

Struktura i funkcija atipičnih arhealnih seril-tRNA-sintetaza

Silvija Bilokapić^{1,2,3}, Timm Maier¹, Ivana Weygand-Đurašević^{2,3}, Nenad Ban¹:

¹*Institute for Molecular Biology and Biophysics, Swiss Federal Institute of Technology (ETH Zürich), Hoenggerberg, HPK Building, CH-8093 Zürich, Switzerland*

²*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia, and* ³*Rudjer Boskovic Institute, 10000 Zagreb, Croatia*

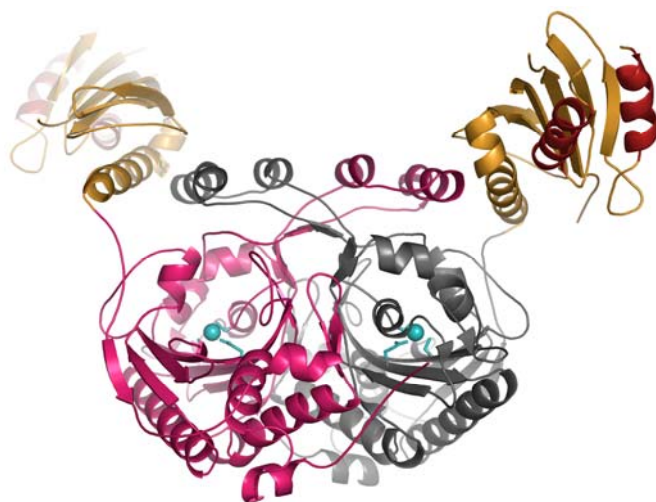
Točnost sinteze proteina ovisi o isparvnom povezivanju amino kiseline i pripadne tRNA molekule. Stvaranje navedene kovalentne veze jest enzimska reakcija, katalizirana aminoacil-tRNA-sintetazama (aaRS). AaRS čine porodicu od 20 različitih enzima, od kojih je svaki specifičan za jednu od 20 standardnih aminokiselina. Porodica se dijeli na dva razreda, svaki sa po 10 članova, koji se razlikuju po strukturi i karakterističnim motivima katalitičke domene. Reakcija aminoaciliranja odvija se u dva koraka. U prvom koraku dolazi do stvaranja veze između aminokiseline i molekule ATP, te do nastanka aminoacil-adenilata. Aminoacil-adenilat je aktivirani intermedijer reakcije, te u drugom koraku aminokiselina biva prenesena na 3'-kraj odgovarajuće molekule tRNA.

Obzirom na ključnu ulogu koju ovi enzimi imaju u procesu translacije genetičke informacije, dugo se smatralo da će primarni aminokiselinski slijed kao i tercijska struktura pojedine sintetaze specifične za određenu aminokiselinu biti evolucijski očuvani. Međutim, sekvenciranjem prvog arhealnog genoma, *Methanococcus janaschii* 1996. g., otkrivene su značajne razlike u primanoj sekvenci pojedinih sintetaza. Daljnjom akumulacijom primarnih sekvenci iz brojnih projekata sekvenciranja genoma, postalo je jasno da je kompleksnost ove porodice enzima mnogo veća no što se smatralo. U pravilu, sintetaze arhealne i eukariotske domene života čine skupinu sintetaza eukariotskog tipa, a drugu skupinu, sintetaze prokariotskog tipa, čine enzimi prokariotske domene života, kojima pripadaju i mitohondrijske sintetaze.

Međutim, postoje iznimke i ovom pravilu što je vidljivo kod seril-tRNA-sintetaza (SerRS). Jednu skupinu SerRS čine enzimi prisutni samo u pojedinim metanogenim arhejama, dok drugoj skupini pripadaju SerRS svih ostalih organizama. *Methanosarcina barkeri* seril-tRNA-sintetaza (Mb-SerRS), kao i ostale atipične SerRS metanogenih arheja, posjeduje dužu N-terminalnu domenu izrazito niske

homologije aminokiselinskog slijeda s ostalim SerRS. Osim toga, za ove sintetaze karakteristična je i delecija unutar očuvanog motiva 2 koji gradi aktivno mjesto.

