjesta, postoji samo jedno vezno mjesto za nukleotide, koje sadrži tri očuvane aminokiseline

u EDXXR motivu i koje mijenja specifičnost od CTP-a prema ATP-u, formirajući s dolaznim nukleotidima vodikove veze nalik Watson-Crickovim vezama (Lizano i sur. 2008, Viter i Mirl 2010).

4. Katalitička svojstva i mehanizam reakcije

Kemijski mehanizam koji stoji iza reakcije polimerizacije je iznenađujuće očuvan u svim polimerazama u sve tri domene života. Naime, sve poznate DNA- i RNA-polimeraze koriste mehanizam dvaju metalnih iona za katalizu reakcije polimerizacije (slika 6.), uključujući DNA-polimerazu β i poli(A)-polimerazu, koje su usko povezane s CCA enzimom. U ovakvom mehanizmu adicije nukleotida, dva metalna iona udaljena su $\sim 4 \text{ \AA}$, te koordinirana visoko očuvanim karboksilatima u aktivnom mjestu polimeraza (Hou i sur. 2005). Jedan je metalni ion pozicioniran na način da smanjuje afinitet 3'-hidroksilne skupine za vodik, pri tome pojačavajući nukleofilnost 3'-O⁻ za napad na α -fosfat dolaznog NTP-a. Drugi metalni ion potpomaže odlazak pirofosfatne skupine koja se oslobađa tijekom reakcije. Oba metalna iona stabiliziraju strukturu i naboj očekivanog pentakovalentnog prijelaznog stanja (Hou i sur. 2005). Ovakav mehanizam koriste i mnogi enzimi koji sudjeluju u metabolizmu nukleinskih kiselina, poput restrikcijских endonukleaza, alkalnih fosfataza i ribozima (Vlter i Mrl 2010). Nastavljajući do sljedećeg nukleotida koji će biti ugrađen, DNA- i RNA-polimeraza sintetiziraju nukleinsku kiselinu u 5' $\rightarrow$ 3' smjeru.



Slika 6. Katalitički mehanizam RNA sinteze RNA-polimerazom. Reakcija uključuje dva Mg^{2+} iona, koordinirana fosfatnim skupinama dolaznog NTP-a i trima bočnim ograncima aspartata (Asp^{460} , Asp^{462} i Asp^{464} u β' podjedinici RNA-polimeraze iz *E. coli*), koji su visoko očuvani u svim RNA-polimerazama svih vrsta. Jedan Mg^{2+} ion omogućuje napad 3'-hidroksilne skupine na α -fosfat NTP-a; drugi Mg^{2+} ion pomaže istisnuti pirofosfat; oba metalna iona stabiliziraju pentakovalentno prijelazno stanje (preuzeto iz Lehninger, 2008.)

Iako obje klase CCA enzima posjeduju isključivu specifičnost za adiciju CTP-a na položaje 74 i 75 u molekuli tRNA, specifičnost adicije na položaj 76 ovisi o eksperimentalnim uvjetima. U prisutnosti ATP-a i CTP-a, enzimi nadjačano odabiru ATP za ugradnju na CC kraj, dok u prisutnosti samo CTP-a, sintetiziraju CCC i poli(C) krajeve, no smanjenom brzinom u usporedbi sa sintezom CCA kraja. Sinteza slijeda CCC i poli(C) se može uspješno spriječiti većim koncentracijama ATP-a, primjerice za enzime razreda 1 vrijednostima od 1 mM, a za enzime razreda 2 već vrijednošću od 0.1 mM. Pri fiziološkim uvjetima, gdje su koncentracije ATP-a obično od 3 mM do 4 mM, a CTP-a od 0.05 mM do 0.2 mM, CCA enzimi bi trebali sintetizirati samo slijed CCA. Iako je sinteza slijeda CCC i poli(C) nefiziološka, daje korisne informacije o katalitičkom mehanizmu enzima.

