

Õppevahend: Molekulaarbioloogia üldkursuse lühikonspekt
 Põhiline õpik on B. Lewin "Genes" V ja VI väljaanne, edasises tekstis on viiteid Genes VI joonistele (kui pole eraldi märgitud) ja üksikutel teemadel detailsematele materjalidele. Kursiivis on esitatud lõigud, mis on mõeldud täindavaks lugemiseks aga ei ole "kohustuslikud".

Sissejuhatus

Molekulaarbioloogia on termin, mis võeti kasutusele selle sajandi teisel poolel peale esimeste makromolekulide ruumilise struktuuri kindlakstegemist. Esialgu tähistaski see termin just struktuurset bioloogiat molekulaarsel tasemel. Seega on molekulaarbioloogia oma algses tähenduses keemia ja füüsika meetodeid kasutav bioloogia osa, mis tegeleb bioloogiliste makromolekulide ruumilise struktuuri ja struktuuri ning funktsiooni vaheliste seoste kindlakstegemisega. Hiljem, kui sama teaduse piirid on ähmastunud seoses teadmiste laienemisega ja uute probleemide kerkimisega, on kasutusele võetud termin - molekulaargeneetika. Sisulist vahet nende kahe termini vahele ei ole. Molekulaarbioloogia (või molekulaargeneetika) tegeleb päriliku informatsiooni kodeerimise, säilitamise ja ülekande mehhanismide uurimisega, aga samuti päriliku informatsiooni realiseerumise molekulaarsete mehhanismidega st. kuidas geenides sisalduv informatsioon määrab elusorganismide ehituse ja nende funktsioneerimise. Seejuures ongi molekulaarbioloogia üks keskseid probleeme füüsikalis-keemiliste struktuuride ja biokeemilis-füsioloogiliste funktsioonide vastavuse uurimine. Molekulaarbioloogia sündi on kirjeldanud J. Watson oma raamatus "Double helix" (e. k. Kaksikspiraal, "Loomingu" Raamatukogu, 1972). DNA on ilus näide selle kohta kuidas makromolekuli struktuuri tundmaõppimine lõi eelduse pärilike protsesside - geneetilise informatsiooni säilitamise ja paljundamise kindlakstegemiseks. Just DNA komemõõtmelise struktuuri kindlakstegemine pani aluse molekulaarbioloogiale.

1. Molekulaarbioloogia dimensioon

Molekulaarbioloogia on suures osas struktuurne teadus, mis tegeleb bioloogiliste makromolekulide ja nende funktsionaalsete komplekside struktuuriga ja uurib nende struktuuride tekke füüsikalis-keemilisi aluseid. See osa molekulaarbioloogiast on analoogiline anatoomiale, ainult et molekulaarbioloogia tegeleb molekulide ehitusega ja seega mikromaailmaga. Kovalentse keemilise sideme pikkus on keskmiselt 1,4 Å (ongströmi, 1 Å = 10⁻¹⁰ meetrit). Sellest piirist väiksemate suurustega molekulaarbioloogia reeglina ei tegele. Suuremad makromolekulide kompleksid on kuni 300 Å läbimõõduga, mis on enamasti molekulaarbioloogia ülemine piir. Suuremate struktuuridega tegeleb juba rakubioloogia.

Järelikult on **molekulaarbioloogia dimensioon ühest kuni mõnesaja ongströmini ehk 10⁻¹⁰ - 3·10⁻⁸ meetrit.**

Mõned näited:

kaheahelaline DNA ja kaheahelaline RNA, biheeliksi (kaksikspiraali) diameeter - 20 Å
 keskmine globulaarne valk, molekulmassiga 50 000 daltonit, diameeter - 50 Å

bakteriaalne RNA polümeraas (koosneb neljast globulaarsest valgust) molekulmassiga 500 000 daltonit, dimensioonid 90x90x160 Å

nukleosoom (DNA valkudega pakitud struktuuriüksus kromosoomides), molekulmassiga 300 000 daltonit, dimensioonid 60x110x110 Å

bakteriaalne ribosoom, molekulmass 2,5 megadaltonit, dimensioonid 200x200x230 Å Rakubioloogia väiksemad uurimisobjektid on näiteks tuumapoorid, molekulmassiga 100 megadaltonit ja dimensioonidega 120x120x75 nm (1 nm = 10 Å).

Teine osa molekulaarbioloogiast sarnaneb füsioloogiale ja tegeleb vastavalt molekulide funktsioonidega ja omavaheliste seostega. Nii nagu füsioloogiat ei saa mõista ilma anatoomiat tundmata, ei saa ka molekulide funktsioone uurida ilma nende struktuuri tundmata. Molekulaarbioloogia põhiline ülesanne ongi tundma õppida molekulide “anatoomiat” ja “füsioloogiat” ehk nende struktuure ja funktsioone ja eriti struktuuri ning funktsiooni vahelisi seoseid.

2. Molekulaarbioloogia põhidogma

Geneetilise informatsiooni ülekande suunda DNA ↔ RNA → valk nimetatakse oma keskse tähtsuse tõttu molekulaarbioloogia põhidogmaks. Kuni 1969. aastani oli molekulaarbioloogia põhidogma DNA → RNA → valk. 1969. aastal avastati uus ensüüm - RNA-sõltuv DNA polümeraas ehk pöördtranskriptaas ehk revertaas, mis katalüüsib DNA sünteesi RNA matriitsilt ja seega sai selgeks, et DNA'd sünteesitakse nii DNA kui RNA alusel. Revertaas leiti esialgu imetajate RNA viirustest (retroviirustestest), aga hiljem selgus, et see ensüüm on looduses väga laialt levinud nii eu- kui prokariootides.

Geneetilise informatsiooni ülekande kolm põhilist protsessi on:

1. Replikatsioon - päriliku materjali (mis võib olla nii DNA kui RNA) kahekordistumine. Elusorganismide geneetiline informatsioon on säilitatud kaheaheelalise DNA kujul. Erandi moodustavad mõned RNA viirused, mille geneetilise materjali kandjaks on RNA. RNA viiruste puhul on replikatsioon RNA kahekordistumine. Ülejäänud organismidel on replikatsioon DNA kahekordistumine. Replikatsioon on DNA süntees. DNA süntees toimub liskas replikatsioonile veel **rekombinatsiooni** ja **reparatsiooni** käigus. Teiselt poolt on replikatsioon laiem mõiste kui DNA süntees hõlmates ka **RNA praimeri** sünteesi, DNA ja kromosoomi struktuuri muutusi ja replikatsiooni regulatsiooni. DNA sünteesi viib läbi ensüüm - DNA-sõltuv DNA polümeraas, kusjuures substraatideks on desoksü-nukleosiid 5'-trifosfaadid.

2. Transkriptsioon - RNA süntees. Transkriptsioon tähendab mahakirjutamist ja tähistab molekulaarbioloogias RNA sünteesi DNA matriitsi alusel. RNA sünteesi regulatsioon on geeni aktiivsuse regulatsiooni põhiline tase. Seega on transkriptsiooni regulatsioon väga oluline makromolekulide sünteesi kontrollmehhanism. Transkriptsiooni viib läbi DNA-sõltuv RNA polümeraas. RNA polümeraase on väga palju erinevaid tüüpe. Eukariootides on kolm erinevat RNA polümeraasi, mis sünteesivad erinevaid RNA molekule. RNA sünteesil on substraatideks (ribo-) nukleosiid 5'-trifosfaatidest. Sünteesitud RNA ahel vastab üks-üheselt temaga antiparalleelsele DNA matriitsahelale komplementaarsusprintsipi alusel. RNA järjestusega identset DNA ahelat nimetatakse **kodeerivaks ahelaks**. RNA sünteesi käigus toimub DNA ahelate lahtiharutamine. Algne DNA struktuur taastub peale transkriptsiooni lõppu. Transkriptsiooniga on seotud **RNA protsessing** ja **modifitseerimine**.

3. Translatsioon - valgu biosüntees. Translatsioon tähendab tõlkimist. Molekulaarbioloogias tähendab translatsioon RNA (seega ka DNA) nukleotiidsel järjestusel tõlkimist valkude aminohappeliseks järjestuseks. Valkude sünteesiks vajalikku geneetilist informatsiooni kannab **mRNA** (matriits- ehk informatsiooniline-RNA). Valgu biosünteesi viib läbi **ribosoom** - RNA'st ja valkudest koosnev organoid.

Aminohapped seatakse ribosoomi abil vastavusse mRNA's sisalduva geneetilise informatsiooniga tRNA (transport-RNA) vahendusel. Aminohappe sidumine vastava spetsiifilise tRNA molekuliga toimub ensüümide - aminoatsüül-tRNA süntetaaside ehk aminoatsüül-tRNA liigaaside (ARS e. ARL) vahendusel. Aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) süntees on valgu biosünteesi esimene, preribosomaalne etapp. Ribosoomides, kus toimub valgusünteesi teine ehk ribosomaalne etapp, seatakse vastavusse mRNA's paiknev kolmest järjestikusest nukleotiidist koosnev koodon tRNA's sisalduva antikoodoniga. Ribosoom sünteesib tRNA küljes olevate aminohapete vahele peptiidsideme. Kasvav peptiidahel on sünteesi käigus tRNA'ga kovalentselt seotud. Valgu biosünteesil osalevad veel paljud valgulised faktorid, ATP ja GTP ning veel mitmed molekulid, mida käsitleme valgusünteesi peatükis. Valkude ruumilise struktuuri moodustumine toimub nii translatsiooni käigus kui peale seda. Valgud viiakse organismis vajalikesse kohtadesse *valkude transpordi* teel.

Geen - pärilikkuse ühik. DNA lõik, mis kodeerib eralduvat produkti

RNA genoomide puhul RNA lõik.

Eraldub produkt võib olla nii RNA kui valk. Algselt sünteesitakse valkude puhul mRNA, mis aga ei ole info ülekande mõttes lõplik produkt. mRNA alusel sünteesitakse valk.

DNA kodeerib eelkõige iseennast, aga see ei ole eralduv produkt, kuna jääb DNA poolkonservatiivse replikatsiooni tõttu matriitsahelaga seotuks.

Geenid on kodeeritud ühe ahela poolt ja vastasahel kodeerimisel ei osale. Pikema DNA lõigu ulatuses võivad siiski mõlemad ahelad kodeerida, osa gene paikneb ühel ja osa teisel ahelal.

Geenid on DNA nukleotiidsed järjestused ja koosnevad mitmetest osadest:

- regulaatorpiirkonnad, mis paiknevad tavaliselt geeni alguses, aga võivad asetseda ka geeni sees või osaliselt väljaspool geeni, geenist endast kaugel. Regulaatoralade hulka kuuluvad ka terminaatorjärjestused, mis määravad RNA sünteesi lõpetamise.

- kodeeriva osa, millelt sünteesitakse RNA.

- nn., struktuurne osa mis vastab produktis sisalduvale pärilikule infole. Kuna peale RNA sünteesi läbib RNA protsessingu, mille käigus osa järjestustest eemaldatakse, siis ei satu kogu DNA kodeeriv osa produkti.

Prokarüootide geenid on tavaliselt pidevad, DNA järjestuse struktuurne osa paikneb pideva järjestusena ja kopeeritakse produkti. Prokarüootsed geenid on enamasti organiseeritud operonidesse, milles on mitut produkti kodeerivad järjestused ühise regulaatori kontrolli all.

Eukariüootide geenid on enamasti katkendlikud, sisaldavad introne ja eksone. Geeni primaarne produkt mRNA, läbib splaissingu, mille käigus osa RNA järjestusest eemaldatakse. Intronid eemaldatakse. Eksonid jäävad alles ja nende ühendamise (splaissingu) tulemusel tekib küps mRNA. (Inton-ekson skeem)

Ka küpses mRNA's on mittekodeerivad järjestused, nn liider ja trailer vastavalt mRNA alguses (5' osas) ja lõpus (3' osas).

Ka ühe geeni intronid võivad kodeerida produkte, nn. intron kodeeritud produktid. Siia kuuluvad mitmed väikesed RNA molekulid (snoRNA).

Imetajate geenides on paljude eksonite ühendamine võimalik mitmel erineval viisil, mõned intronid on võimalik välja jätta. See protsess on alternatiivne splaissing, mille

puhul on ühel geenil mitu võimalikku produkti. Seega geenid ei ole alati ühetähenduslikud.

Funktsionaalselt on geenid struktuursed ja regulaatorgeenid: struktuurgeenid kodeerivad valke ja RNA molekule, mis viivad läbi rakkudes eluprotsesse. Regulaatorgeenide poolt kodeeritud produktid, mis võivad samuti olla nii RNA kui valgulised, reguleerivad teiste geenide avaldumist.

Eriline geenide rühm on nn. koduhoidjad geenid (housekeeping), mis avalduvad hulkraksetes organismides igas rakus ja ainuraksetes organismides avalduvad nad konstitutiivselt st. pidevalt (kui organism ei ole stressis ja geenid represseritud). Koduhoijatel geenidel on eriline struktuur, nende 5' osas paikneb oligopürimidiin järjestus nn. TOP geenid. Just TOP geenide intronites on sageli veel teisigi kodeerivaid järjestusi, mis samuti kuuluvad koduhoidjate geenide hulka. See on omamoodi geenide kattumine, kus informatsioon küll füüsiliselt ei kattu. Siiski on mõlema geeni produktid reguleeritud ühise kontrolljärjestuse poolt.

Geenide kattumine esineb väga ulatuslikult prokariootides, esineb nii mRNA tasemel geeni kattumist (siin on oluline lugemisraam, mida käsitleme lähemalt geneetilise koodi juures) kui DNA tasemel kattumist, mis viib erinevate mRNA molekulide sünteesile. Eriti oluline on geenide kattumine viiruste juures (parasiteerivad molekulid aga siiski mikro-organismid).

DNA järjestuste võrdlemine:

4st nukleotiidist koosnevate DNA järjestuste võrdlemisel on igas positsioonis iga nukleotiidi formaalne tõenäosus 25% ja seega on minimaalne kahe järjestuse vaheline homoloogia st. homoloogia puudumine 25%. Järjestuse homoloogia alusel jagatakse geenid perekondadesse ja superperekondadesse.

Geenid jagatakse järjestuse ja funktsiooni sarnasuse alusel Homoloogideks - järjestus homoloogiline ja funktsioon sarnane, paraloogideks - järjestus homoloogiline, funktsioon erinev ja ortoloogideks.

Tuleb teha vahet DNA homoloogia geeni homoloogia vahel.

Tüüpiline paraloogsete geenide näide on pseudogeenid, mis moodustavad suure osa hulkraksete genoomidest.

Geenide võrdlemisel on oluline osa mitte kogu järjestuse globaalsel homoloogial vaid lõikude leidmisel, mis on suure homoloogiaga. Eriti olulised on sellised kõrge homoloogiaga lõigud valgu geenide võrdlemisel. Valkudes on järjestuse motiivid, perekondade piires konserveerunud järjestuse elemendid, mis sageli koosnevad lühikestest lõikudest, aga need lõigud peavad olema kindals järjestuses. Näiteks DEAD motiiv on omane RNA (ja vahel ka DNA helikaasidele). Järjestuse võrdlemise alusel on võimalik tundmatu funktsiooniga geenile ennustada tema produkti võimalikku funktsiooni. Siit tuleneb pööratud geneetika. Tavaline geneetika otsib mutatsioone funktsiooni muutuse kaudu, siis pööratud geneetika otsib funktsiooni muutust järjestuse muutmise tulemusel. Teiselt poolt otsib ta funktsioone olemasolevatele järjestustele. DNA järjestuste võrdlemine on aluseks molekulaarsele evoltusiooniteooriale. Näiteks tuleb tuua eksonid, mis ei varieeru kuigi suures ulatuses ja intronid, mis on suure järjestuse varieeruvusega. Oletatavasti hoiab eksonite järjestusi varieerumast looduslik valik.

I Bioloogiliste makromolekulide struktuur ja seda mõjutavad jõud

Geneetiliselt kodeeritud makromolekulid (nukleiinhapped ja valgud) on polümeerid, mis koosnevad suhteliselt väikesest arvust monomeeridest. Monomeerid sisaldavad identset osa, mis omavahel ühendatuna moodustavad polümeeri selgroo. Viimase küljest hargnevad monomeeride külghelad. Geneetiliselt on kodeeritud biopolümeeride monomeeride järjestus ehk primaarstruktuur. Samast järjestusest võib moodustuda mitu erinevat ruumilist struktuuri (sekundaar- ja tertsiaarstruktuuri tasemel). Praeguste teadmiste juures ei ole veel võimalik täpselt ennustada valkude (aga ka RNA) ruumilist struktuuri tuginedes üksnes nende primaarstruktuurile. Mitme valgu puhul on ka teada, et nad võivad looduses eksisteerida mitmes erinevas ruumilise struktuuri vormis (kuigi primaarstruktuur on sama).

I 1. Valkude struktuur

Valgud koosnevad 20+1 kodeeritud aminohappest. +1 tähistab siin selenotsüsteiini (Sec), mis esineb vaid vähestes valkudes ja on kodeeritus UGA koodoniga, mis tavaliselt on stop-koodon (vt. valgusünteesi peatükk). Lisaks kodeeritud aminohapetele esinevad valkudes veel mitmed aminohapped, mis lisatakse peale valguahela sünteesi ribosoomides (post-translatsioonilised modifikatsioonid). Siia kuuluvad modifitseeritud aminohapped nagu hüdroksüproliin ja atsetüleeritud aminohapped. Paljude valkudega on ühendatud suhkrujäägid (vt. valkude glükosüleerimine) või fosforhappe jäägid (valkude fosforüleerimine). Aminohapped on omavahel ühendatud peptiidsideme abil. Peptiidside on amiidsideme vorm, mis moodustub α -aminohapete vahel. α -aminohapetel on amino- ja karboksüülrühm ühendatud sama süsiniku aatomi (α -süsiniku) külge. Valguahel moodustub α -süsinike ja peptiidsidemete abil, kus α -süsinike küljest hargnevad aminohapete külghelad (joon 1.7). Valguahela otsad on erinevad - ahela alguses (otsas millest valgusüntees algab) on valgu selgrool aminogrupp ($-\text{NH}_2$) ja ahela lõpus on karboksüülrühm ($-\text{COOH}$). Vastavalt nimetatakse valguahela algust N-terminuseks e. amino-otsaks ja lõppu C-terminuseks e. karboksüül-otsaks. Aminohapped on erinevate keemiliste omadustega erinevate külghelate tõttu. Erinevad aminohapped seonduvad omavahel lisaks peptiidsidemetele, mis moodustab valgu selgroo, ka erinevate keemiliste sidemete varal, mille abil moodustub valgu ruumiline struktuur. Eriline tähtsus on siinjuures vesiniksidemetel (H - sidemed). Peptiidsidemes on olemas nii H - sideme doonor kui aktseptor, mis osalevad valgu sekundaarstruktuuri moodustamisel. Väga olulised valkude ruumilise struktuuri tekkel on tsüsteiinjääkidel, mis moodustavad stabiilseid disulfiidsidemeid ja nende abil hoitakse valgu ruumiline struktuur stabiilsena.