U svrhu razumijevanja mehanizma reakcije aminoaciliranja kod metanogenih sintetaza s izmjenjenim aktivnim mjestom, kao i stvaranja interakcija između molekule tRNA i N-terminalne domene određena je kristalna struktura Mb-SerRS. Struktura atipične metanogene SerRS prikazana je na slici 1.



Slika 1.: Struktura Mb-SerRS: katalitička domena jedne podjedinice je prikazana ružičastom, a drugoe sivom bojom. tRNA-vezna domena oba monomera prikazana je žutom, a uzvojnice za koje se smatra da stvaraju interakcije s molekulom tRNA crvenom bojom. Atom cinka, kao i aminokiseline koje ga koordiniraju su u svijetlo plavoj boji.

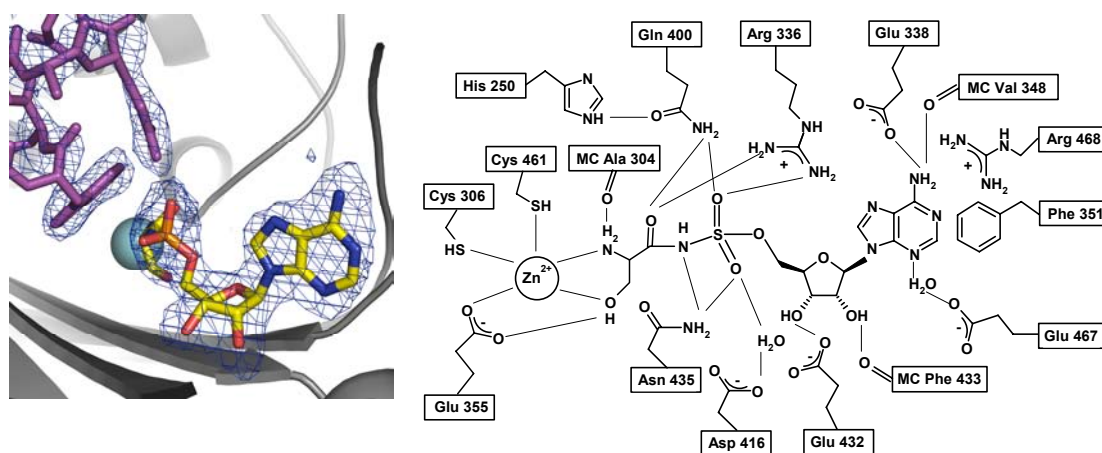
Mb-SerRS je homodimerni protein. Monomer je građen od dvije domene: C-terminalne katalitičke domene i N-terminalne tRNA vezne domene. Sve aaRS koje pripadaju razredu II karakterizira slična struktura katalitičke domene: osam lanaca gradi β -nabranu ploču omeđenu uzvojnica. Zanimljivo, atipična SerRS metanogene arheje posjeduje jedinstvenu inserciju unutar katalitičke domene. Ova, 30 aminokiselina duga insercija ima uređenu sekundarnu strukturu uzvojnica-omča-uzvojnica (helix-loop-helix, HLH). Unutar dimera SerRS, HLH jednog monomera stvara interakcije s katalitičkom i tRNA-veznom domenom drugog monomera. Pozicija motiva HLH, kao i brojne vodikove veze između uzvojnice tog motiva i uzvojnice N-terminalne domene govore o važnosti koju motiv HLH ima u prostornom usmjeravanju i pozicioniranju N-terminalne domene. N-terminalna domena bitna je za

stvaranje interakcija s tRNA i usmjeravanje 3'-kraja molekule tRNA u aktivno mjesto.