Za analizu ugradnje nukleotida na položaj 76, kao supstrati tRNA-nukleotidil-transferaze korišteni su miniheliksi specifični za valin (Val-34C miniheliksi), koji sadrže 34 nukleotida i završavaju C75 nukleotidom odgovarajućeg CC kraja. Val-34C miniheliks se sastoji od akceptorske omče i T-ruke molekule tRNA^{Val} iz bakterije *E. coli*, dijelova ključnih za specifičnu interakciju s CCA enzimom. Testirana je sposobnost dvaju razreda CCA enzima da koriste različite dvovalentne metalne ione za reakciju sinteze slijeda CCA, u koncentracijama od 1 mM pri pH 9.0. Normalizacijom brzina reakcije u odnosu na koncentracije molekula RNA i enzima, dobivene su k_{cat}/K_m vrijednosti za različite metalne ione. Relativna aktivnost enzima smanjivala se sljedećim redoslijedom: $Mn^{2+} > Mg^{2+} \gg Zn^{2+} = Co^{2+} \gg Ni^{2+} = Ca^{2+}$, pri čemu znak > označava smanjenje aktivnosti otprilike 10 puta u odnosu na prethodni ion, a >> označava smanjenje aktivnosti više od 100 puta u odnosu na prethodni ion. I dok su različiti metalni ioni podržavali aktivnost ugradnje nukleotida do određene vrijednosti, enzim koji je koristio ione Mn^{2+} je pokazao najveću aktivnost, veću čak i od enzima koji je koristio ione Mg^{2+} . Ioni Ni^{2+} i Ca^{2+} su se pokazali kao neproduktivni ioni za katalizu uz brzine reakcije manje od one dobivene Mn^{2+} ionom za čak 10^5 - 10^6 puta. Ovi eksperimenti pokazali su da aktivnost enzima oba razreda ovisi o vrsti metalnog iona, te da su Mg^{2+} i Mn^{2+} produktivni metalni ioni, a drugi ioni poput Ca^{2+} neproduktivni.

Za CCA-enzim iz *E. coli* prisutnost suboptimalnih koncentracija Ca^{2+} iona (1 μ M) je imala inhibitorni efekt na aktivnost enzima koji sadrži već vezani ion Mg^{2+} , ali je stimulirala aktivnost enzima kako se koncentracija iona Mg^{2+} približavala zasićenju. Sposobnost Ca^{2+} da

dovede do ovakvog efekta upućuje na vezanje iona Ca^{2+} na enzim i u skladu je s pretpostavkom o postojanju dvaju veznih mjesta za metalne ione na enzimu.

Prema tome, ion Ca^{2+} se lako veže na prvo mjesto, ali mora kompetirati s ionom Mg^{2+} za vezanje na drugo mjesto na CCA enzimu. Mali inhibitorni efekt Ca^{2+} pri niskim koncentracijama Mg^{2+} odražava kompeticiju između iona Mg^{2+} i Ca^{2+} za drugo mjesto na enzimu. Kako koncentracija Mg^{2+} raste, on u potpunosti zauzima drugo vezno mjesto CCA enzima i radi sinergistički s ionom Ca^{2+} vezanim u prvom mjestu, kako bi olakšao reakciju katalize. Za daljnju analizu efekta iona Ca^{2+} , rađeni su eksperimenti s aktivnijim ionom Mn^{2+} (1mM) u prisutnosti rastućih koncentracija Ca^{2+} do vrijednosti od 6mM. Mn^{2+} ovisna aktivnost enzima je rasla povećanjem koncentracija iona Ca^{2+} do vrijednosti od 2mM, ali se progresivno smanjivala daljnjim povećanjem koncentracija iona Ca^{2+} . Kao i u slučaju s Mg^{2+} , Ca^{2+} je pri nižim koncentracijama istisnuo Mn^{2+} iz prvog veznog mjesta, dok je pri većim koncentracijama istisnuo Mn^{2+} i iz drugog veznog mjesta na enzimu. Enzim s ionima Ca^{2+} vezanima u oba mjesta na enzimu je inaktivan, stoga je porast količine enzima s dva vezana iona Ca^{2+} porastom koncentracije iona Ca^{2+} u skladu sa smanjenjem sveukupne aktivnosti enzima.