Aminohapped jaotuvad mitmesse klassi vastaval oma keemilisele koostisele ja omadustele. Siinkohal nimetan ainult klassid vastavalt laengule, mis on olulised valkude ruumilise struktuuri tekkel:

Laetud aminohapped e. hüdrofiilsed aminohapped, mis jagunevad omakorda *happelisteks ja aluselisteks* vastavalt külghela laengule. Laetud aminohapped osalevad valgu seondumisel teiste molekulidega ja nad on enamasti valgu ruumilises struktuuris väljaspool.

Apolaarsed e. hüdrofoobsed aminohapped, mis ei sisalda laetud rühmi ja on seega hüdrofoobsed e. vett tõrjuvad. Need aminohapped on sageli valgu ruumilises struktuuris sisemuses, olles üksteise läheduses ja tõrjudes vett eemale.

Valmis valkudele lisatakse sageli mitmesuguseid rühmi (sünteesijärgsed modifikatsioonid), mille tulemusena tekivad modifitseeritud e. mittekodeeritud

aminohapped. Olulisemad modifikatsioonid on fosforüleerimine (fosforhappe jäägi lisamine), atsetüleerimine (NH_2 rühmale aädikhappe jäägi lisamine amiidsideme abil, esineb sageli N-terminaalselt ja lüsiinidel), metüleerimine ja glükosüleerimine (suhkrujääkide lisamine OH ja NH_2 rühmadele). Lisaks on veel mitmeid post-translatsioonilisi (sünteesijärgseid) modifikatsioone, näiteks proliini hüdroksüleerimine, mille tagajärjel tekib hüdroksü-proliin (esineb suure sagedusega kollageenis). Modifitseeritud aminohapped esinevad enamasti valgu pinnal. Eriti sageli on modifitseeritud need valgud, mis on raku pinnal või lahustuvad rakkudevahelises ruumis st. on kättesaadavad teistele molekulidele. Modifikatsioonid kaitsevad valke lagundamise eest, osalevad rakusiseste signaalide ülekandel (vt. signaali ülekanne ja rakutsükli regulatsioon), moodustavad raku pinnamarkereid ja on olulised valkude aktiivsuse regulatsioonil.

Valkude ruumiline struktuur sõltub ümbritsevast keskkonnast. Vee keskkonnas surutakse hüdrofoobsed aminohapped valgu südamikku ja väljapoole jäävad hüdrofiilsed (laetud) aminohapped. Vee molekulid on omavahel seotud vesiniksidemetega. Nende sidemete eluiga on lühike (üks side püsib ligikaudu 10^{-9} sek.). Sellegipoolest on suurem osa vee molekule igal ajahetkel omavahel vesiniksidemetega seotud. Vee keskkonna struktuur (vesiniksidemete moodustamise võime) suunab valkude struktuuri teket ja püsimist. **Valgu sekundaarstruktuur** moodustub samuti vesiniksidemete varal. Sekundaarstruktuuri moodustavad H-sidemed tekivad valgu selgroo peptiidsideamino- ja karboksüülrühmade vahel. Valkude sekundaarstruktuuri põhilised elemendid on α -heeliks ja β -kiht (lamepoogen) vt. joonised 1.18 ja 1.19

Aminohapete külghelate omavahelise seondumise tulemusena tekib **valkude tertsaarstruktuur**. Tertsaarne struktuur on igale valgule spetsiifiline. Kindel ruumiline struktuur on valkude bioloogilise funktsioneerimise alus. Kuna valgud koosnevad paljudest erinevatest aminohapetest, siis on ka nende ruumiline struktuur väga mitmekesine. Eraldiseisvaid ruumilise struktuuri elemente nimetatakse **struktuuri motiivideks**. Ruumilise struktuuri motiivid sisaldavad sageli sarnaseid aminohappe järjestusi - järjestuse ehk primaarstruktuuri motiive. Ühesuguste biokeemiliste funktsioonide läbiviimine põhineb enamasti sarnasel ruumilise struktuuri motiividel. Näiteks sisaldavad kõik tuntud guanosiin-nukleotiidi siduvad valgud 4-6 antiparallelselt β -kihist ja 1-3 nendega risti olevast α -heeliksist koosnevast domäänist, mis on G-nukleotiidi sidumise motiiv. See motiiv moodustab valgu ühe domääni. **Valgu struktuurne domään** on suhteliselt iseseisva struktuuri ja funktsiooniga üksus, mis moodustub pidevast järjestusest. Valgu struktuursed domäänid kannavad ka kindlaid funktsioone. Struktuurse domääni ja struktuurse motiivi kattumine on pigem erand kui reegel. Motiiv on üldjuhul domääni osa. Näiteks võib tuua kahe-ahelalise nukleiinhappega seondumise motiivid: heeliks-ling-heelis (helix-loop-helix), heeliks pööre-heeliks (helix-turn-helix), positiivselt laetud α -heeliks, Zn-sõrm ja mitmed teised. Need on kõik erinevad struktuursed motiivid, mis aga ei moodusta iseseisvaid domääne.

Biokeemilisi funktsioone viivad läbi enamasti mitmest polüpeptiidist koosnevad valgu kompleksid. Enamus ensüüme koosnevad kas mitmest subühikust või esinevad multiensüüm-kompleksidena. Sellised funktsionaalsed kompleksid tekivad valkude omavahelise seondumise tulemusena ja seda struktuuritasandit nimetatakse ka valgu **kvaternaarseks struktuuriks**. Valkude omavaheline seondumine põhineb aminohapete külghelate interaktsioonidel, nii nagu valgu domäänide omavaheline seonduminegi.

Valkude ruumilist struktuuri on uuritud suure eduga juba ligi pool sajandit. Väga paljude (üle 1000) valkude ruumiline struktuur on teada atomaarsel tasemel kasutades kristalliseeritud valkude uurimist röntgenkiirte hajumise ja lahustunud valkude analüüsi tuumamagnet resonantsi abil. Need andmed võimaldavad mõista valkude struktuuri tagavaid jõude ja struktuurse dünaamika ning struktuuri stabiilsust määravaid tegureid. Samas on aga valgu ruumilise struktuuri ennustamine primaarstruktuuri järgi jäänud suurel määral fenomenoloogilisele tasemele. Kõige tulemuslikum meetod valkude ruumilise struktuuri ennustamiseks primaarstruktuuri alusel põhineb primaarstruktuuri homoloogia otsingul mõne juba tuntud ruumilise struktuuriga valguga. Kui primaarstruktuurid on piisavalt homoloogsed, siis võib suure tõenäosusega oletada, et ka ruumilised struktuurid on sarnased. Valkude ruumilise struktuuri ennustamine on väga oluline probleem nende omaduste mõistmisel ja seega bioloogilistest protsessidest arusaamisel. Tänapäeval on küllalt lihtne kindlaks teha DNA järjestust. Terve inimese genoomi järjestuse määramine on mõne lähema aasta küsimus. Seega on peagi vähemalt teoreetiliselt võimalik ennustada kõigi inimorganismis leiduvate valkude primaarstruktuuri. Kuigi ka see probleem võib mõnel juhul osutuda väga komplitseerituks nagu edaspidi näeme, saab enamuse valkude järjestust ennustada. Valkude omaduste ja funktsioonide mõistmiseks oleks aga vajalik ennustada valkude ruumilist struktuuri. Ruumilise struktuuri ennustamine on võimalik aga ainult neil valkudel, mille homoloogi jaoks on see juba teada. Veelgi keerulisem probleem on valgu funktsiooni ennustamine järjestuse alusel. See on küsimus struktuuri ja funktsiooni vahekorra. Valkude puhul oleme paraku struktuuri ja funktsiooni seoste mõistmisel üksikute valkude kirjeldamise tasemel. Küsimusele, millised on valkude struktuuri ja funktsiooni vahelise sõltuvuse üldised printsiibid ja kas neid üldse olemas on, ei ole praeguse teadmiste taseme juures veel võimalik täpselt vastata. On küll selge, et valgulistel ensüümidel on eraldi struktuurne domään ensümaatilise reaktsiooni läbiviimiseks - aktiivtsenter. Teades ainult valgu aminohappelist järjestust on aktiivtsentri asukohta valgus ja selle poolt katalüüsivat reaktsiooni seni võimalik ennustada vaid homoloogia põhjal.

I 1.a. Valgu struktuuri tekkimine sünteesi käigus

Valgud sünteesitakse vastavalt mRNA programmile ribosoomides. Enamusel valkudest tekib funktsionaalne struktuur juba sünteesi käigus ja see protsess toimub väga kiiresti (alla 1 min.). Siinjuures on oluline millises keskkonnas toimub valgu süntees. Paljud valgud sünteesitaks membraanseoseliste ribosoomide poolt nii, et valk satub peale sünteesi kohe membraani ja sel juhul toimub valgu struktuuri teke (järjestuse voltumine) membraanis. Membraanis on tegemist hüdrofoobse keskkonnaga, mis aitab tekitada spetsiifilisel valgu konformatsioonil. Teised valgud aga sünteesitakse vabade ribosoomide poolt ja nad satuvad peale sünteesi tsütoplasmasse vee keskkonda (hüdrofiilne keskkond), mis ei jäta oma mõju avaldamata valgu voltumisele ja sel juhul tekib teistsugune valgu ruumiline struktuur. Valkude struktuuri teke ei toimu siiski ainult keskkonna toimel n.ö. iseenese tarkusest. Valgu struktuuri teket sünteesi käigus ja selle järgselt suunavad erilised valgud - molekulaarsed '**chaperonid**' e. '**lapsehoidjad**'. Need valgud võtavad sünteesitava polüpeptiid juba ribosoomis oma rüppe ja aitavad valgu struktuuri tekkimisele kaasa või takistavad lõpliku ruumilise struktuuri teket enne kui valk on viidud oma lõplikule kohale rakus. Chaperonid suunavad enamuse valkude voltumist sünteesi käigus. Mõnede (peamiselt väiksemate, alla 150 aminohappe jäägist koosnevate) valkude ruumiline struktuur tekib iseeneset sünteesi käigus ja ei vaja

lisafaktoreid. Sel juhul on kogu ruumilise struktuuri tekkeks vajalik informatsioon olemas valgu primaarstruktuuris. Üks hästi uuritud näide on ribonukleas A (RNAas A). Kui RNAas A molekul denatureerida st. lõhkuda tema ruumiline struktuur kas kuumutamise või keemiliste ainetega, siis jääb valguahela primaarstruktuur muutumatuks ja lagunevad ainult nõrgad sidemed, mis hoiavad valgu ruumilist struktuuri. Sobivates keskkonningimustes tema aktiivne konformatsioon taastub. Seda protsessi nimetatakse valgu renatureerimiseks. Mõnede valkude renatureerimiseks on vajalikud kofaktorid, valgu ligandid, mis stabiliseerivad tema ruumilist struktuuri. Sellised kofaktorid võivad olla näiteks metalli ioonid, mis moodustavad valgu struktuuris koordinatiivseid sidemeid. Renatureerimine on aeglane protsess võrreldes valgusünteesi käigus toimuva struktuuri tekkega. Renatureerumist kiirendavad mitmed ensüümid (valgu disulfiid isomeraas, peptidüül-prolüül isomeraasid), mis kiirendavad disulfiidsidemete vahetust või proliini konformatsiooni muutust. Need reaktsioonid on iseenesest väga aeglased ja vajavad seepärast kiirendamist (proliini isomerisatsioon joonisel 1.9). Valkude renatureerimist kiirendavad ka eelnimetatud molekulaarsed 'lapsehoidjad' (chaperonid). Chaperonid on väga suur molekulide klass, millest osa toimivad valgusünteesi käigus, teised osalevad valgu transpordil ja hoiavad ära lõpliku struktuuri tekke, kolmandad aga osalevad valkude renatureerimisel. Viimaste hulka kuulub Hsp 60 (heat shock protein nn. kuumaehmatuse valk) valkude perekond (bakterites GroE), mis koosneb 14st 60 kDa molekulmassiga subühikust. Hsp 60 moodustab toru, millesse siseneb denatureeritud valk, kus ta ATP hüdrolyüüsi abil lahti harutatakse ja seejärel tema aktiivne struktuur taastatakse. Kuna temperatuuri tõusuga kaasneb paljude valkude ruumilise struktuuri muutus ja seega ka füsioloogilise aktiivsuse kadu, siis on kuumaehmatuse valgud vajalikud rakkude temperatuuritaluvuse tagamiseks. Seega on valkude ruumilise struktuuri tekkimiseks mitmeid erinevaid teid: kotranslatsiooniline (valgu sünteesi käigus), lokaliseerimise sõltuv (peale transporti raku kompartementi), iseeneslik ja ümbervoltumine (molekulaarsete 'lapsehoidjate' poolt suunatud struktuuri muutus).

I 2. Nukleiinhapete struktuur

Nukleiinhapete struktuur on bioloogiliselt väga oluline. Nende struktuur on nukleiinhapete funktsioneerimise aluseks. Kuna nukleiinhapped on päriliku informatsiooni kandjad, siis on geneetilise teabe ülekande ja säilitamise mõistmiseks vaja tunda nukleiinhapete ehitust. Päriliku informatsiooni füüsikaline olemus on peidus DNA kaksheeliks.

Nukleiinhapped koosnevad **nukleotiididest** ja viimased omakorda kolmest komponendist: suhkur, lämmastikalus ja fosfaatjääk. Kaks looduslikku nukleiinhappe liiki - desoksüribo- (DNA) ja ribonukleiinhape (RNA) erinevad omavahel suhkrujäägi poolest. DNA sisaldab desoksüriboosi ja RNA riboosi. Sarnaselt valkudega koosnevad nukleiinhapped selgroost, mis on ühesuguse lüli kordus, ja külghelatest.

Nukleiinhappe selgroo moodustavad suhkrujääk ja fosfaatjääk (joonis 1.5).

Suhkrujäägid on seotud fosfaatidega fosfodietersidemete abil. Nukleiinhapete külghelateks on lämmastikalused (joonised 4.4 ja 4.5). Nukleiinhappe monomeer on nukleotiid, mis koosneb ühest suhkrujäägist, lämmastikalusest ja fosfaatjäägist (lämmastikaluseid ja fosfaatjääke võib nukleotiidis olla mitu nagu näiteks ATP või NADP). Suhkrujääk koos lämmastikalusega moodustavad **nukleosüidi**. Kuna suhkur ja fosfaat on kõigil nukleotiididel samad (suhkur võib olla kas riboos või desoksüriboos), siis nimetatakse nukleosüide ja nukleotiide lämmastikaluste järgi (vt. tabel 4.1)

Tabel 4.1

N-alus	nukleosiid	nukleotiid	nukleotiidi lühend
--------	------------	------------	--------------------

adeniin	adenosiin	adenüülhape	RNA	DNA
guaniin	guanosiin	guanüülhape	AMP	dAMP
tsütosiin	tsütidiin	tsütosüülhape	GMP	dGMP
tümiin	tümidiin	tümidüülhape	CMP	dCMP
uratsiil	uridiin	uridüülhape	UMP	dTMP

Lämmastikaluseid on kahte tüüpi: puriinid (joonis 4.5) ja pürimidiinid (4.4). Puriinid, mis koosnevad 9-aatomilisest heterotsüklist on adeniin ja guaniin. Pürimidiinid koosnevad 6-lülilisest heterotsüklist ja nende hulka kuuluvad tsütosiin, tümiin ja uratsiil.

Suhkrud riboos ja desoksüriboos kuuluvad pentooside st. 5-süsinikuliste suhkrute hulka, kusjuures 1. ja 4. süsiniku aatomid moodustavad 4' hapniku aatomi varal tsükli. Lämmastikalus on seotud alati suhkru 1. süsiniku aatomiga C-N glükosiidsideme abil (vt. joonised 4.6 ja 4.8). Kõik aatomid nii suhkrujäägis kui lämmastikalustes on nummerdatud vastavalt keemilisele nomenklatuurile. Selleks, et teha vahet suhkru ja N-aluse aatomite vahel, tähistatakse suhkru aatomeid liskas numbrile ka '-ga (C1', C2', C3', O3' jne). Fosfaatjäägiga on seotud 3' ja 5' C-aatomid. Nukleosiid trifosfaatides on fosfaadid seotud C5'-ga. Suhkru aatomite järgi nimetatakse ka nukleiinhapete otsi 5' ja 3' otsteks. Nukleiinhapped sünteesitakse 5' otsast alates 3' suunas. Seejuures lisatakse vabale 3'OH rühmale nukleotiid nii, et suhkru OH ühineb fosfaadi vesiniku aatomiga ja tekkiv vee molekul vabaneb ning 3'C ja järgmise nukleotiidi fosfaadi vahele tekib **fosfoester side**. Seega on nukleiinhappe sünteesil tegemist polükondensatsioonireaktsiooniga.

Lämmastikalused on aromaatsed ühendid st. kõik heterotsükli aatomid paiknevad ühel tasapinnal. Lämmastikalused moodustavad vesiniksidemeid, mille abil nad teineteisega seonduvad. Seda nimetatakse aluste paardumiseks.