Rješavanjem ove strukture otkriven je ion cinka u aktivnom mjestu. Ioni metala unutar proteinskih molekula mogu posjedovati bilo katalitičku bilo strukturnu ulogu. S obzirom da je ion cinka otkriven u aktivnom mjestu, postojala je indicacija da bi reakcija prepoznavanja supstrata i aktivacije serina unutar aktivnog mjesta mogla biti drugačija u odnosu na SerRS prokariotskog tipa, iako oba tipa SerRS imaju istu strukturnu građu C-terminalne domene.

Da bismo ispitali tu pretpostavku, odnosno da bismo razumjeli ulogu cinka unutar aktivnog mjesta, riješili smo strukturu enzima u kompleksu sa: serinom, ATP molekulom, te stabilnim analogom seril-adenilata, 5'-O-(N-(L-seril)sulfamoil)adenozinom.

Iz riješenih struktura vidi se da je ion cinka, koordiniran aminokiselinama Cys 306, Cys 461 and Glu 355, direktno uključen u vezanje serina, stvaranjem interakcija s njegovom amino i pobočnom hidroksilnom skupinom. Bez prisustva serina ili analoga seril-adenilata omča koja uključuje aminokiseline 394-410 nema vidljivu elektronsku gustoću. Nakon vezivanja aminokiseline u aktivno mjesto dolazi do stvaranja interakcija između hidroksilne skupine serina i Gln400, te omča poprima uređenu strukturu.

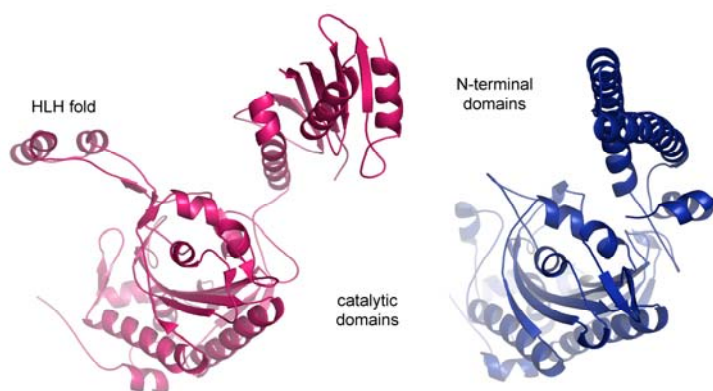


Slika 2A.: Omit mapa elektronske gustoće kompleksa Mb-SerRS s analogom seril-adenilata vezanim u aktivno mjesto. Protein je prikazan sivo, omča koja postaje uređena nakon vezivanja serina ljubičasto, ion cinka svijetlo plavo, a seril-adenilat analog je prikazan kao štapičastim modelom.

Slika 2B: Prikaz interakcija aminokiselina aktivnog mjesta i analoga seril-adenilata.

Uloga i važnost cinka je potvrđena i biokemijskim eksperimentima. Mutacijom bilo koje od tri aminokiseline koje koordiniraju cink enzim potpuno gubi aktivnost. Prema tome, SerRS metanogenog tipa posjeduju, za razliku od sintetaza bakterijskog tipa, ion cink u aktivnom mjestu i bitno drugačiji mehanizam selekcije pripadne aminokiseline.

Za razliku od N-terminalne domene bakterijske SerRS, koja je građena od dvije duge uzvojnice, N-terminalna domena Mb-SerRS ima kompaktnu, globularnu strukturu građenu od petolančane beta nabrane ploče, omeđene sa četiri uzvojnice. Prema tome, atipične serRS metanogenih arheja posjeduju novu domenu za vezivanje tRNA. Slična domena nije detektirana ni u jednoj drugoj aaRS.



Slika 3: Usporedba SerRS-monomera metanogene arheje (ružičasto) i bakterijskog predstavnika (plavo).

Važnost pojedinih aminokiselina N-terminalne domene u stvaranju interakcija s pripadnom molekulom tRNA istražiti će se biokemijskom analizom mutiranih Mb-SerRS.