Kako bi se procijenilo na koji način metalni ioni određuju specifičnost ugradnje odgovarajućih nukleotida, promatrana je kinetika ugradnje nukleotida za produktivne metalne ione pomoću fleksibilnog enzima iz *E. coli*, sposobnog za sintezu slijeda CCC upotrebom obje vrste produktivnih metalnih iona. Naime, reakcija katalizirana enzimom iz *E. coli* koji pripada enzimima razreda 2 i enzimom iz *Sulfolobus shibatae* koji pripada razredu 1 CCA enzima, u prisutnosti iona Mg^{2+} kao kofaktora je pokazala veću specifičnost u usporedbi s ionom Mn^{2+} kao kofaktorom. Detaljnom kinetičkom analizom enzima iz *E. coli* dobiveni su podaci da je faktor specifičnosti CCA enzima koji koristi ion Mg^{2+} ~2000, dok je za CCA enzim koji koristi ion Mn^{2+} ~20. Dakle CCA enzim je u prisutnosti iona Mg^{2+} specifičniji od enzima u prisutnosti iona Mn^{2+} čak 100 puta. Glavna pokretačka snaga Mg^{2+} ovisne specifičnosti CCA enzima je niži K_m za ATP nego za CTP (50 puta) i viši k_{cat} (30-40 puta). Pokazano je da enzim u prisutnosti iona Mg^{2+} katalizira sintezu samo jednog slijeda CCA, dok u prisutnosti iona Mn^{2+} katalizira sintezu polimera CCA ili CCC na 3'-krajevima molekule tRNA. Stoga je ion Mg^{2+} fiziološki relevantan metalni ion, pri čemu aktivnost CCA enzima raste porastom koncentracije Mg^{2+} do vrijednosti od otprilike 1 mM do 2 mM. Ovakvo povećanje aktivnosti enzima povećanjem koncentracije metalnih iona potvrđuje

pretpostavku o katalitičkom mehanizmu ovisnom o metalnim ionima. Najniže optimalne koncentracije iona od 1 mM do 2 mM dosljedne su vrijednostima za druge enzime ovisne o metalnim ionima.

Najneočekivaniya razlika je efekt iona Mn^{2+} na selektivnost CCA enzima prema ATP-u pri promjenjivim uvjetima. I dok ion Mn^{2+} smanjuje specifičnost oba razreda CCA enzima, krajnji ishod za oba razreda je prilično različit. Čini se da ion Mn^{2+} omogućuje enzimu iz *E. coli* sintezu CCA polimera na 3'-kraju molekule tRNA pri promjenjivim uvjetima. Iako su daljnje analize potrebne za potvrdu poli(CCA) sinteze, ovakva aktivnost upućuje da je uređena sinteza slijeda CCA očuvana, ali je izgubljena ograničenost sinteze samo jednog slijeda CCA. Poli(CCA) aktivnost nije ranije zabilježena u divljem tipu enzima iz *E. coli*, već je pokazana u varijanti CCA enzima koji ima zamijenjenu C-terminalnu regiju od 27 aminokiselina analognom regijom iz poli(A)-polimeraze. Predloženo je da regija od 27 aminokiselina zapravo djeluje kao „sidro“ koje ograničava polimerizaciju kataliziranu enzimom iz *E. coli* na samo tri nukleotida. Ion Mn^{2+} ima sposobnost eliminacije efekta „sidra“ u divljem tipu enzima iz *E. coli*, oponašajući karakteristike C-terminalno promijenjenog mutanta. Suprotno, efekt iona Mn^{2+} u enzimu iz *S. shibatae* je isključivo promicanje poli(C) sinteze, koja ukazuje na to da je ugradnja CTP-a toliko brza da u potpunosti suprimira ugradnju ATP-a (Hou i sur. 2005).

Metalni ioni potrebni su za vezanje ATP i CTP nukleotida i katalizu, no ne i za vezanje molekule RNA. Stoga je uloga metalnih iona vjerojatno stabilizacija i oblikovanje strukture aktivnog mjesta.