I 2.a DNA struktuur

J. Watson ja F. Crick esitasid 1953.a. DNA ruumilise struktuuri mudeli, mis hiljem leidis eksperimetaalse tõestuse. Selle mudeli kohaselt koosneb DNA kahest nukleiinhappe ahelast moodustades kaksikspiraali läbimõõduga 20 Å, milles suhkur-fosfaat selgroog on väljaspool ja lämmastikalused asuvad heeliksi sisemuses. Lämmastikalused paarduvad omavahel vesiniksidemete abil. Paarid moodustuvad puriinide ja pürimidiinide vahel. Adeniin paardub tümiiniga kahe H-sideme ja guaniin tsütosiiniga kolme H-sideme varal. See mudel selgitab ka miks on DNA's A sisaldus võrdne T'ga ja G sisaldus C'ga (joonis 4.11). Vastavaid nukleotiidipaare nimetatakse seepärast komplementaarseteks paarideks. Teisest küljest seletab Watsoni ja Cricki mudel ka selle, et DNA on regulaarne ja ühtlase jämedusega kaksikspiraal. Ainult komplemetaarsed paarid on isostruktuursed. Selline struktuur meenutab keerdtreppi, mille astmeteks on komplemetaarsed aluspaarid ja astmed on omavahel seotud mõlemast otsast suhkur-fosfaat karakssi abil. DNA kaksikheeliks teeb ühe täispöörde 34 Å kohta. Aluspaaride vahe on 3,4 Å. Seega on ühe täispöörde kohta 10 aluspaari. DNA ahelad on kaksikheeliksis antiparalleelsed st. suhkru ja fosfaadi vahelised fosfoester sidemed on vastas-ahelates vastassuunalised (vt. joonis 4.11). Järelikult on ka ahelate otsad erinevad - ühes heeliksi otsas on esimese ahela desoksüriboosi 5' süsinik (või sellega seotud fosfaatjääk) ja teise ahela 3' süsinik ja sellega seotud OH rühm. Heeliksi teises otsas on vastas-ahela desoksüriboosi 5' süsinik ja esimese ahela 3' süsinik ja sellega seotud OH rühm. DNA kaksheeliks moodustab parempoolse vindi. Iga kaksheeliksi täispöörde kohta toimub üks kord ahelate teineteisest üleminek ehk seotumine. Seepärast on ahelate lahutamiseks vajalik et kaksheeliks teeks ümber

oma telje sama arv pöördeid kui temas on vinte. Kuna DNA ahelad on omavahel seotud nõrkade - kuigi arvukate - vesiniksidemetega lämmastikaluste vahel, on DNA ahelad omavahel lahutatavad. Temperatuuri tõstmisega on võimalik vesiniksidemed lõhkuda ja DNA ahelad dissotseerida. See protsess on pöörduv. Tuleb aga silmas pidada, et DNA ahelate paardumisel tekivad paljud struktuurid, kus ahelad on osaliselt iseendaga paardunud, mis takistab kaksikahela teket. Samuti võivad tekkida struktuurid, kus eri ahelad on küll omavahel paardunud, aga juhusliku komplementaarsuse alusel. Korrektsed kaksikahela tekkeks peavad kõik "valed" struktuurid lahti sulama ja see protsess võtab aega kuni realiseerub korrektne kaksikahel, mis on kõige stabiilsem struktuur. Selleks, et saada terves ulatuses paardunud DNA kaksikheeliks, on vaja ahelate paardumine pika aja jooksul temperatuuril, kus ahelad on osaliselt paardunud ja "valed" struktuurid ei püsi. DNA ahelate lahutamist temperatuuri toimet nimetatakse ka DNA sulamiseks. DNA sulamise iseloomustamiseks kasutatakse sulamistemperatuuri - T_m , mõistet. T_m on temperatuur, mille juures $\frac{1}{2}$ nukleiinhappe ahelates on lahti sulanud. See ei pea tähendama, et pooled ahelad on eraldi, vaid võib tähendada ka, et kõik ahelad on pooles ulatuses paardunud. Kuna G-C paaril moodustub 3 vesiniksidet A-T paari 2 vastu, siis on G-C paarid stabiilsemad ja järelikult DNA piirkonnad, mis sisaldavad rohkem G ja C nukleotiide on stabiilsemad ja sulavad kõrgemal temperatuuril. DNA kaksikahel võib eksisteerida mitmes erinevas vormis olenevalt keskkonnatingimustest (A, B, C, D ja Z vormid). Rakkudes on DNA põhiliselt B-vormis, mida iseloomustavad aluspaaride väike kalle heeliksi telje suhtes, aluspaaride asumine heeliksi keskel (teljel) ja suur ja väike vagu (külgvaates, vt. joonis 5.8). B-vormis DNA biheeliks on kõige painduvam DNA kaheaahelaline vorm, mis võib iseenesest moodustada rõnga umbes 200 aluspaari pikkuse lõigu kohta. See viimane omadus võimaldab DNA tihedat pakkimist kromosoomidesse ja **nukleosoomide** moodustumist.

RNA struktuurset omapära käsitleme edaspidi koos valgusünteesiga.

DNA kõrgemat järku struktuurid ja seda mõjutavad ensüümid
helikaasid, topoisomeraasid

II Valgu biosüntees e. geneetiline translatsioon

Nagu eespool kirjas, seisneb geneetiline translatsioon nukleiinhapetes kodeeritud geneetilise informatsiooni (nukleotiidsel järjestusel) tõlkimises valkude aminohappeliseks järjestuseks. Valgu biosüntees jaotatakse kaheks etapiks - preribosoomseks ja ribosoomseks. Esimese, väljaspool ribosoomi toimuva protsessi käigus toimub aminohappe aktiveerimine ATP'ga ja aminohappe ühendamine spetsiifilise tRNA'ga, sünteesitakse aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA). **Ribosoomides** viiakse läbi valgu biosüntees vastavalt mRNA programmile kusjuures substraadina kasutatakse aminoatsüül-tRNA'd. Selles protsessis on oluline osa adaptormolekulil - tRNA'l. Just aa-tRNA's seotakse aminohappe vastava nukleiinhappe järjestusega - antikoodoniga. Igal tRNA molekulil on oma 3-st nukleotiidist koosnev antikoodon. Nukleiinhappe järjestusest valgu järjestuseks üleminek toimub **geneetilise koodi** alusel.

IIa Geneetiline kood

Geneetiline kood tehti kindlaks selle sajandi 60-ndate esimesel poolel põhiliselt M. Nirenberg'i, Ph. Leder'i ja K. Khorona tööde tulemusena. Geneetiline kood on sõnastik, mille abil tõlgitakse nukleiinhapete järjestuses sisalduvat geneetilist informatsiooni valkude aminohappeliseks järjestuseks. Kolme nukleotiidiline järjestus (koodon) vastab ühele aminohappele. Kuna valgusünteesil on informatsiooni kandjaks RNA (mRNA), siis moodustuvad koodonid neljast erinevast nukleotiidist (A, C, G ja U). Nelja nukleotiidi kolme kaupa kombineerides saame $4^3=64$. Seega koosneb geneetilise koodi sõnastik 64' st kolmetähelisest sõnast, millele vastavad 20 erinevat aminohapet. See elu seisukohalt väga oluline sõnastik on enamuses organismides sama nn. universaalne geneetiline kood (UGK). Erandeid käsitleme allpool eraldi. Koodi universaalsust kasutatakse elu monofüleetilise päritolu argumendina, kuigi rangelt võttes näitab see ainult UGK monofüleetilist päritolu. Küsimus, kas saab rääkida elust ilma geneetilise koodita, jääb molekulaarbioloogia kursusest väjapoole. Nukleotiididest moodustunud sõnu on rohkem kui aminohappeid, seega on osa koodoneid sünonüümsed st. neil on sama tähendus ja nad kodeerivad samu aminohappeid. Lisaks aminohappeid kodeerivatele koodonitele on UGK's ka kolm stop koodonit, millele ei vasta ühtegi aminohapet, aga mida kasutatakse valgusünteesi lõpetamisel nagu punkti lause lõpus. Stop koodoneid e. terminaatoreid tunnevad ära terminatsioonifaktorid, mis osalevad valgusünteesi lõpetamisel (vt. **valgusünteesi terminatsioon**). Stop koodoneid on kutsutud ka nonsens koodoniteks, aga see ei ole täpne termin, kuna stop koodonitel on kindel tähendus. Tegelikud nonsens koodnid on need, millele ei vasta ükski aminohape, ega ka mingi muu tähendus (vt. allpool). Koodonite ja aminohapete vastavust kujutatakse tavaliselt tabelina (vt. Tabel 2 Universaalne geneetiline kood). Koodi tabelis vastab ühele aminohappele 1-6 koodonit. Geneetilise koodi mitmetähenduslikkus, ühele aminohappele mitme koodoni vastavust, nimetatakse koodi kõdumiseks. Informatsiooni kõdumine geneetilise informatsiooni käigus näitab, et nukleiinhappe järjestuse tõlkimisel valgu järjestuseks läheb osa informatsiooni kaduma - valgu järjestusest nukleiinhappe järjestuseks ei ole ühetähenduslikku tagasiteed.

Tabel 2 Universaalne geneetiline kood. Koodoni perekonnad on rasvases kirjas ja stop koodonid on punased.

1./2. täht	U	C	A	G	3.täht
U	UUU-Phe	UCU -Ser	UAU-Tyr	UGU-Cys	U
	UUC-Phe	UCC	UAC-Tyr	UGC-Cys	C
	UUA-Leu	UCA	UAA- Stop	UGA- Stop	A
	UUG-Leu	UCG	UAG- Stop	UGG-Trp	G
C	CUU-Leu	CCU-Pro	CAU-His	CGU-Arg	U
	CUC	CCC	CAC-His	CGC	C
	CUA	CCA	CAA-Gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG-Gln	CGG	G
A	AUU-Ile	ACU-Thr	AAU-Asn	AGU-Ser	U
	AUC-Ile	ACC	AAC-Asn	AGC-Ser	C
	AUA-Ile	ACA	AAA-Lys	AGA-Arg	A
	AUG-Met	ACG	AAG-Lys	AGG-Arg	G
G	GUU-Val	GCU-Ala	GAU-Asp	GGU-Gly	U
	GUC	GCC	GAC-Asp	GGC	C
	GUA	GCA	GAA-Glu	GGA	A

GUG GCG GAG-Glu GGG G

Geneetilise koodi organisatsioon ei ole juhuslik. Aminohapped on organiseeritud koodis nii, et ühele aminohappele vastavad koodonid paiknevad tabelis lähestikku. Erandid on seriin (Ser) ja arginiin (Arg), millele vastavad 6 eri koodonit. Neist 4 koodonit asuvad koos, nende koodonite 1. ja 2. täht on identsed. Ülejäänud 2 koodonit aga asuvad eraldi. Sellist koodonite rühma, mille tähendus on määratud 1. ja 2. tähe abil st. olenemata koodoni 3. positsioonist ja mis vastavad kõik ühele aminohappele, nimetatakse koodoni perekonnaks.

Erinevatel koodoni positsioonidel on erinev osakaal aminohappe määramisel. Kõige olulisem positsioon on koodoni teine täht st. keskmine positsioon. Tähtsuselt järgmine on koodoni esimene täht. Kõige väiksema tähtsusega aminohappe määramisel on koodoni kolmas täht. UGK's on 8 koodoniperekonda, st. 8 aminohappe puhul ei ole koodoni kolmas täht oluline aminohappe määramisel. Ka ülejäänud aminohapete puhul on koodoni kolmas täht väiksema tähtsusega, 7 aminohappe puhul on koodoni tähendus määratud kolmanda positsiooni puriini või pürimidiiniga. Enamasti määrab koodoni tähenduse kolmandas positsioonis olev puriin (A või G) ehk siis pürimidiin (C või U). 20st UGK's esindatud aminohappest on kolmas täht ühetähenduslik ainult kahe aminohappe puhul, metioniinil (Met) ja trüptofaanil (Trp). Neile kahele vastab vaid üks koodon kummalegi. Seejuures on nii Met kui Trp koodonitel viimane täht puriin (G). Pürimidiin koodoni kolmandas positsioonis ei mõjuta koodoni identsust, st. olenemata sellest kas kolmas täht on U või C vastab koodon ikka samale aminohappele. Koodoni kolmanda tähe mitmetäheduslikkus ehk koodi kõdumine võimaldab sama aminohappelist järjestust kodeerida erinevate nukleiinhappe järjestuste abil. Kolmanda koodoni tähe asendusi, mis ei muuda valgu aminohappelist järjestust, nimetatakse sünonüümseteks asendusteks. Viimased on suure tähtsusega geenide evolutsioonilise võrdlemise juures, aga samuti genoomi ehitusest tulenevate seaduspärasuste puhul. Erinevate koodonite kasutamine on erinevates organismirühmades erinev ja ka erinevatel geenidel erinev, aga seda vaatleme lähemalt eraldi.

Geneetilise koodi struktuur väljendub ka tRNA ehituses ja koodon-antikoodon seondumise spetsiifikas. Koodon-antikoodon interaktsioon toimub ribosoomis, kus mRNA koodonile seatakse vastavusse tRNA antikoodon. RNA ehituse geomeetriast tulenevalt on RNA A vormis kaksikheeliksis G-nukleotiidil võimalik paarduda lisaks C'le ka U'ga. Selline paardumine saab stabiilselt toimuda teatud konformatsioonilise vabaduse olemasolu korral. G-U paardumiseks vajalik struktuurne vabadus on olemas koodon-antikoodon paardumisel koodoni kolmandas positsioonis (vastab antikoodoni esimesele tähele). Koodoni kolmanda positsiooni suuremat vabadust paardumisel nimetatakse "wobble" reegliks (wobble - ingl. k. võnkuma, võbisema). Vastavalt "wobble" reeglile võib koodoni kolmandas positsioonis toimuda G-C ja G-U paardumine võrdse eduga st. nii koodoni kolmandas positsioonis kui antikoodoni esimeses positsioonis olev G võib paarduda C või U'ga. Seega suudab tRNA, mille antikoodoni 1. positsioonis on G dekodeerida (ribosoomide abil transleerida e. lülitada koodonile vastav aminohape valguahelasse) koodoneid, mille kaks esimest tähte on samad ja kolmandaks on pürimidiin (C või U), teine tRNA, mille antikoodoni esimene täht on U suudab dekodeerida koodoneid, mille kolmandas positsioonis on puriin (G või A). Siit järeldub, et iga tRNA suudab dekodeerida kahte koodonit juhul kui tema antikoodoni esimeses positsioonis on G või U. Tõepoolest, enamusel tRNA'dest ongi esimeses positsioonis kas G või U. "Wobble" reegel võimaldab organismidel tRNA'sid kokku hoida - 61 aminohappeid kodeeriva koodoni transleerimiseks kasutab enamus organisme alla 40 erineva tRNA molekuli. Paraku on siin ka erandid -

metioniinil (Met), nagu juba öeldud, on vaid üks koodon - AUG. Met-tRNA antikoodoni esimeses positsioonis on C nukleotiid, mis paardub ainult G'ga ja seega ei ole Met-tRNA võimeline transleerima AUG'le lähimat koodonit AUA, mis vastab isoleutsiinile. Teine erand on trüptofaani (Trp) tRNA, millel samuti antikoodoni esimeses positsioonis C. Siiski toimub trüptofaani lülitamine tema koodonile (UGG) lähedase, stop-koodoni (UGA) kohal suurema sagedusega kui teiste stop-koodonite kohale aminohappe lülitumine. Sellist nähtust kus koodonit transleeritakse valesti tuntakse valelugemise (miscoding, misreading ingl.k.) nime all. Koodon-antikoodon paardumist kirjeldavad "koodilugemise reeglid", mis seavad vastavusse tRNA antikoodoneis sageli esinevad modifitseeritud nukleosiidid vastavate koodonitega. Näiteks ei paardu tio-uridiin millegagi peale adenini, mitokondrites ja mükoplasmades aga suudab harilik U antikoodoni esimeses positsioonis dekodeerida kõiki nelja koodoniperekonna liiget st. olenemata koodoni kolmandast tähest nn. "neljane wobble". Koodilugemise reeglid on täpsemalt kirjeldatud peatüki lõpus antud viites (Osawa, *et al.*, 1992).

Sarnased aminohapped paiknevad kooditabelis lähestikku. See tähendab, et juhuslikud vead koodi lugemisel (valgusünteesil) ei muuda sünteesitava valgu omadusi eriti suures ulatuses kuna aminohape asendub lähedaste omadutega aminohappena. Teiste sõnadega, geneetiline kood on müra suhtes vähetundlik. Seda fakti, et universaalne geneetiline kood on vigade summutamise suhtes optimaalne, on kasutatud argumentina geneetilise koodi evolutsioneerumise tõestuseks. Teine seisukoht on, et kood on "külmunud õnnetus", mis tähendab, et kui kood kord tekkis, siis ei saanud ta enam muutuda kuna iga muutus koodis tooks kaasa asenduse kõigis kodeeritud valkudes, see aga oleks organismile väljakannatamatu. Alternatiivsete koodide puhul, mida käsitleme allpool, on siiski mitmed asendused UGK'st aset leidnud, aga see on võimalik olnud ainult väga väikeste genoomide korral. Tõenäoliselt tuleb pidada UGK küllalt pikaajalist evolutsiooni. Eri küsimus on aga see, miks mingile kindlale koodonile vastab just see konkreetne aminohape. Näiteks, miks koodonid UUU ja UUC kodeerivad fenüülalaniini, aga koodoni perekond GGN kodeerivad glütsiini. Kas see võiks ka olla vastupidi. Sellele huvitavale küsimusele on püütud vastata stereokeemiliste (aminohappe seondumine oma koodoni või antikoodoniga) ja funktsionaalsete argumentidega (eri aminohapete peptiidsideme moodustamise reaktsioonivõime ja vastava koodon-antikoodon seondumise stabiilsuse vahel on negatiivne korrelatsioon). Veenvat eksperimentaalset tõestust pole kummagi argumendi kasuks seni avaldatud. Järelikult on küsimus UGK tekkimisest ja tähendusest lahtine.