5. Usporedba ljudske i tRNA-nukleotidil-transferaze iz bakterije *E.coli*

Oba enzima pripadaju CCA enzimima razreda 2. Uz veliku sličnost u aminokiselinskom slijedu, dijele i usporedive kinetičke parametre za ugradnju nukleotida, iako njihova specifična funkcija u stanici nije jednaka. Ljudski tRNA geni ne kodiraju slijed CCA na 3'-kraju molekule tRNA, zbog čega je tRNA-nukleotidil-transferaza esencijalan enzim, izuzetno potreban za održanje vijabilnosti organizma (Lizano i sur. 2008). Suprotno tome, svi tRNA geni iz bakterije *E. coli* uključuju CCA triplet (Hou 2000), pa time utišavanje ekspresije gena za CCA enzim nije letalno, ali dovodi do smanjenog rasta kolonija (Zhu i Deutscher 1987).

Iako imaju veliku sličnost u aminokiselinskom slijedu, oba enzima pokazuju iznenađujuće razlike u minimalnim supstratima (Lizano i sur. 2008), što može biti povezano s činjenicom da je enzim iz bakterije *E. coli* prvenstveno popravljajući enzim (Hou 2000, Hou i sur. 2005), čija je glavna funkcija obnova CCA kraja nakon egzonukleazne degradacije. Suprotno, glavna funkcija ljudskog enzima je *de novo* sinteza CCA kraja tijekom dozrijevanja novosintetiziranog tRNA transkripta. Prirodni supstrati CCA enzima u bakteriji *E. coli* su standardne molekule tRNA, dok ljudski enzim, koji je prisutan i u mitohondriju stanice, mora moći prepoznati i citoplazmatske i mitohondrijske molekule tRNA. Pri tome mitohondrijske tRNA pokazuju značajnu devijaciju od klasične strukture tRNA (varijacije u duljini D- i T-ruke i nedostatak očuvanih nukleotidnih pozicija koje su uključene u stvaranje tercijarnih interakcija). Stoga su mitohondrijske tRNA često slabi supstrati za enzim iz *E. coli*, dok ih ljudski enzim prihvaća kao normalne supstrate (Lizano i sur. 2008).

Osim razlike u strukturama molekula tRNA koje prepoznaju kao odgovarajuće supstrate, ova dva enzima razlikuju se i u svojim C-terminalnim regijama. I ljudski i enzim iz *E. coli* sadrže visoko očuvanu N-terminalnu regiju veličine 25 kDa (Lizano i sur. 2008, Shi i sur. 1998), koja sadrži katalitičku jezgru, kao i vezno mjesto za nukleotide potrebno za pravilnu sintezu slijeda CCA. C-terminalni dijelovi enzima, budući da nisu dio katalitičke jezgre, ne pokazuju značajnu sličnost u aminokiselinskom slijedu. Zanimljivo, enzim iz bakterije *E. coli* sadrži HD motiv s 2',3'-cikličkom fosfodiesteraznom, 2'-nukleotidaznom i fosfataznom aktivnošću, karakterističan za superobitelj metalno ovisnih fosfohidrolaza.

Ljudski enzim s druge strane ne posjeduje analogni aminokiselinski slijed i postoji u 2 oblika s drugačijim aktivnostima ugradnje nukleotida (sinteza slijedova CCA i CC), zbog alternativnog *splicing*-a molekule mRNA, koji rezultira nešto kraćim C-terminalnim dijelom enzima. Očito se čak i blisko srodni CCA enzimi mogu razlikovati u svom katalitičkom repertoaru, ovisno o potrebama individualnog staničnog sustava u kojem se nalaze (Lizano i sur. 2008).

5.1. Osnovne karakteristike CCA enzima iz bakterije *E. coli*

Kao posljedica činjenice da je CCA triplet kodiran svim tRNA genima (Zhu i Deutscher 1987, Hou 2000), tRNA-nukleotidil-transferaza djeluje kao popravilački enzim održavajući 3'-kraj molekule tRNA koji je važan za aminoacilaciju. Ova aktivnost je važna, ali ne i esencijalna za stanicu, budući da su sojevi s utišanom ekspresijom gena za CCA enzim još uvijek vijabilni do određene vrijednosti, ali su smanjenog rasta i sadrže povećani broj molekula tRNA s oštećenim 3'-krajevima. Oštećene molekule tRNA posljedica su egzonukleazne aktivnosti enzima RNaze T. No, ovakvo oštećenje pri kojem nastaje 3'-OH kraj, nije jedino moguće oštećenje molekule tRNA koje se može popraviti aktivnošću tRNA-nukleotidil-transferaze iz *E. coli*. Spontano razaranje fosfodiesterске veze u fiziološkim uvjetima, kao i aktivnost mnogih drugih RNaza dovode do nastanka 2',3'-cikličkih fosfatnih skupina na 3'-kraju molekule tRNA, kao posljedica intramolekulske transesterifikacijske reakcije. Konverzija oštećenih krajeva molekule tRNA u 3'-OH krajeve defosforilacijom mogu biti katalizirani fosfataznom aktivnošću CCA enzima iz bakterije *E. coli* (Lizano i sur. 2008).

Noseći HD domenu karakterističnu za fosfohidrolaznu superobitelj (Lizano i sur. 2008, Vilter i Mirl 2010), CCA enzim iz bakterije *E. coli* može ukloniti 2',3'-cikličke fosfate, kao i 2'- ili 3'-fosfatne skupine, što upućuje da su prirodni supstrati za ovu aktivnost ciklički fosfati na 3'-krajevima molekula tRNA. Očito povezana fosfatazna i polimerazna aktivnost, katalizirana istim enzimom na istom supstratu, osigurava brzu regeneraciju funkcionalne molekule tRNA (Lizano i sur. 2008).

5.2. Karakteristike ljudskog CCA enzima

Glavna funkcija CCA enzima kod ljudi, za razliku od onog u *E.coli*, je *de novo* sinteza CCA kraja budući da ni jedan ljudski gen za tRNA ne kodira CCA-triplet. Kako ne sadrži HD domenu poput enzima iz *E. coli*, ljudski CCA enzim ne može ukloniti 2',3'-cikličke fosfatne skupine s 3'-krajeva oštećenih molekula tRNA. Dakle, ovaj enzim nije multifunkcionalan popravljajući enzim, već ima samo transferaznu aktivnost za sintezu CCA kraja. Budući da se oštećenja 3'-krajeva molekula tRNA događaju u svim organizmima, vrlo je vjerojatno da odvojena fosfatazna aktivnost nekog drugog enzima miče cikličke fosfate kako bi se omogućila regeneracija CCA krajeva pomoću nukleotidil-transferaze (Lizano i sur. 2008). Primjer je to međusobne suradnje različitih enzima u popravku 3'-kraja molekule tRNA.

6. Literatura

- Hoffmeier, A., Betat, H., Bluschke, A., Günther, R., Junghanns, S., Hofmann, H.J. and Mörl, M. (2010) Unusual evolution of a catalytic core element in CCA-adding enzymes. *Nucleic Acids Research*, 1-12, doi:10.1093/nar/gkq176
- Hou, Y.M., Gu, S.Q., Zhou, H. and Ingerman, L. (2005) Metal-ion-dependent catalysis and specificity of CCA-adding enzymes: A comparison of two classes. *Biochemistry* 44, 12849-128459
- Hou, Y.M. (2000) Unusual synthesis by the *Escherichia coli* CCA-adding enzyme. *RNA* 6, 1031-1043
- Lizano, E., Scheibe, M., Rammelt, C., Betat, H. and Mörl, M. (2008) A comparative analysis of CCA-adding enzymes from human and *E. coli*: Differences in CCA addition and tRNA 3'-end repair. *Biochimie* 90, 762-772
- Moor, N.A., Repkova, M.N., Yamkovoy, V.I. and Lavrik, O.I. (1994) Alterations at the 3'-CCA end of *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* tRNA^{Phe} do not abolish their acceptor activity. *FEBS Letters* 351, 241-242
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth edition, New York, Freeman and Company, 1021-1024
- Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O. and Yokoyama, S. (2003) Divergent evolutions of trinucleotide polymerization revealed by an archaeal CCA-adding enzyme structure. *The EMBO Journal* 22, 5918-5927
- Shi, P.Y., Maizels, N. and Weiner, A.M. (1998.) CCA addition by tRNA nucleotidyltransferase: polymerization without translocation? *The EMBO Journal* 17, 3197-3206
- Vörtler, S. and Mörl, M. (2010) tRNA-nucleotidyltransferases: Highly unusual RNA polymerases with vital functions. *FEBS Letters* 584, 297-302
- Weiner, A. M. (2004) tRNA Maturation: RNA Polymerization without a Nucleic Acid Template. *Current Biology*, Vol. 14, R883-R88