Nagu eespool juba märgitud vastab mõnele aminohappele 1 koodon, enamusele 2 või 4, aga mõnele koguni 6 koodonit (alternatiivsete koodide puhul kuni 8 koodonit). On selge positiivne seos aminohappe valkudes esinemise sageduse ja nendele kooditabelis vastavate koodonite arvu vahel, mida sagedamini esinev aminohape, seda rohkem vastab talle koodoneid (vt. joon. 9.2). Ka see fakt viitab koodi otstarbekohasusele ja seega evolutsioonilisele optimeeritusele e. pikale evolutsioonilisele ajaloole.

Valguahelat kodeerivad koodonid on järjestikku. Seetõttu on võimalik sama mRNA järjestust tõlkida valguks kolmes erinevas "lugemisraamis". Näiteks järjestus:

AUGGCUUCGCUCAA,

tähendab esimeses lugemisraamis (alustades lugemist esimesest koodonist, AUG)

Met-Ala-Ser-Leu,

teises raamis (nimetatakse ka +1 raamiks) on järjestus: UGGCUUCGCUCA, mis vastab valgujärjestusele:

Cys-Leu-Arg-Ser,

kolmandas raamis (ka -1 raam) GGCUUCGCUCAAA kodeerib sama RNA järjestusega aminohappeid:

Gly-Phe-Ala-Glu

Näeme et need valgu järjestused on täiesti erinevad, vaid Ala ja Leu esinevad korduvalt ja sedagi erinevais positsioonides. Järelikult on sama nukleotiidset järjestust võimalik "tõlikida" valgu järjestuseks kolmes eri tähenduses.

Alternatiivsed koodid

Universaalsest geneetilisest koodist erinevaid koode esineb paljudes taksonites. Eriti sagedased on alternatiivsed koodid väikese genoomiga organismides. Kõige väiksemad genoomid on mitokondritel ja seega ei ole üllatav, et just mitokondrites on erinevused universaalsest koodist üldiselt levinud. Mitokondrid jagunevad geneetilise koodi poolest kaheks - taimsed mitokondrid, mis kasutavad universaalset koodi ja mitte-taimsed mitokondrid, mille koodid erinevad UGK'st. Genoomi suuruse ja koodi stabiilsuse vaheline seos tuleneb koodi "külmunud" olemusest. Kui geneetilises koodis ühe koodoni tähendus muutub (näiteks hakkab üks tRNA ära tundma uut koodonit) siis toob see kaasa mutatsiooni kõikides geenides, kus vastav koodon esineb. Üheaegne muutus paljude valkude primaarstruktuuris on suure tõenäosusega organismile kahjulik. Seepärast on muutused geneetilises koodis letaalsed. Väga väikeste genoomide puhul võib üks kindel koodon esineda ainult ühes või kahes geenis ja üksikud aminohappe asendused valkudes ei pruugi omada väga suurt mõju organismi eluvõimele. Sellisel juhul saavad juhuslikud muutused geneetilises koodis evolutsiooniliselt fikseeruda, mille tulemusel tekib alternatiivne geneetiline kood. Siiski on ka väikeste genoomide puhul koodi muutumise kiirus väga aeglane, enamuse koodonite osas on kõik erinevad koodid samad.

Vaatleme näitena selgroogsete organismide mitokondrite kooditabelit koos vastavate antikoodonitega (A.K.):

aminohape A.K. (koodon)	aminohape A.K. (koodon)	aminohape A.K. (koodon)	Aminohape A.K. (koodon)
Phe (UUU)	Ser (UCU)	Tyr (UAU)	Cys (UGU)
Phe (UUC) GAA	Ser (UCC)	Tyr (UAC) GUA	Cys (UGC) GCA
Leu (UUA) UAA	Ser (UCA) UGA	Stop (UAA)	Trp (UGA) UCA
Leu (UUG)	Ser (UCG)	Stop (UAG)	Trp (UGG)
Leu (CUU)	Pro (CCU)	His (CAU)	Arg (CGU)
Leu (CUC)	Pro (CCC)	His (CAC) GUG	Arg (CGC)
Leu (CUA) UAG	Pro (CCA) UGG	Gln (CAA) UUG	Arg (CGA) UCG
Leu (CUG)	Pro (CCG)	Gln (CAG)	Arg (CGG)
Ile (AUU)	Thr (ACU)	Asn (AAU)	Ser (AGU)
Ile (AUC) GAU	Thr (ACC)	Asn (AAC) GUU	Ser (AGC) GCU
Met (AUA) UAU	Thr (ACA) UGU	Lys (AAA) UUU	Stop (AGA)
Met (AUG)	Thr (ACG)	Lys (AAG)	Stop (AGG)
Val (GUU)	Ala (GCU)	Asp (GAU)	Gly (GGU)
Val (GUC)	Ala (GCC)	Asp (GAC) GUC	Gly (GGC)
Val (GUA) UAC	Ala (GCA) UGC	Glu (GAA) UUC	Gly (GGA) UCC
Val (GUG)	Ala (GCG)	Glu (GAG)	Gly (GGG)

Koodonite perekonnad on rasvases kirjas, antikoodon on kirjutatud komplementaarse koodoni taha. Nagu tabelist näha on selgroogsete organismide mitokondriaalne geneetiline kood lihtsam kui universaalne kood. Kõik koodonipaarid (3. positsioonis Pu

või Py) kodeerivad samu aminohappeid, erinevalt UGK'st vastab AUA koodon metioniinile ja mitte isoleutsiinile, UGK stop koodon UGA vastab siin trüptofaanile, lisaks on arginiinil vaid 4 koodonit ja UGK Arg koodonid AGPy vastavad siin stop koodonitele, mida on kokku 4 (UGK's on 3 stop koodonit). Selline koodi organisatsioon võimaldab vertebraatide mitokondritel valku sünteesida väiksema arvu tRNA'dega kui UGK'd kasutavates organismides. Vertebraatide mitokondrite kõigi koodoniperekondade transleerimisel osaleb ainult üks tRNA, mis moodustab "neljase wobble" paari kõigi nelja koodoniga. Väärrib märkimist, et kõigil 4 koodonit kodeerivatel tRNA'del on antikoodoni 1. positsioonis U. Mitokondrite koodide evolutsiooniline suhe on kujutatud joonisel 9.6.

Lisaks mitokondritele esineb üksikuid kõrvalekaldeid UGK'st ka teistes organismides. Eriti sage asendus on stop koodoni UGA asendumine Trp koodoniga. Neil organismidel on ainult kaks stop koodonit. Mõnedel pärmseentel *Candida* perekonnast esineb universaalse koodi leutsiini koodoni, CUG transleerimine seriinina. Seejuures transleerib CUG koodonit seriini-tRNA antikoodoniga CAG. Erakordne siinjuures on aga fakt, et see tRNA^{Ser}_{CAG} lülitab peptiidahelasse nii seriini kui leutsiini, viimast küll väikese sagedusega. Seega on *Candida* pärmidel leutsiini koodon CUG mitmetähenduslik. Selline olukord võis tekkida evolutsiooni käigus seetõttu, et koodonit CUG kasutatakse pärmides harva ja selle muutus ei omanud mingil evolutsiooni perioodil letaalsel mõju.

*Huvitav fenomen on ka koodonite ning vastavate tRNA'de puudumine. Mycoplasma capricolum genoom ei sisalda (niipalju kui teada) CGG koodonit ega ka vastavat tRNA^{Arg}_{CCG} geeni. Kui sellese organismi viia CGG koodonit sisaldav geen, siis viimase translatsioon peatub CGG koodoni kohal. Sellist asendumist seletatakse 'genoomi AT survega' (vt. koodonite kasutamisest) koodoni kasutusele, mille tuelumusena arginiini jaoks kasutatakse põhiliselt AGPu koodoneid. Pärmil *Torulopsis glabrata* mitokondriaalsed geenid ei sisalda ühtegi CGN koodonit, ega ka vastavat tRNA geeni ei ole leitud. Ka siin võib oletada genoomi AT survet, kuna pärmil mitokondritel on see kõrge. Kurioosumina puudub bakteril *Micrococcus luteus* kuus koodonit (UUA-Leu, CUA-Leu, AUA-Ile, GUA-Val, CAA-Gln ja AGA-Arg). Seega on siin geneetilise koodi evolutsiooniks vaba ruumi. Koodonid, millel puudub tähendus on tõelised nonsens koodonid.*

Koodonite kasutamisest.

Kuna koodoneid on kolm korda rohkem kui kodeeritud aminohappeid, siis on igal organismil vabadus valida milliseid koodoneid kasutada rohkem ja milliseid vähem. Koodonite ebavõrdset kasutamist eri organismides ja ühe organismi eri geenides on palju analüüsitud. On kindlaks tehtud mõned üldised reeglid koodonite kasutamise kohta.

Kõigepealt nn. genoomi efekt: igale genoomile on omane kindel aluspaaride sisaldus, G-C paaride osa kogu DNA aluspaaride hulgast väljendab GC% (G+C/A+C+G+T). See väärtus kõigub 0,3 - 0,7. Kõrge GC sisaldusega organismidel on koodoni kolmandas positsioonis enamasti G või C nukleotiid. Vastupidine on olukord madala GC sisaldusega genoomides, kus koodoni kolmandas positsioonis on sagedamini A või T. Genoomi efekti juurde pöördume tagasi genoomi peatükis. Teine oluline seaduspära seondub valgusünteesiga ja on energeetiline printsiip. Erinevatel valgugeenidel on erinev koodoni kasutus vastavalt valkude ekspressioonitasemele (sünteesi kogusele). Ainult suhteliselt väike osa geenidest (alla 10%) avaldub kõrgel tasemel, nende produkte sünteesitakse rakus suures koguses. Need ohtralt avalduvad geenid kasutavad väikest arvu koodoneid. See

seaduspära paistab eriti silma nende aminohapete puhul, millele vastab 4 või 6 koodoni aga on täiesti märgatav ka 2 koodonite aminohapete puhul. Ohtralt avalduvatele geenidele vastavad mRNA'd, kuigi neid on vähe liike, moodutavad suurema osa mRNA koguhulgast rakus. Seega on raku valgusünteesiapparaat ametis põhiliselt just kõrgelt ekspresseeruvate valkude sünteesiga. Järelikult kulub rakus rohkem tRNA'sid, mis kodeerivad ohtralt avalduvates mRNA'des sageli esinevaid koodoneid. Sellise koodoni kasutamisega on suurem osa rakus olevatest mRNA'dest võimalik transleerida vähese arvu tRNA'dega, mida on rakus kõrgemas kontsentratsioonis. Selline "tööjaotus" tRNA'de vahel võimaldab rakkudel sünteesida väiksemat arvu tRNA'sid ja seega energiat säästa. Seda seaduspära võib nimetada ka tRNA'de standardiseerimiseks.

Järgmine seaduspära koodonite kasutamisel seondub samuti valgusünteesiga ja seisneb nn. konteksti efektis. Nimelt ei ole koodonite järgnevus juhuslik, koodoni kolmas täht sõltub järgmisest koodonist. Kuna koodoni esimene ja teine täht määravad aminohappe, siis nende osas on valikuvabadus väiksem. Koodonite konteksti efekt on nii tugev, et seda on võimalik edukalt kasutada kodeerivate järjestuste leidmiseks. Kodeerivate järjestuste leidmine on sajandilõpu molekulaarbioloogias aktuaalne probleem suure hulga DNA järjestuse andmete akumulierumise tõttu. Sageli ei ole nende järjestuste kohta kuigi palju teada. Veelgi enam, eukariootsete geenide intron-ekson struktuuri tõttu ei ole kuigi ekrge kodeerivaid järjestusi ära tunda. Seetõttu kasutataksegi koodonite kasutamise ja koodonite konteksti andmeid kodeerivate piirkondade indentifitseerimiseks. Koodoni konteksti põhjused ei ole paraku veel selged. Eriti tugev on konteksti efekt stop koodonite puhul ja kontekst mõjutab oluliselt valgusünteesi terminatsiooni efektiivsust.

Täiendav kirjandus geneetilise koodi kohta:

Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K., Muto, A., (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological Reviews* **56**, (1), p. 229-264

Suzuki, T., Ueda, T., Watanabe, K., (1997) The 'polysemous' codon - a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *EMBO J.* **16**, (5), p. 1122-1134

IIB tRNA ja valgusünteesi preribosomaalne etapp

Transport-RNA struktuur

Transport RNA (tRNA) avastati 50. aastate lõpul. Varem oli F. Crick ennustatud adaptormolekuli, mis seaks aminohappe vastavusse nukleotiidses koodoniga. Sellest ajast alates on tRNA olnud üks enam-uuritud biomolekul. tRNA oli esimene RNA, mille primaarstruktuur kindlaks tehti ja samuti esimene RNA molekul, mille ruumilist struktuuri tundma õpiti. Tänapäevaks on teada paljude tuhandete tRNA molekulide primaarstruktuur väga pajudes eri liikidest. Kõigi tuntud tRNA molekulide ruumiline struktuur on sarnane nii sekundaar- kui tertsiaarstruktuuri tasemel. tRNA molekulide pikkus varieerub tavaliselt 74-92 nukleotiidi, kuigi üksikud erandid on mõnevõrra lühemad või pikemad. tRNA nukleotiidid on nummerdatud ühtse nomenklatuuri alusel, esimene nukleotiid on 5' otsas, antikoodoni moodustavad nukleotiidid 34, 35, 36 ja 3' otsa konserveerunud järjestus CCA kannab numbreid 74-76 olenemata sellest mitu nukleotiidi konkreetsetes tRNA molekulis on. Näiteks on lisalingus nukleotiidid 47, 47:1, 47:2,.... Samas puudub nukleotiid 47 paljudel tRNA molekulidel.

Sekundaarstruktuur on tRNA molekulidel samuti konserveerunud, mida iseloomustatakse ristkheina lehe kujuga (vt. joon. 7.3). tRNA sekundaarstruktuuri moodustavad 4 kaksiahelalist osa (õlga) ja 4 üksiahelalist piirkonda (3 lünga e. aasa ja

4 paardumata nukleotiidi 3' otsas), mis paiknevad vastavate õlgade otstes (vt. joonis 7.4).

tRNA molekuli otsad asuvad lähestikku, nende paardumisel tekkiv kaksiahelaline osa e. õlg kannab nime aktseptoorne õlg (acceptor arm). Viimase pikendus on üheahelaline osa 3' otsas, millele liidetakse estersidemega karbonüülradikaali kaudu aminohape (joonis 7.3). Aktseptor-õlg on 7 aluspaari pikk.

T-õlg (ka T Ψ C õlg) on saanud oma nime modifitseeritud lämmastikaluste pärast, mis asuvad T-aasas. Järjestus T Ψ C on tRNA T-aasas väga laialdaselt konserveerunud. Need alused on ribosüültümidin - T (tRNA sünteesi käigus on sellel kohal harilik U nukleotiid, mis muudetakse tümidiniks juba tRNA koosseisus nn. **post-**

transkriptsiooniline modifikatsioon) ja pseudouridiin - Ψ (vt. joon. 9.4) (ka pseudouridiin tekib transkriptsioonijärgse modifitseerimise tulemusena). T-õlg on 5 aluspaarine, aga T-aasa pikkus võib varieeruda 7-9 nukleotiidi ulatuses.

Antikoodon õlg on alati 5 aluspaari pikk ja nagu nimi ütleb, sisaldab antikoodon ling kolme nukleotiidist antikoodonit, mis määrab tRNA koodoni spetsiifika. Antikoodon lingus on alati 7 nukleotiidi. Ka antikoodon ling sisaldab modifitseeritud nukleotide, mida käsitleme lähemalt allpool.

D-õlg, mis koosneb tavaliselt 4 aluspaarist ja kannab D-lingu, on saanud nime dihidrouridiinjäakide (jällegi RNA sünteesijärgne modifikatsioon vt. joon. 9.4) alusel. D-lingu pikkus on varieeruv.

Lisaks neile sisaldavad paljud tRNA molekulid lisaõlga ja/või lisalingu, mille pikkus võib varieeruda laias vahemikus.

tRNA ruumiline struktuur tekib heeliksiite liitumise (coaxial stacking) teel, kusjuures tekib L tähe kujuline struktuur, mille ühes otsas on antikoodon aas ja teise otsa (3' otsa) kinnitub aminohape (vt. joonised 7.5 ja 7.6). Omavahel liitunud aktseptoorne ja T-õlg moodustavad ühise heeliksi. Teine heeliks tekib D-õla ja antikoodon õla liitumise tulemusena. Ruumilises struktuuris satuvad D-aas ja T-aas lähestikku ja nad on omavahel lämmastikaluste vaheliste vesiniksidemete abil seotud (tertsiaarsed vesiniksidemed), mis stabiliseerib tRNA molekuli struktuuri. Erinevate tRNA molekulide ruumiline struktuur peab olema sarnane, kuna nad kõik peavad seonduma ribosoomil samasse piirkonda. Seepärast on aminohappe ja antikoodoni vaheline kaugus oluline parameeter, mis peab kõigil tRNA'del olema sama (70 Å).

tRNA funktsiooni seisukohalt on tähtsaim osa antikoodon (nukleotiidid 34-36).

Antikoodoni kolm nukleotiidi paarduvad mRNA kolme nukleotiidiga (koodoniga), mis on geneetilise translatsiooni (nukleiinhappe järjestuse valgu järjestuseks tõlkimise) struktuurseks aluseks. Seepärast on antikoodoni geomeetria oluline koodon-antikoodon interaktsiooni toimumisel. Antikoodon aasas on alati (v.a. raaminihke suppressorid, vt. allpool) 7 nukleotiidi, milles antikoodoni moodustavad 3 keskmist nukleotiidi.