- Xiong, Y. and Steitz, T.A. (2006) A story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 12-17
- Zhu, L. and Deutscher, M.P (1987) tRNA nucleotidyltransferase is not essential for *Escherichia coli* viability. *The EMBO Journal* vol.6 no.8 pp.2473-2477

7. Sažetak

Enzim ATP(CTP):tRNA-nukleotidil-transferaza (CCA enzim) katalizira posttranskripcijsku sintezu i popravak slijeda CCA na 3'-kraju molekule tRNA, neophodnog u reakcijama translacije i stoga od životne važnosti za stanicu. CCA enzim se razlikuje od standardnih DNA- i RNA-polimeraza u nekoliko karakteristika. Osim što ne treba nukleinsku kiselinu kao kalup, u molekulu tRNA koja služi kao klica ugrađuje strogo određen broj nukleotida, zaustavljajući reakciju visokom efikasnošću i točnošću. Također, CCA enzim za ugradnju odabire isključivo CTP i ATP i jako je selektivan prema strukturama nalik molekuli tRNA kao polimerizacijskim supstratima. Zbog prisutnosti samo jednog aktivnog mjesta, ono mora promijeniti specifičnost ugradnje između ATP-a i CTP-a, ovisno o staničnoj koncentraciji nukleotida i slijedu na 3'-kraju molekule tRNA.

Tijekom evolucije došlo je do razvoja dvaju razreda CCA enzima koji se, iako dijele sveukupnu strukturnu organizaciju i obavljaju identične funkcije, izrazito razlikuju u strukturi pojedinačnih domena i posjeduju drugačija mehanistička rješenja. Enzimi razreda 1 prisutni su samo u arhejama, dok su enzimi razreda 2 prisutni u bakterijama i eukariotima. Oba razreda CCA enzima sadrže visoko očuvanu katalitičku srž u domeni glave s tri karboksilata u rasporedu karakterističnom za DNA- i RNA-polimeraze koje koriste mehanizam dvaju metalnih iona za prijenos fosforila. Oba razreda enzima ovise o metalnim ionima, pri čemu primarno koriste Mg^{2+} i Mn^{2+} kao produktivne metalne ione. Osim razlike između dvaju razreda enzima, postoje značajne razlike između enzima koji pripadaju istom razredu, što je vidljivo na primjeru ljudskog i CCA enzima iz bakterije *E. coli*.

8. Summary

ATP(CTP):tRNA nucleotidyltransferase (CCA enzyme) is responsible for posttranscriptional synthesis and repair of the 3'-terminal CCA sequence in tRNA transcripts, which is indispensable in translation reactions and therefore of vital importance for the cell. CCA enzyme differs from standard DNA and RNA polymerases in several ways. Apart from the fact that it does not require a nucleic acid template, it incorporates only restricted number of nucleotides in a tRNA primer and then stops reaction at a high efficiency and accuracy. It also selects exclusively CTP and ATP for incorporation and it is highly selective for tRNA-like structures as a polymerization substrate. Because of the existence of single active site, this active site has to change the specificity between ATP i CTP depending on cellular concentrations of nucleotides and the sequence of the tRNA 3' end.

CCA enzymes evolved in two classes during evolution, and although this two classes share an overall structural organization and fulfill identical functions, the individual domains vary extremely and have different mechanistic solutions. Class 1 enzymes are found only in archaea while class2 enzymes are found in bacteria and eukaryotes. Both classes of CCA enzymes have a highly conserved catalytic core within the head domain having three carboxylates in a geometry similar to those of template-dependent DNA and RNA polymerases that use two metal ion mechanism for phosphoryl transfer. Both classes use Mn^{2+} and Mg^{2+} as productive metal ions. Except for the differences between two classes, even closely related enzymes that belong to the same class differ substantially.