Antikoodoni ees paikneb konserveerunud U33 nukleotiid, mille järel teeb nukleiinhappe ahel järsu pöörde (vt. joonis 7.7). Antikoodoni kõik kolm nukleotiidi paiknevad RNA ahela ühel küljel sarnases konformatsioonis nagu esineb RNA kaheahelalises A vormis. Antikoodon on sobivas struktuuris koodoniga paardumiseks. Antikoodon aasa struktuur on oluline ka lugemisraami hoidmisel, kuna U33 on antikoodoni teljest järsult ära pööratud, siis ei saa see nukleotiid osaleda mRNA'ga paardumisel pideva heeliksina. Tuleb silmas pidada, et nukleotiid 34, esimene antikoodoni nukleotiid, paardub koodoni viimase, 3. nukleotiidiga ja seepärast on oluline, et koodon-antikoodon interaktsioon lõppeks just 34. nukleotiidiga ega jätkuks U33'ga. Seepärast määrab U33 juures toimuv järsk pööre ära koodon-antikoodon seose pikkuse (3 aluspaari). Antikoodoni järel paiknevad nn. hüpermodifitseeritud nukleotiidid, mis tavaliselt ei ole võimelised aluspaardumises osalema. On teada, et

modifitseeritud aluste olemasolu antikoodoni 3' küljel on vajalik translatsiooni täpsuse tagamiseks. Bakteri mutantides, kus mõni tRNA'd modifitseeriv ensüüm puudub, tehakse valgusünteesil rohkem vigu.

tRNA teine oluline piirkond, 3' ots, asub antikoodonist ~70 Å kaugusel. tRNA kolm viimast nukleotiidi on CCA järjestus, mis seondub ribosoomis peptiidsideme moodustumist katalüüsiva tsentriga.

Aminoatsüül-tRNA süntees

tRNA ruumiline struktuur on kõigil erinevatel tRNA molekulidel sarnane. See sarnasus on vajalik tRNA funktsiooni täitmiseks valgusünteesil. Ribosoomidega seonduvad kõik tRNA molekulid samadesse piirkondadesse aga samuti peavad kõik aa-tRNA molekulid seonduma elongatsioonifaktor T'ga, mis transpordib neid ribosoomidesse, nagu näeme edaspidi. Teisest küljest peavad kõik tRNA molekulid olema erinevad, et tagada nende identiteeti st. igal tRNA liigil peavad olema mingid struktuursed determinandid, mille järgi teda ära tuntakse ja mis määravad aminohappe spetsiifika. Põhilised ensüümid, mis peavad tRNA molekuli identifitseerima on aminoatsüül-tRNA süntetaasid e. ligaasid (tähistatakse lühenditega ARL või ARS aga samuti kolmetäheline aminohappe lühend-RS, näiteks Ala-RS, Phe-RS). Edaspidi kasutan lühiduse huvides nimetust süntetaasid. Viimased on geneetilise koodi realiseerimise seisukohalt sama tähtsad kui tRNA. Just süntetaasid seavad vastavusse tRNA molekuli ja vastava aminohappe. Seejuures peab süntetaas üheselt ära tundma nii tRNA kui aminohappe ja seejärel nad omavahel estersidemega liitma.

Neid tRNA struktuuri elemente, mis määravad ära millise aminohappega tRNA aminoatsüüleeritakse, nimetatakse tRNA identsuse elementideks. tRNA identsuse elemendid on tRNA nukleotiidid kindlates positsioonides. Siin tuleb arvestada, et üht aminohapet kodeerib 1-6 koodonit ja seega tavaliselt mitu erinevat tRNA molekuli (isoaktseptoorset tRNA'd), mis erinevad teineteisest antikoodoni järjestuse poolest. Süntetaase on aga iga aminohappe jaoks üksainus (igas rakus on 20 erinevat süntetaasi, nii nagu kodeeritud aminohappeidki). Seepärast peab üks süntetaas võrdselt hästi ära tundma ja ühe ning sama spetsiifilise aminohappega aminoatsüleerima mitut erineva antikoodoniga tRNA molekuli. Sama aminohappe spetsiifilistel tRNA liikidel (isoaktseptoorsetel tRNA'del) on samased identsuse elemendid. Identsuse elemendid on antikoodonis ainult osaliselt ja sedagi vaid nende nukleotiidide osas, mis on kõigil isoaktseptoorsetel tRNA'del samad. Siiski on antikoodoni nukleotiididel tRNA aminohappelise identsuse määramisel suur tähtsus. Kõik süntetaasid tunnevad ära 4. nukleotiidi 3' otsast st. nukleotiidi 73, mis on isoaktseptoorsetel tRNA'del identsed ja mida seetõttu nimetatakse diskriminaator-aluseks. Suurem osa tRNA identsuse elemente paiknevad kas aktseptoorsetes õlas või antikoodon lingus. Need kaks piirkonda on süntetaasidega tihedas kompleksis, kusjuures ülejäänud tRNA molekul moodustab süntetaasiga vaid üksikuid kontakte (vt. joonised 9.9-9.11).

Süntetaasid jaotuvad järjestuse homoloogia alusel kahte klassi. Klass 1 süntetaasidel on N-terminaalne katalüütiline domään aminohappe ja nukleotiidi sidumiseks. Sama domään sisaldab ka kaheosalist osaliselt konserveerunud järjestust mis on sarnane kõigil klass 1 süntetaasidel. Seda konserveerunud järjestust kutsutakse ka allkirjajärjestuseks (signature sequence). Nukleotiidi siduva domääni tertsiaar-struktuur on sarnane pea kõigil nukleotiidi siduvatel valkudel ja see koosneb tavaliselt 4-6 antiparalleelsest β -ahelast ja 2-4 α -heeliksist, mis on β kihiga risti. Ülejäänud osas on klass 1 süntetaaside nii primaar- kui tertsiaar-struktuur varieeruv. Ka klass 2 süntetaasidel on katalüütilises domäänis homoloogne osa, aga see on varieeruvam kui

klass 1 ensüümidel. Nukleotiidi siduvate domäänide ruumiline struktuur on mõlemal klassil sarnane, aga järjestuse homoloogia nende vahel puudub. Ka tRNA'ga seondumine toimub kahel klassil erinevalt (vt. joon. 9.10 ja 9.11). Kahe süntetaaside klassi struktuurielementide jaotus ja võrdlus on toodud joonisel 9.8. Kuna kahe süntetaaside klassi vahel homoloogiat ei ole, on nad ilmselt tekkinud sõltumatult aga kummalgi klassil võib oletada ühist eellasmolekuli.

Aminohappe liitmine tRNA molekulile toimub kaheastmelise reaktsioonina (vt. joon. 9.7). Kõigepealt seonduvad süntetaasiga aminohape ja ATP molekul, mis ensüümi pinnal moodustavad aminoatsüül-adenülaadi (aminohappe karboksüülrühma hapnik reageerib ATP α -fosfaadiga, vt. joon 9.7). Aminoatsüül-adenülaadis on aminohape aktiveeritud karboksüülrühma kaudu. Teise etapina toimub estersideme süntees aminohappe karboksüülrühma ja tRNA 3'-terminaalse riboosi 2' või 3' süsiniku vahel ja vabaneb AMP (joonised 9.7, 7.3). Seega jääb aminohape seotuks tRNA 3' terminaalse riboosiga estersideme abil. Aminoatsüleerimise reaktsiooni mõlemad etapid on pöörduvad, süntetaas võib aminoatsüül-tRNA'st ja AMP'st pürofosfaadi manulusel sünteesida ATP'd, kusjuures vabanevad aminohape ja tRNA.

tRNA aminoatsüleerimisreaktsiooni võrrand:

1. $E + aa + ATP \leftrightarrow E:ATP:aa \leftrightarrow E:AMP:aa + PP$
2. $E:AMP:aa + tRNA \leftrightarrow E:AMP:aa:tRNA \leftrightarrow E:aa:tRNA + AMP \leftrightarrow E + aa:tRNA$, kus E on aminoatsüül-tRNA süntetaas, aa on aminohape, AMP-aa on aminoatsüül-adenülaad, ' tähistab mittekovalentset kompleksi ja "-" tähistab kovalentset keemilist sidet.

Aminoatsüül-tRNA sünteesi täpsus on väga kõrge, vigade sagedus on 10^{-5} (üks vale aminohape 100 000 õigesti sünteesitud aa-tRNA kohta). Kuna paljud aminohapped on omavahel väga sarnased (näiteks erinevad Ala ja Glu, ning Ile ja Val ainult ühe metüülrühma poolest), siis on sellise täpsuse tagamine väga huvitav molekulaarse äratundmise küsimus. Teisest küljest peab süntetaas suutma valida paljude tRNA molekulide vahel, mis on omavahel sarnase ruumilise struktuuriga. tRNA valik süntetaasi poolt toimub kahes etapis. Esiteks seonduv süntetaas stabiilselt vaid "sobiva" tRNA molekuliga ja teiseks toimub vaid "õigele" tRNA'le aminohappe liitmine kiiresti, st. vale tRNA võib küll seonduda süntetaasiga, aga teda ei aminoatsüleerita (vt. joon 9.12). Õige tRNA molekul indutseerib süntetaasil konformatsiooni muutuse, mis kiirendab aminoatsüleerimise reaktsiooni, samas aga "vale" tRNA süntetaasi struktuuri muutust esile ei kutsu ja ta jõuab enne ensüümi pinnalt lahkuda kui keemilise sideme süntees aset leiab.. Sellist valiku mehhanismi, mis põhineb reaktsioonide kiiruste erinevusel nimetatakse ka "kineetiliseks veerulugemiseks" ("kinetic proofreading"). Aminohappe valik toimub neil süntetaasidel, mille substraadil on keemiliselt lähedasi "valesid" aminohappeid (näiteks Ile, millel on lähedased Val ja Leu), samuti mitmeastmelisena. Kui "vale" aminohape ühendatakse tRNA'ga, siis hüdrolyüsib süntetaas tekkinud estersideme, mille tulemusena valesi sünteesitud produkt laguneb ja aminohape ning tRNA vabanevad. Seda reaktsiooni viib läbi süntetaasi eriline hüdrolyütiline tšenter, mis on osa ensüümi aktiivtsentrist. Ka see hüdrolyütiline mehhanism toimub reaktsioonikiiruste erinevuse tõttu, õige produkti hüdrolyüs on aeglane ja "vale" produkti hüdrolyüs kiire. Sarnased mitmeastmelised valikumehhanismid on omased paljudele ensüümidele, mis viivad läbi geneetilise informatsiooni ülekannet ja nendega puutume kokku ka edaspidi.

IIC Valgusüntees ribosoomides

Ribosoom

Ribosoomid viivad kõikides organismides läbi programmeeritud valgusünteesi kasutades aminoatsüül-tRNA'd (aa-tRNA) substraadina. Süntees toimub vastavalt mRNA programmile (vt. geneetiline kood ja allpool). Ribosoomid koosnevad alati kahest ebavõrdsest osast, suurest ja väiksest subühikust. Ribosoomi on tähistatud ka sõnaga "pihukeha" tema väikeste mõõtmete tõttu. Nimetus "ribosoom" tuleneb RNA sisaldusest. Ribosoomi mõlemad subühikud koosnevad RNA'st ja valkudest. Ribosoomides osalevad substraadi sidumisel ja keemiliste reaktsioonide läbiviimisel nii valgud kui RNA. Viimase osa valgu biosünteesil käsitleme veel eraldi peatüki lõpus. Fakt, et ribosoomides on RNA katalüütilise funktsiooni kandjaks on olnud oluliseks aluseks nn. "RNA maailma" hüpoteesilise. Selle hüpoteesi kohaselt tekkis elu kõigepealt RNA baasil, mis kandis algselt nii geneetilist informatsiooni kui oli ka keemiliste reaktsioonide läbiviijaks.

Bioloogiliste makromolekulide ja nende komplekside suuruse iseloomustamiseks kasutatakse raskusväljas liikumise kiirust. Viimast kirjeldab Svedbergi ühik (S). Mida suurem partikkel, seda suurem S väärtus. Raskusväljas liikumise kiirus (S) sõltub nii partikli molekulmassist kui tema mõõtmetest (tihedusest) kusjuures see sõltuvus on mittelineaarne. Ribosoomide komponente ja nende suurust esitab järgmine tabel

Ribosoom	Subühikud	rRNA	r-Valgud
Bakteriaalne ribosoom (2,5x10 ⁶ D)	väike 30S suur 50S	16S - 1542 23S - 2904, 5S - 120	21 (6-61 kD) S-valgud 33 (5-30 kD) L-valgud
Inimese ribosoom (4,2x10 ⁶ D)	väike 40S suur 60S	18S - 1874 28S - 4718, 5,8S - 160, 5S - 120	33 S-valgud 49 L-valgud

Ribosomaalne RNA (rRNA) moodustab bakteriaalsetes ribosoomides 66% massist ja eukariootsetes ribosoomides 60% massist. Ribosoomid ise moodustavad bakterites 20-40% kuivmassist, eukariootides tunduvalt väiksema osa.

Ribosoomi struktuuri uurimise alal on viimaste aastate jooksul toimunud läbimurre, on suudetud kristalliseerida ribosoomide subühikud ja lahendada röntgenkiirte hajumisel tekkiv difraktsioonipilt, mille tulemusel koos elektronmikroskoopia andmetega on esitatud ribosoomide ruumilise struktuuri mudel. Mudelid on seni veel keskmise lahutusvõimega (5-5,5 Å, *Thermus thermophilus*'e 50S ja *Haloarcula marismortui* 30S), aga annavad siiski pildi ribosoomi struktuurse organisatsiooni kohta. rRNA ja valgud on organiseeritud ribosoomi struktuurseteks domäänideks, mis moodustavad mRNA, tRNA'de ja valguliste translatsioonifaktorite sidumiskohad. rRNA moodustab suurema osa ribosoomist ja seega annab just rRNA struktuurne organisatsioon ribosoomi põhilise vormi. rRNA sekundaarstruktuuri domäänid (vt. joon. 8.3) moodustavad ka ribosoomis eraldi struktuursed üksused. r-Valgud seonduvad rRNA kindlatesse kohtadesse stabiliseerides rRNA ruumilist struktuuri ja ühendades erinevaid rRNA domääne omavahel nii valk-valk kui valk-RNA interaktsioonide kaudu. *E. coli* ribosoomis on suurema osa valkude sidumiskohad rRNA'l teada. Ribosoomi suuremas subühikus on kanal, mille kaudu ilmselt väljub kasvav peptiidahel.

Ribosoomi subühikud on omavahel seotud kahest kohast ja subühikute vahele jääb põhiline aktiivtsenter, mis moodustab tRNA' de sidumiskohad. Ribosoomis on kolm tRNA sidumispiirkonda, mida nimetatakse tRNA sidumis-saitideks. Saidid on nimetatud vastavalt tRNA liigile, mis põhiliselt seondub vastava ribosoomi piirkonnaga kuigi nagu kohe näeme, võivad A- ja P-saidid siduda mitut erinevat tRNA liiki.

A-sait seondub aminoatsüül-tRNA (millest ka nimi). Samas kohas toimub ka aa-tRNA' de valik mRNA koodoni alusel. A-saidis olev aa-tRNA reageerib ribosoomis peptidüül-tRNA' ga, mille tulemusena moodustub peptiidside. Peale peptiidsideme sünteesi asub A saidis värskeltsünteesitud peptidüül-tRNA. A-sait paikneb nii väiksemal kui suuremal subühikul.

P-sait seondub peptidüül-tRNA. Saidi nimetus tulebki peptidüül-tRNA järgi. Peale peptiidsideme moodustumist, kui kasvav peptiidahel kantakse ribosoomis peptidüül-tRNA' lt A-saidis asuvale aa-tRNA' le jääb ribosoomi P-saiti alles deatsüleeritud tRNA (lihtsalt tRNA, mille 3' otsas on vaba hüdroksüülrühm). P-sait paikneb samuti mõlemal ribosoomi subühikul.

E-sait on deatsüleeritud tRNA spetsiifiline. Peale seda kui P-saidis tekkis deatsüül-tRNA liiguvad tRNA' d koos mRNA' ga ribosoomis ühe koodoni võrra edasi ja deatsüül-tRNA satub E-saiti. E-sait on saanud oma nime selle järgi, et selle koha kaudu väljub ribosoomist deatsüül-tRNA et minna "uuele ringile". E-sait ei ole võimeline siduma ei aa-tRNA' d ega peptidüül-tRNA' d. E-sait asub põhiliselt ribosoomi suuremal subühikul.

Nii A- kui P-saidis toimub tRNA antikoodoni paardumine mRNA koodoniga. Kui tRNA liigub E-saiti siis jääb koodon-antikoodon seos ilmselt ajutiselt alles, aga katkeb enne tRNA lahkumist ribosoomist. Seepärast tehakse mõnede autorite poolt vahet kahe erineva E-saidi oleku vahel. Kui ribosoomi saite vaadata tRNA liigi järgi, siis aa-tRNA seondub ainult A-saiti, peptidüül-tRNA võib asuda nii A- kui P-saidis ja deatsüül-tRNA võib asuda nii P- kui E-saidis. tRNA sidumis-saite vaatleme veelkord peale elongatsioonitsükli käsitlemist seoses translatsiooni elongatsiooni hübriidsaitide mudeliga.

Lisaks tRNA sidumiskohtadele on ribosoomis veel aktiivtsentrid. **Ribosoomi dekodeeriv tsepter** asub ribosoomi väiksemal subühikul. Dekodeerivas tseptis toimub koodon-antikoodon äratundmine. Selles protsessis osaleb ribosoom aktiivselt, ribosoomis toimuv koodon-antikoodon interaktsioon on stabiilsem ja täpsem kui vabas lahuses tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni paardumine. Dekodeeriva tseptri moodustumisel osalevad nii 16S rRNA kui ribosoomi väiksema subühiku valgud. Dekodeeriva tseptri läheduses paikneb ribosoomi väiksemal subühikul **mRNA sidumispiirkond**, mis toimib valgusünteesi initsiatsioonil. See piirkond koosneb eranditult rRNA' st ja moodustub 16S rRNA 3' otsas, mis paardub mRNA ribosoomi seondumispiirkonnaga (nn. anti-Shine-Dalgarno järjestus). Ribosoomi suuremal subühikul asuvad **peptiidsideme moodustumist katalüüsiv tsepter** e.

peptidüültransferaasne tsepter on piirkond kuhu seonduvad aa-tRNA ja peptidüül-tRNA 3' otsad koos vastavalt aminohappe- ja kasvava peptiidahelaga, ning viimane oluline koht, **valgusünteesi faktoreid siduv tsepter**. Neist esimene, aminohappeid omavahel ühendav tsepter, koosneb põhiliselt 23S rRNA' st, aga selle tseptri moodustumisel osalevad ka L-valgud. Faktoreid sideuva tsepteri tähtsaim komponent on aga valguline, mille moodustavad valgud (L7/L12)₂ kompleksis L10' ga kuigi selle tseptri tähtsad osad on ka kaks piirkonda 23S rRNA' s.

Ribosomaalse valgusünteesi etapid

Valgusüntees ribosoomidel jagatakse kolmeks etapiks: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Initsiatsioonil toimub ribosoomi subühikute assotseerumine, valku kodeeriva ala alguse leidmine mRNA'l, õige lugemisraami fikseerimine ja esimese peptiidside süntees. Elongatsiooni käigus toimub valguahela pikenemine kuni stop-koodonini. Terminatsioonil toimub stop-koodoni äratundmine terminatsioonifaktori poolt, sünteesitud valgu, mRNA ja tRNA vabanemine ning ribosoomi subühikute eraldumine. Sellega on taastunud ribosoomide algne olek, st. subühikud on eraldi ja ribosoomid on läbinud **valgusünteesi ribosoomi tsükli** (joon. 8.9).

Valgusünteesi initsiatsioonil osalevad lisaks ribosoomidele ka valgulised initsiatsioonifaktorid, initsiaator-tRNA ja GTP. Initsiatsioon toimub prokarüootidel ja eukarüootidel võrdlemisi suurte erinevustega, seepärast käsitleme siin ainult prokarüootset initsiatsiooni ja eukarüootide valgusünteesi omapära käsitleme eraldi peatükis.

Bakteritel on kaks konserveerunud **valgusünteesi initsiatsioonifaktorit**, mõnedel bakteritel on kolm erinevat initsiatsioonifaktorit. Neist IF-2 on suur valk (molekulmass 110 kD), IF-3 ja IF-1 on väikesed valgud (9 ja 25 kD vastavalt). IF-2 ja IF-3 esinevad kõigil bakteritel. IF-2 seob GTP juuresolekul initsiaator-tRNA'd, mis bakterites on fMet-tRNA^{fMet}. Sellise kolmik-kompleksina seondub IF-2 ribosoomi väiksema subühikuga ja moodustab viimasega stabiilse kompleksi. IF-2 on GTP'd siduv valk ja tal on teistele GTP'ga seonduvatele valkudele omane valgudomään nn. GTP domään. IF-2 omab GTP'd hüdrolüüsivast tsentrit, mis aktiveerub initsiatsiooni käigus ja on sõltuv ribosoomide suuremast subühikust. IF-3 on ribosoomide dissotsiatsioonifaktor, ta takistab ribosoomide subühikutel assotseerumast, võimaldades niiviisi vabade 30S subühikute olemasolu, mis on vajalikud mRNA ja IF-2-GTP-fMet-tRNA^{fMet} kompleksi sidumiseks. Initsiaator-tRNA, mis prokarüootides on fMet-tRNA^{fMet}, erineb veidi tavalistest tRNA'dest. Esimene nukleotiid ei ole initsiaator-tRNA's paardunud. Teistel tRNA'del on esimene nukleotiid paardunud 72. nukleotiidiga. Ka antikoodon õla struktuur on veidi erinev (vt. joon. 8.13). Need erinevused on vajalikud, transformülaasile äratundmiseks mis lisab Met-tRNA^{fMet} le formüülgrupi ja fMet-tRNA^{fMet} seondumiseks otse ribosoomi P saiti, ilma eelnevalt A saiti läbimata.

Bakteriaalne mRNA on reeglina polütsistronne, st. üks mRNA kodeerib mitut valku (joon 7.15). Valku kodeerivat järjestust nii mRNA'l kui DNA'l nimetatakse ka avatud lugemisraamiks, lühend **ORF (open reading frame)**. Avatud lugemisraam on nukleiinhappe järjestus, mis sisaldab järjestikuseid aminohappeid kodeerivaid koodoneid ja mis algab initsiaator-koodoniga ning lõpeb stop-koodoniga. mRNA'd sisaldavad lisaks kodeerivale järjestusele (ORF'le) ka speisserjärjestusi. Enne (5' poolsest) ORF'i asub liiderjärjestus ja peale viimast ORF'i on treilerjärjestus. Erinevate lugemisraamide vahel asuvad inter-tsistronsed speisserid.

Initsiatsiooniprotsessi käigus otsib ribosoom üles ORF'i alguskoha st. initsiaator-koodoni, mis on enamasti AUG. Bakteriaalsetel mRNA'del eelneb initsiaator-koodonile ribosoomi sidumiskiirkond **RBS (ribosome binding site)**. RBS on 4-7 nukleotiidine järjestus, mis on komplementaarne ribosoomi väiksema subühiku RNA (16S rRNA) 3' otsaga. RBS paikneb AUG koodonist 5-7 nukleotidi eespool (5' suunas). RBS järjestust kutsutakse ka **Shine-Dalgarno järjestuseks** (lühend SD) avastajate järgi. Prokarüootides esinevad ka ilma RBS'ta mRNA'd, mis on aga madala ekspressiooniga, kuna nad ei osale efektiivselt valgusünteesi initsiatsioonil.

Bakteriaalne mRNA on võimeline seonduma ribosoomi väiksema subühikuga ilma lisafaktorite abita moodustades kaksikahelalise kompleksi mRNA RBS järjestuse (e. SD järjestuse) ja 16S rRNA 3' otsa vahel. Kuigi ribosoomi väiksem subühik on komplekseerunud IF-3'ga, ei oma see faktor olulist mõju mRNA seondumisele.

mRNA-30S kompleks seondub IF-2·GTP·fMet-tRNA^{fMet} kompleksiga, mille käigus tekib esimene koodon-antikoodon paardumine. Viimane määrabki ära lugemisraami alguse. Initsiaator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) seondub 30S ribosoomi P saiti (joon. 8.12). Umbes 10% bakteriaalsetest mRNA'dest on initsiaator-koodoniks GUG ja väga harva mõni teine lähedane koodon. Hoolimata sellest milline koodon on initsiaator-koodoniks seondub sellega ikka sama fMet-tRNA^{fMet} (Initsiatsioon on skemaatiliselt joonisel 8.14).

Järgmine etapp valgusünteesi initsiatsioonil peale 30S mRNA·IF-2·GTP·fMet-tRNA^{fMet}·IF-3 kompleksi teket on ribosoomi suurema subühiku (50S) seondumine. Viimasega ühinemise tulemusena tekib 70S ribosoom ning hüdrolyüsitakse IF-2'ga seotud GTP. Peale GTP hüdrolyüsi vabanevad IF-2, IF-3 ja GDP. Järgmine aa-tRNA seondub ribosoomidega juba kompleksis EF-Tu ja GTP'ga. Peale esimese peptiidsideme sünteesi on valgusünteesi initsiatsioon lõppenud ehk sujuvalt elongatsiooniks üle läinud.

Valgusünteesi elongatsiooni käigus toimub ribosoomis peptiidahela pikendamine vasavalt mRNA programmile kuni ribosoomi dekodeerivasse tsesse jöuab üks kolmest stop-koodonist. Elongatsioon on tsükline protsess, mis toimub bakterites kiirusega kuni 20 aminohapet sekundis. Iga tsükli käigus lisatakse kasvavasse peptiidi üks aminohape. Elongatsioonil osalevad lisaks ribosoomidele, mRNA'le ja aa-tRNA'le veel elongatsioonifaktorid: **EF-Tu**, **EF-Ts** ja **EF-G** ning kofaktorina GTP. EF-Tu ja EF-Ts moodustavad kompleksi, mis kannab EF-T nime. Lühendite tähendused: EF - elongatsiooni faktor; EF-T - T tuleneb sõnast "transfer", väikesed tähed "u" ja "s" tähistavad termilist stabiilsust; u - "unstable" (ebastabiilne), s - "stable" (stabiilne). Seega EF-Tu ja EF-Ts on transpordi funktsiooniga elongatsioonifaktorid, millest esimene on ebastabiilse ja teine stabiilse struktuuriga. EF-G nimetus tuleneb tema võimest hüdrolyüsida ribosoomide juuresolekul GTP'd. Nagu juba faktorite nimedest näha osalevad EF-Tu ja EF-Ts aa-tRNA transpordil ribosoomi A saiti. Nende osa selles transpordis on aga täiesti erinev. EF-Tu moodustab kompleksi aa-tRNA ja GTP'ga. Seda kompleksi kutsutakse ka "kolmik-kompleksiks" (*ternary complex* – ingl. k.). EF-Tu·GTP·aa-tRNA kolmik-kompleks seondub ribosoomi A saiti. Juhul, kui aa-tRNA antikoodon on komplementaarne ribosoomi dekodeerivas tsesse eksponeeritud koodoniga, toimub EF-Tu'l GTP hüdrolyüs ja EF-Tu·GDP ning fosfaatjääk lahkuvad ribosoomist. Kui aga tRNA antikoodon ei ole komplementaarne, siis kolmikkompleks ribosoomiga ei seondu. EF-Tu seondub GDP'ga väga stabiilselt, umbes 100x tugevamini kui GTP'ga. GDP stabiilsem sidumine võrreldes GTP sidumisega on omane paljudele G-nukleotiidi siduvatele valkudele (nn. **G-valkudele**). Lisaks sidumise stabiilsusele on GDP dissotsiatsioon EF-Tu'lt väga aeglane. Nukleotiidi vahetust EF-Tu'l katalüüsib EF-Ts. Sarnased nukleotiidi vahetust katalüüsivad faktorid on paljudel G-valkudel. Rakkudes on GTP kontsentratsioon harilikult 1000x kõrgem kui GDP kontsentratsioon, seepärast tekib peale EF-Ts'i poolt katalüüsitud nukleotiidi vahetust EF-Tu·GTP kompleks, mis on võimeline seonduma järgmise aa-tRNA'ga (EF-Tu·GDP kompleks ei seo aa-tRNA'd). Teine hästi tuntud G-valk valgusünteesi aparaadis on EF-G, mis katalüüsib ribosoomidel mRNA-tRNA kompleksi translokatsiooni (vt. allpool).

Elongatsioonitsükli esimene reaktsioon on EF-Tu sõltuv aa-tRNA sidumine ribosoomi A saiti. Siin toimub ka aa-tRNA'de valik vastavalt mRNA programmile. aa-tRNA valik ribosoomi A-saidis toimub stohhastiliselt, st. EF-Tu·GTP·aa-tRNA kompleksid seonduvad ribosoomi A saidiga juhuslikult ja ainult nende kompleksidega, millel tekib koodon-antikoodon äratundmine (tRNA antikoodon on komplementaarne mRNA koodoniga), tekib stabiilne seondumine, mis omakorda indutseerib GTP hüdrolyüsi EF-

Tu¹. EF-Tu seondub aa-tRNA aktseptoorse õla ja 3' otsaga nii, et aminohape on kolmik-kompleksis kaitstud st. ei ole ribosoomile kättesaadav. Seni kuni ribosoomis on EF-Tu ei saa aa-tRNA osaleda peptiidsideme moodustumisel kuna aa-tRNA 3' ots ja aminohape on seotud EF-Tu'ga. See asjaolu hoiab ära peptiidsideme moodustumise "vale" aminohappega. Alles peale EF-Tu sõltuvat GTP hüdrolüüsi ja EF-TuGDP kompleksi lahkumist ribosoomidelt saab toimuda peptiidsideme süntees. EF-Tu lahkeb ribosoomist GDP vormis ja enne järgmise aa-tRNA sidumist peab toimuma nukleotiidi vahetus - GDP asendub GTP'ga. Seda vahetusreaktsiooni viib läbi EF-Ts. EF-Tu sõltuvad reaktsioonid on kujutatud joonisel 8.20.

Järgmine reaktsioon elongatsioonitsükli on **peptiidsideme süntees**. Peptiidside moodustub aminoatsüül-tRNA α -aminogrupi nukleofiilse ataki tulemusena peptidüül-tRNA peptidüül-estersidemesse (vt. joon 8.21). Teiste sõnadega, aminohape, mis on tRNA 3' otsas, reageerib oma aminorühma kaudu peptidüül-tRNA karboksüülrühmaga ehk veelkord teisiti öeldult, peptiidjääk kantakse peptidüül-tRNA'lt üle aminoatsüül-tRNA'le. Kuna peptiidsideme sünteesi käigus kantakse peptiidjääk üle siis nimetatakse seda reaktsiooni ka **peptidüül-transferaaseks reaktsiooniks**. Keemilises mõttes on peptiidsideme süntees kõige tähtsam ribosoomi poolt katalüüsitud reaktsioon, kuna kõik teised reaktsioonid on mittekovalentsete komplekside moodustamised, mis seejärel jälle lagunevad. Selle reaktsiooni produktid on ühe aminohappe võrra pikem peptidüül-tRNA ja vaba tRNA (deatsüül-tRNA). Peptiidsideme sünteesi katalüüs on ribosoomi suurema subühiku integraalne funktsioon, mis ei vaja ribosoomiväliseid lisafaktoreid. Ribosoomide peptiidsideme moodustumist katalüüsiv tsepter nn.

peptidüültransferaasne tsepter, koosneb nii rRNA'st (23S rRNA) kui ribosoomi suurema subühiku valkudest. Peptidüültransferaases tseptris on kaks tRNA 3' otsa sidumiskohta, üks aa-tRNA ja teine peptidüül-tRNA CCA järjestuse jaoks. Peptidüül-tRNA 3' otsa CCA järjestus on vähemalt osaliselt paardunud 23S rRNA'ga. On kindlaks tehtud Watson-Crick tüüpi aluspaar tRNA nukleotiidi C73 ja 23S rRNA nukleotiidi G2252 vahel. Peale peptiidsideme moodustumist või ka selle reaktsiooni käigus paiknevad tRNA'de 3' otsad ribosoomis ümber. Värskest sünteesitud peptidüül-tRNA 3' ots asetub endise peptidüül-tRNA kohale ja viimane omakorda (mis on nüüdseks oma peptiidjäagi kaotanud ja on muutunud deatsüül-tRNA'ks) liigub deatsüül-tRNA spetsiifilisse E saiti. Peptidüül-tRNA paiknemise kohta ribosoomis näitab selle võime reageerida puromütsiiniga. **Puromütsiin** on antibiootikum, Tyr-tRNA 3' otsa analoog (joon. 8.22), seega aminoatsüül-tRNA 3' otsa analoog, mis võib peptiidsideme sünteesil viimast asendada. Kasvav peptiidahel võidakse puromütsiinile üle kanda ja sel juhul muidugi katkeb mRNA suunatud peptiidahela pikenemine, kuna puromütsiin koos peptiidahelaga lahkuvad ribosoomilt. Puromütsiiniga reageerib ainult P saidis asuv peptidüül-tRNA. Vahetult peale uue peptiidsideme moodustamist, kui peptidüül-tRNA on A saidis, ei ole ta võimeline puromütsiiniga reageerima. A ja P saidid ongi ajalooliselt määratud peptidüül-tRNA võime järgi osaleda reaktsioonis puromütsiiniga.

Järgmine reaktsioon ribosoomi elongatsioonitsükli on **translokatsioon**, mille käigus mRNA kompleks, mis koosneb mRNA'st koos kahe tRNA'ga nihkub ribosoomis ühe koodoni võrra edasi. Peale translokatsiooni asetub peptidüül-tRNA tervenisti ribosoomi P saiti ja deatsüül-tRNA asetub ribosoomi E saiti. Seda ümberpaiknemise reaktsiooni katalüüsib elongatsioonifaktor G (EF-G) koos GTP'ga. Peale translokatsiooni või ka selle käigus toimub EF-G'1 GTP hüdrolüüs ja EF-G koos GDP'ga lahkeb ribosoomist (joonised 8.23 ja 8.24). EF-G seostub G nukleotiididega nõrgalt ja ei vaja nukleotiidi vahetuseks lisafaktorit nagu seda vajab EF-Tu. Ribosoomi translokatsioon on huvitav ja kompleksne protsess, milles on veel palju ebaselget ja mille kohta on mitmeid

vasturääkivaid mudeleid. Muuhulgas on ebaselge GTP osa translokatsioonis. Üks huvitav fakt ribosoomi elongatsioonifaktoritega seotud reaktsioonides on EF-Tu ja EF-G seundumine ribosoomi sama piirkonnaga (faktorite sidumistsentriga). EF-G ruumiline struktuur on sarnane EF-TuGTP^{aa}-tRNA kompleksi struktuuriga, kusjuures üks EF-G struktuurne domään sarnaneb tRNA antikoodon ling-õlg omaga st. valguline EF-G osa meenutab RNA struktuuri. Sellist struktuurset sarnasust eri molekulide vahel nimetatakse **molekulaarseks mimikriks**. Translokatsiooni käigus asendab EF-GGTP ribosoomi A saidis EF-TuGTP^{aa}-tRNA kompleksi, mis on tõenäoliselt üheks translokatsiooni molekulaarseks aluseks. Ka teised GTP'd hüdrolüüsivad translatsioonifaktorid (IF-2, RF-3) sisaldavad elongatsioonifaktoritega sarnast domääni, mis tõenäoliselt seondub ribosoomis sama piirkonnaga kui EF-Tu ja EF-G. Ribosoomi faktorite sidumistsenter koosneb nii valkudest (suurema subühiku valgud L7/12) kui kahest eri piirkonnast 23S rRNA's.

Ribosoomi struktuuri alased artiklid:

- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**, 615-623.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr., W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D. and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**, 883-896

Ribosoomi elongatsioonitsükli mudelid

Peptiidahela terminatsioonil osalevad terminatsioonifaktorid RF-1, RF-2, RF-3 ja RRF. Nimed tulenevad sõnadest *release* (vabanema ingl. k.) ja *factor*, RRF tuleneb *ribosome release factor*'ist. Terminatsioonifaktorid RF-1 ja RF-2 tunnevad kumbki ära kaks terminaator-koodonit. RF-1 seondub spetsiifiliselt UAA ja UAG stop-koodoniga (kooditabelis asuvad need koodonid kõrvuti vertikaalselt). RF-2 tunneb ära stop-koodoneid UAA ja UGA (kooditabelis horisontaalsed naabrid). Seega tunnevad mõlemad terminatsioonifaktorid ära stop-koodoni UAA ja ülejäänud stop-koodonite jaoks on kummalegi oma faktor. Seepärast pole üllatav, et UAA on kõige tugevam ja kõige sagedamini esinev stop-koodon bakterites. RF-1 ja RF-2 käituvad ribosoomis nagu tRNA molekulid seondudes ribosoomil samasse piirkonda (A saiti) interakteerudes nii 30S kui 50S subühikutega. Seega on ka siin tegemist molekulaarse mimikri nähtusega. Terminatsioonifaktorid RF-1 ja RF-2 vajavad seundumiseks ribosoomi A saidis eksponeeritud vastavat stop-koodonit ja P saidis polüpeptidüül-tRNA'd. Kui ribosoomis on lühike peptidüül-tRNA, siis ei ole terminatsioonifaktorite seundumine ribosoomidega stabiilne ja järelikult on terminatsiooni toimumine vähese efektiivsusega. RF-3 seondub ribosoomiga siis kui ribosoomis on juba RF-1 või RF-2. RF-3 stimuleerib RF-1 ja RF-2 suunatud reaktsiooni, peptidüül-tRNA hüdrolüüsi, mille tulemusena vabaneb ribosoomist polüpeptiidahel. mRNA vabanemiseks on vajalik RRF.

Stop koodonid ei ole ribosoomis võrdsed valgusünteesi lõpetamise suunamisel. Kuigi stop-koodonitele ei vasta otseselt ükski tRNA, tuleb siiski arvestada, et

terminatsioonifaktorite kontsentratsioon rakus on suhteliselt madal ja et stop-koodonile lähedast koodonit transleerivad tRNA'd võivad osaleda stop-koodoni transleerimisel (vt. ka suppressor tRNA). UGA koodonile on lähedane UGG koodon, mis vastab trüptofaanile. Trüptofaani lülitatakse väikese sagedusega UGA stop-koodoni kohale. Selline "vigane" translatsioon viib normaalsest pikemate valkude sünteesile. Stop-koodonite transleerimist nimetatakse ka "ütelugemiseks" (*readthrough* ingl. k.). Ütelugemine on rakkude eluks vajalik protsess. Mõnede valkude pikemad vormid omavad kindlat regulaatorset tähtsust. UAA on kõige tugevam stop-koodon ja selle koodoni kohale aminohapet ei lülitata. Seepärast on stop-koodoni valik valgu sünteesil oluline parameeter.

Selenotsüsteiini (Sec) kodeerib UGA stop-koodon. Selenotsüsteiin esineb vaid vähestes valkudes (E. coli's kahes valgus ja needki on vajalikud ainult anaeroobsetes tingimustes). Selenotsüsteiini lülitumist valkudesse määravad kolme geeni produktid. Neist esimene kodeerib tRNA'd, mis aminoatsüleeritakse seriiniga. Teine geen kodeerib Sec süntetaasi, ensüümi mis muudab tRNA'ga seotud seriini selenotsüsteiiniks. Kolmas geen aga on spetsiifiline EF-Tu, mis seondub ainult Sec-tRNA^{Ser} ga. Sec sünteesi määravad geenid indutseeritakse ainult anaeroobsetes tingimustes, tavalistes, aeroobsetes tingimustes kasvavates bakterites need geenid ei avaldu. Sec lülitumiseks valgu kindlasse kohta ei piisa siiski neist kolme geeni produktidest. mRNA's on Sec'i kodeeriva UGA järel eriline juuksenõel struktuur, mis tekitab ribosoomi peatumise. UGA koodoni kohal toimub konkureerimine Sec-tRNA ja RF-2 vahel. Tõenäoliselt toimub Sec lülitumine ainult osadel valkudel ja teistel toimub sel kohal terminatsioon. Eriline, Sec-spetsiifiline EF-Tu ei lase selenotsüsteiini lülitada stop-koodonina funktsioneerivate UGA koodonite kohale.

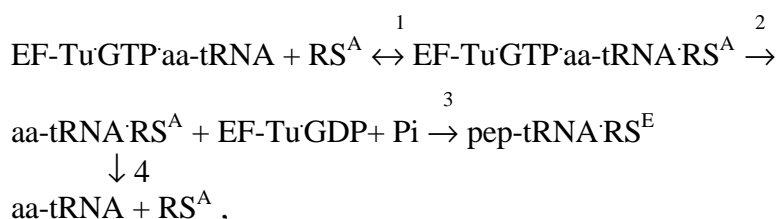
Suppressor tRNA ja translatsiooni täpsus. Valgu geenides toimuvad mutatsioonid võivad tekitada lugemisraamis stop koodoneid, mis viivad valgu lühenemisele ja valgu funktsiooni kadumisele. Sellistest kahjulikest mutatsioonidest saavad organismid üle suppressor tRNA'de abil. Suppressor tRNA'd võivad transleerida nii stop koodoneid (neid kutsutakse nonsens suppressoriteks) kui aminohappeid kodeerivaid koodoneid teise aminohappena (misens suppressorid) ja muuta valgusünteesi lugemisraami (raaminihke suppressorid). Suppressor tRNA'd on võimelised ära tundma stop koodoneid ja suunama stop koodonist sõltuvalt peptiidahelasse aminohappe lülitumist. Eriti sagedased on suppressor tRNA'd miko-organismides. Mutatsioonid tRNA antikoodonis võivad viia stop koodonile komplementaarse antikoodoni tekkele ja nii saabki alguse suppressor tRNA. Mõned näited suppressor tRNA'dest on järgnevas tabelis:

Suppressor tRNA'd. Koodonid on 5' 3' suunas, antikoodonid on vastupidises suunas, st. 3' 5'. Muteerunud nukleotiidid antikoodonis on näidatud rasvases kirjas.

tRNA geeni lookus	aminohape	algne koodon/anitk.	suppressor antik. / koodon
supD (su1)	Ser	UCG CGA	CUA UAG
supE (su2)	Gln	CAG CUG	CUA UAG
supF (su3)	Tyr	UAC GUA UAU	CUA UAG
supC (su4)	Tyr	UAC GUA UAU	UUA UAA UAG
supG (su5)	Lys	AAA UUU	UUA UAA

		AAG		UAG
supU (su7)	Trp	UGG	CCA	UCA
				UGA
				UGG

Tabelist on näha, et kõik suppressor tRNA'd on tekkinud ühe punktmutatsiooni tagajärjel. supC ja supG transleerivad üheaegselt kahte stop koodonit UAA ja UAG. supU suudab transleerida nii stop koodonit (UGA) kui normaalset trüptofaani koodonit (UGG). Suppressor tRNA geenid tekivad piisavalt kõrge sagedusega et tagada bakterite kasv ka nonsens mutatsiooni korral elutähtsas geenis. Neid on võimalik selekteerida kasutades bakterite nonsense mutatsiooniga geeni, mis on mikroobide kasvuks vajalik. Sellist selektsiooniskeemi kutsutakse vahel “viga parandab vea” printsiibiks. Suppressor tRNA'de puhul tekib küsimus: kuidas on bakteritel, mis sisaldavad stop koodonit transleerivat tRNA'd, võimalik veel valgusünteesi terminatsioon, mis nõuab stop koodoni äratundmist terminatsioonifaktori poolt. Vastuse sellele küsimusele annab valgusünteesi kineetiline mudel. Ensümaatiliste protsesside täpsuse määramisega kineetiliste parameetrite erinevuse alusel puutusime juba kokku aminoatsüül-RNA sünteesi juures. Valgusüntees on dünaamiline protsess, mille kiiruse määravad substraatide kontsentratsioon ja ensüüm – substraat komplekside moodustumise kiirus ja taskaal. Eriti oluline on dünaamiline aspekt aa-tRNA'de valiku juures. Ribosomaalse valgusünteesi vigade sageduseks on mõõdetud 10^{-4} st. üks viga 10 000 õigesti transleeritud koodoni kohta. Valgusünteesi täpsuse määrab põhiliselt ribosoomi A saidis toimuv aa-tRNA selektsioon vastavalt eksponeeritud mRNA koodonile. See valik toimub kaheastmelisena: esmane valik toimub kolmikkomplekside (EF-TuGTP:aa-tRNA) seondumise tasemel, ja teine valikuetapp toimub peale EF-Tu suunatud GTP hüdrolüüsi aga enne peptiidsideme moodustumist. Nagu juba eespool kirjeldatud toimub kolmikkomplekside valik stohhastiliselt st. iga aa-tRNA põrkub juhuslikult ribosoomi A saidiga. Kolmikkompleksid, mille aa-tRNA antikoodon paardub vähemalt kahe koodoni järjestikuse nukleotiidiga, indutseerivad ribosoomiga seondumisel EF-Tu'1 GTP hüdrolüüsi. Peale GTP hüdrolüüsi dissotseeruvad ribosoomilt EF-TuGDP kompleks. Selles etapis võib toimuda ka aa-tRNA dissotsiatsioon juhul kui koodon-antikoodon kompleks ei ole kõigi kolme nukleotiidipaari ulatuses paardunud. aa-tRNA dissotsiatsioon ribosoomilt peale EF-Tu suunatud GTP hüdrolüüsi ongi tRNA selektsiooni teine etapp nn. “kineetiline veerulugemine”. Piltlikult väljendudes mõõdetakse teises selektsiooni etapis koodon-antikoodon seondumise stabiilsust aja skaalal – kui antikoodon seondub koodoniga stabiilselt siis püsib kompleks piisavalt kaua ja ribosoom katalüüsib peptiidsideme moodustumist, mis muudab reaktsiooni pöördumatuks. Kui aga koodon-antikoodon seondumine ei ole piisavalt stabiilne, siis ei jõua peptiidside moodustuda ja aa-tRNA lahkeb ribosoomist. On leitud ribosoomi mutante (mutatsioonid ribosoomi valgus S12 või rRNA's) mille puhul selektsioon on nii tugev, et ka õige aa-tRNA peab läbima rohkem kui ühe valikutsükli enne kui aminohape lülitub kasvavasse peptiidahelasse. Need mutatsioonid viivad nn. “ülitäpsele” valgusünteesile ja neis bakteritüvedes toimub nonsens suppressioon väga väikese efektiivsusega. Ribosoomidel toimuvat kaheastmelist aa-tRNA valikut iseloomustab järgmine skeem:



kus RS^A on vaba A saidiga ribosoom, RS^E on ribosoom peale peptiidside moodustumist, Pi on anorgaaniline fosfaat, mis tekib GTP hüdrolyüsil. Numbriga on tähistatud reaktsioonid: 1. on aa-tRNA valiku esmane etapp. See reaktsioon on pöörduv, stabiilne kompleks ribosoomi ja kolmikkompleksi vahel tekib ainult siis kui vähemalt kaks järjestikust antikoodoni nukleotiidi paarduvad mRNA koodoniga. 2. reaktsioon on GTP hüdrolyüs EF-Tu'l, mida indutseerib koodon – antikoodon paardumine. 3. reaktsioon on peptiidside süntees, mille tulemusel tekib üha aminohappe võrra pikem peptidüül-tRNA. See reaktsioon viib peptiidahela pikenemisele. 4. reaktsioon on mitteproduktiivne dissotsiatsioon peale GTP hüdrolyüsi. Seda protsessi nimetatakse ka "*proofreading*'uks" e. veeruparanduseks. 2., 3. ja 4. reaktsioon on pöördumatud.

Suppressor tRNA'd on tavalistega võrreldes "vähemvõimekad", nad ei lülita mitte iga valikutsükli käigus aminohapet peptiidi. Suppressor tRNA'de poolt moodustuvad kolmikkompleksid seonduvad ribosoomidega vähempüsivalt ja neil on suurem tõenäosus dissotseeruda peale EF-Tu suunatud GTP hüdrolyüsi. Seepärast suunavad suppressor tRNA'd stop koodoni transeerimist ainult väikese efektiivsusega, enamikel juhtudel toimub stop koodoni kohal siiski terminatsioon. Suppressor tRNA ja terminatsioonifaktorite vahelises konkureerimises on terminatsioonifaktoritel peaaegu alati ülekaal. Suppressor tRNA juuresolekul toimub vastav stop koodoni transleerimine sense koodonina alla 50%, mis on siiski piisav muteerunud valgugeeni translatsiooniks ja samas viib suppressor tRNA ka normaalsete valkude pikenemisele, aga seda siiski alla 50% juhtudest. Nii saab rakk vajaliku valgu ja ka peptiidahela terminatsioon saab toimuda piisava sagedusega. Siin tuleb arvestada, et enamikul valgugeenidel on stop koodonid väikese vahega korratud, kui ei toimu terminatsioon esimesel stop koodonil, siis järgmisel toimub see juba suure tõenäosusega, eriti kui on tegemist erinevate stop koodonitega. Lisaks on normaalsed stop-koodonid sobivas järjestuse kontekstis, mis suurendab terminatsiooni tõenäosust ja vähendab suppressiooni efektiivust. Raaminihke ja misense suppressorid on veelgi väiksema "võimekusega" kui nonsense suppressorid. See on ka mõistetav, arvestades milliseid tagajärgi nad võivad kaasa tuua lülitades aminohappeid metsiktüübi valkudesse.

Valgusünteesi täpsusega on seotud ka **valgusünteesi protsesiivsus**, mis näitab kui suur osa alustatud valkudest lõpuni sünteesitakse. Valgusünteesi protsesiivsus on hämmastavalt kõrge arvestades kui palju erinevaid põhjusi võivad viia protsesiivsuse vähenemisele. Prokarüootides sõltub valgusünteesi protsesiivsus ka RNA sünteesi protsesiivsusest, mis on tingitud translatsiooni ja transkriptsiooni seotusest (**polaarne efekt** vt. transkriptsiooni regulatsioon). Põhiline põhjus, mis vähendab valgusünteesi protsesiivsust on pep-tRNA lahkumine (dissotsiatsioon) transleerivatelt ribosoomidelt. Raku elutegevuseks on väga oluline, et alustatud valgud ka lõpuni sünteesitakse, poolikud valgud võivad põhjustada mitmete protsesside häirimist rakus.

Kui valgusüntees lõpeb enneaegselt mRNA katkemise tõttu, siis on selliste poolikute valkude lagundamiseks eraldi süsteem. Mittetäielikele valkudele lisatakse C-otsa eriline aminohapete järjestus, mis on valgu lagundamise (degratatsiooni) signaaliks ja sellist järjestust (järjestuse märg, *sequence tag*) kandev peptiid lõhutakse proteaaside poolt aminohapeteks. Kui ribosoomi A saiti satub katkenud mRNA st. ei ole normaalset kolmenukleotiidist koodonit, siis seonduv ribosoomiga eriline RNA, **10Sa RNA**.

Viimane molekul täidab üheaegselt nii tRNA kui mRNA funktsioone ja seda nimetatakse seepärast **tmRNA**'ks. tmRNA sarananeb osaga tRNA'st, nimelt selle aktseptoorse ja T-õlaga, mis moodustavad nii tmRNA's kui harilikel tRNA'des liitunud heeliksi (vt. tRNA struktuur). tmRNA sisaldab aminohappealaniiniiniga liitumiseks

vajalikke nukleotiide (RNA determinante) ja on seega substraadiks alanüül-tRNA süntetaasile. Lisaks tRNA'ga sarnanevale osale sisaldab tmRNA ka mRNA järjestust ja üleminekujärjestusi. Kui tmRNA on aminoatsüleeritudalaniiniga siis moodustab ta kompleksi EF-Tu ja GTP'ga ning selline kolmikkompleks, mis sarnaneb aa-tRNA poolt moodustatava kompleksiga, seondub ribosoomi A saiti juhul kui seal ei ole korrektset tripletset koodonit. Peale Ala-tmRNA seondumist ribosoomiga toimub EF-Tu'1 GTP hüdrolyüs ja EF-TuGDP vabaneb ning kasvav peptiidahel kantakse üle alaniniinele. Peale EF-G ja GTP suunatud translokatsiooni satub peptidüül-tmRNA ribosoomi P saiti ja katkenud mRNA ning detatsüül-tRNA lahkuvad ribosoomist. Nüüd satub ribosoomi dekodeerivasse tsentrisse tmRNA osa, mis asendab mRNA'd ja kodeerib spetsiifilist järjestust suunates valgu lagundamise teele. Seega täidab tmRNA kõigepealt tRNA, seejärel nii tRNA kui mRNA ja lõpuks ainult mRNA funktsiooni. tmRNA lugemisraam (kodeeriv järjestus) lõpeb stop-koodoniga, mis suunab valguahela lõpetamisele. Peale tmRNA poolt "märgitud" valgu vabanemist ribosoomidelt see lagundatakse. Nii ei saa osaliselt sünteesitud valgud eksitada raku normaalset elutegevust.

Eukariootse translatsiooni eripära

Eukariootsetes (päristuumsetes) rakkudes toimub valgusüntees põhiliselt sama skeemi kohaselt nagu prokariootideski. Nagu eespool kirjeldatud, on eukariootide ribosoomid suuremad ja sisaldavad suhteliselt rohkem valku. tRNA molekulid on eukariootides sama suured kui bakteris. Nagu prokariootides, on ka eukariootides initsiaatorne tRNA eriline metionüül-tRNA, mida aga ei formuleerita. Tähistus: Met-tRNA_i^{Met}.

mRNA ehitus eukariootides on võrreldes prokariootsete mRNA-dega oluliselt erinev:

1. Eukariootne mRNA on reeglina (>90%) monotsistronne ja kodeerib seega ainult ühte valku. Prokariootne mRNA on reeglina polütsistronne st. kodeerib mitut erinevat valgu molekuli (ühes mRNA molekulis on mitu ORF'i ehk avatud lugemisraami).
2. Transkriptsiooni käigus lisatakse eukariootse mRNA 5' otsa m7G cap struktuur (m7GpppNpNpN). m7G cap on mRNA-ga ühendatud 5'-5' sidemega, seega on eukariootsel mRNA'l kaks 3' otsa, algne 5' ots on aga cap struktuuriga peidetud. Prokariootis sellist struktuuri ei esine.
3. Eukariootse mRNA 3' otsas on kuni 200 nukleotiidi pikkune polü(A) järjestus, mis lisatakse mRNA 3'-mittetransleeritavas osas paiknevale polü(A) signaaljärjestusele (AAUAAA).
4. Eukariootse mRNA initsiaator-AUG on raamistatud spetsiifilise kontekst-järjestusega A/GNNAUGG, mida nimetatakse avastaja järgi Kozak'i konsensuseks ja mis soodustab oluliselt translatsiooni initsiatsiooni. Bakteris täidab sarnast rolli Shine-Dalgarno järjestus.

Eukariootides sünteesitakse mRNA tuumas, translatsioon toimub aga tsütoplasmas, seega on transkriptsioon ja translatsioon ruumiliselt lahutatud. Eukariootne mRNA läbib reeglina enne tsütoplasmasse jõudmist "protsessingu", mille käigus primaarsest transkriptist eraldatakse intronid ja lisatakse 5' otsa cap struktuur ning 3' otsa lisatakse poly(A) järjestus. Peale protsessingut transporditakse küps mRNA läbi tuumapooride tsütoplasmasse. Nii "cap" kui polü(A) on lisaks mRNA stabiilsusele ja transpordile vajalikud ka mRNA seondumiseks eukariootsete initsiatsioonifaktoritega ja soodustavad väga tugevalt translatsiooni initsiatsiooni. Initsiaatorkoodon AUG asub sageli 5' otsa läheduses (40-100 nt. cap'ist). Paljudel eukariootsetel mRNA'del on

initsiaator-koodon siiski cap-st väga kaugel, see vahe võib olla kuni tuhandeid nukleotiide. Initsiaator-AUG on raamistatud spetsiifilise kontekst-järjestusega A/GNNAUGG, mida nimetatakse avastaja järgi Kozak'i konsensusseks. Translatsiooni initsiatsiooni efektiivsus on maksimaalne kui AUG-st -3 positsioonis on A või G ja +4 positsioonis on G (vt eelpool allajoonitud tähti). Ainult ~ 35% eukarüootsetel mRNA-del on -3 ja +4 positsioonid mõlemad optimaalsed. Seega võib arvata, et 65% mRNA-dest on oma järjestusest tulenevalt initsiatsiooni tasemel allareguleeritud. Eukarüootse mRNA kodeeriv osa erineb prokarüootsest selle poolest, et sisaldab tüüpiliselt vaid üht tsistronit e. ORF'i. Erineva struktuuri tõttu ei ole mRNA eukarüootide ja prokarüootide vahel vahetatav, st. prokarüootne mRNA ei tööta eukarüootses valgusünteesis ja vastupidi, eukarüootne mRNA ei ole substraadiks prokarüootsetele ribosoomidele.

Kui translatsiooni elongatsioonitsükkel ja terminatsioon on pro- ja eukarüootides põhimõtteliselt sarnane, siis translatsiooni initsiatsioon on küllalt erinev. Arvatavasti peegeldab eukarüootse translatsiooni initsiatsiooni keerukus eukarüootse organismi suuremat vajadust geeniekspressiooni kontrollitavuse üle ka translatsiooni tasemel. Kui nii prokarüootis kui eukarüootis on 2 valgulist elongatsioonifaktorit, siis eukarüootil on bakteri 3 initsiatsioonifaktori vastu välja panna vähemalt 12 erinevat valku või mitmest valgust koosnevat kompleksi. Erinevaid translatsiooni kontrolli mehhanisme on eukarüootides nii palju, et neid üldkursuses puudutada ei jõua. Erinevate mRNA-de translatsiooni kontrollitakse initsiatsioonifaktorite (eIF-de), mRNA struktuuride, mRNA-ga seonduvate valkude, mRNA polü-adenüleerimise, mRNA rakulise lokaliseerimise jm kaudu.

Prokarüootides toimub enamasti sisemine initsiatsioon st. mRNA sisaldab mitut tsistronit ja valgusüntees toimub kõigil initsiaator-koodoni ja Shine-Dalgarno järjestusega varustatud lugemisraamid. Eukarüootidel on valdav (>95% mRNA-dest) initsiatsioon mRNA 5' otsale kõige lähemal asuvalt initsiaator-koodonilt. AUG koodonite või tugevate (> -50 kJ/Mol) RNA sekundaarstruktuuride tekitamine 5' cap-i ja valku kodeeriva lugemisraami vahele inhibeerib sellelt translatsiooni või kaotab selle sootuks.

Siit tuleneb klassikaline skaneeriv translatsiooni initsiatsiooni mudel, mille kohaselt ribosoom seostub mRNA-le 5' cap-st sõltuvalt ning koos initsiaator-tRNA'ga skaneerib mRNA-d 5'→3' suunas kuni esimese õiges kontekstis initsiaator-koodonini kus toimub valgusünteesi initsiatsioon.

Initsiatsioonikompleksi moodustumine toimub järgmiste etappide kaudu:

1. eIF1A ja eIF3 seonduvad ribosoomi 40S alaühikuga, tekib 43S kompleks. eIF3 takistab 60S alaühiku seondumist 40S-ga.

2. 43S kompleks seob Met-tRNA_i^{Met}-eIF2-GTP kompleksi.

3. eIF4E, eIF4G ja eIF4A (neid kolme valku koos kutsutakse eIF4F-ks) seonduvad mRNA 5'-otsaga. eIF4E on mRNA cap-i siduv valk, eIF4A on RNA helikaas, mis harutab lahti RNA sekundaarstruktuuri. eIF4G on selles cap-i siduvas kompleksis adaptorvalk. **eIF4G seob teisi initsiatsioonifaktoreid (eIF3, eIF4E, eIF4A ja Pab1p valku), moodustades koos 43S ribosoomi kompleksiga uue, 48S kompleksi.** Pab1p on valk, mis seondub mRNA 3' polü(A) struktuuriga. Seega tuuakse translatsiooni initsiatsioonil mRNA mõlemad otsad lähestikku.

3. 48S kompleks skaneerib 5'→3' suunas kuni esimese sobivas kontekstis initsiaator-koodonini. Skaneerimiseks on sünergistlikult vajalikud eIF1 ja eIF1A valgud.

4. Nüüd seondub 60S alaühik kompleksis eIF5-ga. eIF5 katalüüsib GTP hüdrolyüsi eIF2-l.

5. Ribosoomi alaühikute antiassotsatsioonifaktorid (eIF-3, eIF5) ja eIF2-GDP vabanevad, valgusünteesi elongatsioon võib nüüd alata.

Eukariootsed translatsioonifaktorid

Initsiatsioonifaktorid:

eIF1 (15 kDa) koos eIF1A-ga (16 kDa) on vajalik 43S-i skaneerimiseks mRNA-l.

eIF2 (koosneb 3 valgust: α - 35 kDa, β - 38 kDa ja γ -52 kDa). α alaühiku fosforüleerimine inhibeerib translatsiooni initsiatsiooni peatades eIF2-GTP kompleksi tekke. See fosforüleerimine kutsutakse esile näiteks viirusinfektsiooni korral, et pidurdada viiruse elutsükli rakus. β ja γ alaühik osalevad Met-tRNA_i ja GTP sidumisel. Seega on eIF2 bakteri IF2 analoog.

eIF2B (5 alaühikut). Katalüüsib G nukleotiidi vahetust eIF2-l.

eIF3 (8-10 alaühikut, 650 kDa). Seob ribosoomi 40S alaühikut, ei lase sel seonduda 60S-ga. Seob ka eIF4G-d.

eIF4A (25 kDa). RNA helikaas, nõrgendab mRNA sekundaarstruktuuri ATP hüdrolüüsist sõltuvalt.

eIF4B (80 kDa). Stimuleerib eIF4A helikaasset aktiivsust, seostub mRNA-ga.

eIF4E (24 kDa). Seob mRNA 5'cap struktuuri. eIF4E on translatsiooni initsiatsioonil limiteeriv faktor. Üle selle valgu toimub translatsiooni aktiveerimine vastusena insuliinile või kasvufaktoritele, viirusinfektsioonil aga võib üle eIF4E toimuda ka cap-sõltuva valgusünteesi inhibitsioon.

eIF4G (220 kDa). Molekulaarne adaptor, seob eIF4E, eIF4A, eIF3, Pab1p.

eIF5 (125 kDa). Ribosoomist sõltuv GTPaas, soodustab ribosoomi alaühikute ühinemist.

eIF6 (25 kDa) Seob 60S alaühikut, põhiline antiassotsiatsioonifaktor.

Elongatsioonifaktorid

eEF1 (3 alaühikut: 51 kDa, 48 kDa ja 35 kDa). Seob GTP-sõltuvalt aa-tRNA-d, omab ka GDP-GTP vahetusaktiivsust. Seega EF-Tu ja EF-Ts analoog.

eEF2 (95 kDa). Bakteri EF-G analoog, translokatsiooni faktor.

eEF3 (125 kDa). Ainult pärmis, katalüüsib tRNA dissotsiatsiooni ribosoomi E-saidist. On ribosoomist sõltuv GTPaas ja ATPaas.

Eukariootides on leitud üks universaalne terminatsioonifaktor:

eRF (54 kDa dimeer). Põhjustab terminatsioonikoodonist sõltuvat valgusünteesi terminatsiooni. Kuna eukariootide valgusünteesi terminatsiooni on seni suhteliselt vähe uuritud, siis on tõenäoline, et on veel avastamata terminatsioonifaktoreid (näiteks prokarüootse RRF'i analoog).

On leitud eukariootseid mRNA-sid kus 5'cap-i ja valku kodeeriva lugemisraami vahel on tuhandeid nukleotiide. Need mRNA-d sisaldavad oma 5'-mittekodeerivas osas tugevaid RNA sekundaarstruktuure ja sageli ka kümneid AUG koodoneid. Selliste mRNA-de translatsiooni initsiatsioon ei saa toimuda skaneerimise teel. On teada, et nende mRNA-de sekundaarstruktuurid juhivad kuidagi 40S alaühiku õige initsiaatorkoodoni lähedale. Sisemist translatsiooni initsiatsiooni suunav struktuuri mRNA's kannab nime IRES (**internal ribosome entry site**). Sellist cap-st sõltumatut translatsiooni kasutavad mitmed rakulised mRNA-d (TBP, FGF2, IGF2, antennapedia, ultrabithorax, eIF4G, BiP jt) ja paljud viiruste mRNA-d. Sisemist initsiatsiooni kasutavad rakulised mRNA-d kodeerivad enamasti proto-onkogeene või arengugeene, mille ekspressiooni on oluline täpselt reguleerida. Paljud viirused kasutavad cap-st sõltumatut translatsiooni initsiatsiooni, et selektiivselt inhibeerida peremeesraku cap-st

sõltuvad translatsiooni ja suunata peremehe valgusünteesi aparaat eelistatult viiruse valke tootma.

Osad viirused (hepatiit C) suudavad oma sisemist initsiatsiooni kasutaval mRNA-l initsiaatorkoodonit ära tunda kasutades vaid ribosoomi 40S alaühikut, Met-tRNA_i^{Met}, eIF2 ja GTP-d. See kompleks faktoreid vastab aga täpselt prokarüootseks initsiatsiooniks vajaliku faktorite komplektiga. Seega tundub, et eukarüootse translatsioon suurem keerukus on ehitatud konserveerunud prokarüootset päritolu initsiatsioonimehhanismile. Seega ei ole eukarüoot oma translatsioonimehhanismi mitte uuesti üles ehitanud vaid lihtsalt prokarüootset translatsioonitäiendanud, et tagada protsessi paremat kontrollitavust.

Valkude kotranslatsiooniline transport eukarüootides.

Valgusünteesi inhibeerivad antibiootikumid ja ribosomaalse RNA funktsioonid.

Antibiootikumid on madalmolekulaarsed ained, mis pidurdavad mikroobide elutegevust ja paljud neist on sedamööda kasutusel ravimitena. Varem tuntud antibiootikumid olid pärit mikro- või ka hulkraksetest organismidest (looduslikud antibiootikumid). On huvitav, et ka inimese organism toodab mitmeid antimikroobseid aineid, nn. defensiine, mis on oma keemiliselt loomuselt lühikesed peptiidid ja nad on geneetiliselt kodeeritud st. igale defensiinile vastab oma geen. Tänapäeval on kasutusel suur hulk sünteetilisi antibiootikume, mis on kas looduslike ravimite derivaadid või täiesti uued keemilised ühendid. Enamasti on antibiootikumid madalmolekulaarsed ained. Antibiootikumidel on väga palju paralleelnimesid, iga ravimifirma kasutab sama toimeaine tähistamiseks eri nime. Mikrobioloogias on siiski kasutusel iga aine jaoks üks nimi. Suur osa antimikroobsetest ainetest, mida kasutatakse inimese ja loomade ravimisel, toimivad valgusünteesi aparaadile. Siinkohal käsitleme mõningaid neist, mis toimivad kas otse ribosoomile või on seotud elongatsioonifaktorite poolt suunatud protsesside inhibeerimisega. Antibiootikumidel on spetsiifilise seondumise piirkond mõne ribosoomi aktiivtsentri läheduses ja nad inhibeerivad reeglina põhiliselt üht ribosoomi osareaktsiooni. Lisaks valgusünteesi inhibitsioonile ja seeläbi ravimi omadustele on antibiootikumid olnud väga kasulikud ka valgusünteesi uurimisel. Parim näide on siinkohal puromütsiin. Puromütsiinist oli juba eespool juttu seoses ribosoomi tRNA sidumiskohtade ja peptiidsideme moodustumisega. Siin on kohane märkida, et antibiootikumid on olnud olulisteks abimeeteks valgusünteesi molekulaarsete mehhanismide väljaselgitamisel ja neid kasutatakse valgusünteesi uurimisel ka praegu. Alljärgnevalt vaatleme antibiootikume, valgusünteesi inhibiitoreid, vastavalt nende poolt mõjutatavatele protsessidele.

tRNA sidumist ja koodoni äratundmist (koodon-antikoodon interaktsiooni) mõjutavad rohud:

Aminoglükosiidid (streptomütsiin, neomütsiin, kanamütsiin, gentamütsiin, kasugamütsiin), inhibeerivad aa-tRNA seondumist ribosoomi A saiti ja koodon-antikoodon äratundmist. Streptomütsiin (Strp) on tuntud omaduse poolest indutseerida koodilugemise vigu st. valedes aminohapete lülitumist valkudesse. Kui normaalselt teevad bakteri ribosoomid ühe vea 10 000 õigesti lülitatud aminohappe kohta, siis streptomütsiini juuresolekul võib vigade sagedus kasvada 50 korda. Valest sünteesitud valgud ei suuda rakus täita vajalikke funktsioone ja kutsuvad esile proteaaside aktiveerimise. Selle tulemusena peatub valgusüntees ja raku kasv ning lõpuks järgneb raku surm. Peale valedlugemise vigade indutseerib streptomütsiin ja ka teised aminoglükosiidid translatsioonitäiendamise teket, mis on raku elu seisukohalt veelgi

kahjulikuma efektiga kui valelugemine. Enamus aminoglükosiidseid antibiootikume toimivad ainult prokarüootidele. Selline spetsiifika tuleneb eelkõige prokarüootsete ja eukarüootsete ribosoomide ehituse erinevustest.

Aminoglükosiidid on tugeva positiivse laenguga ained ja seonduvad ribosoomides põhiliselt 16S rRNA'ga. Seandumine ribosoomidega on väga spetsiifiline ja sageli ka väga stabiilne (streptomütsiin seondub ribosoomidega pea kovalentsele sidemele omase stabiilsusega). Prokarüootsetes ribosoomides takistavad aminoglükosiidid koodoni seandumist antikoodoniga või põhjustavad selle protsessi selektiivsuse vähenemist. Eukarüootsed ribosoomid aga ei seo enamusi aminoglükosiidseid antibiootikume. Küll aga seovad aminoglükosiide mitokondrite ribosoomid. Aminoglükosiidide seandumine põhiliselt rRNA'ga on olnud oluliseks argumendiks, millel põhineb veendumus, et ribosoomide katalüütilised tsentrid on ehitatud peamiselt RNA'st.

Bakterite resistentsuse aminoglükosiidsete ravimite suhtes tagavad mutatsioonid nii 16S rRNA's kui ribosoomi valkudes. Streptomütsiini resistentsust põhjustavad mutatsioonid vähemalt neljas erinevas 16S rRNA piirkonnas (primaarstruktuuril). Ribosoomi ruumilises struktuuris paiknevad kõik need piirkonnad siiski lähestikku. 16S rRNA mutandid, mis tagavad streptomütsiini resistentsuse, nõrgendavad oluliselt selle ravimi seandumist ribosoomidele. Ribosoomi valgu S12 mutatsioonid võivad samuti tagada streptomütsiini resistentsuse. Streptomütsiini resistentsed ribosoomid (S12 mutandid) transleerivad mRNA'd suurema täpsusega kui metsiktüübi ribosoomid. Seejuures ei mõjuta nad väga oluliselt streptomütsiini seandumist ribosoomidega. Viimase seandumisel väheneb küll translatsiooni täpsus aga jääb siiski raku taluvuse piiridesse.

Mikroobigeneetika seisukohalt on oluline, et S12 mutatsioonid mõjutavad nonsens suppressiooni aktiivsust. Suppressor tRNA'd, nagu juba eespool öeldud, ei konkureeri tavaliste elongaator tRNA'dega võrdselt. Tavalisest täpsemate ribosoomide aa-tRNA seleksioon on võimendunud ja seepärast ei suuda suppressor tRNA'd oma funktsiooni täita. See asjaolu näitab veelkord, et ribosoomidel on koodon-antikoodon äratundmises aktiivne osa. Mutatsioonid ribosoomi väiksema subühiku valkudes S4 ja S5 pööravad S12 sõltuvad streptomütsiini resistentsused ribosoomid taas ravimitundlikeks. Nimetatud valkude mutatsioonid ei mõjuta aga streptomütsiini seandumist ribosoomidega vaid suurendavad ribosoomi poolt tehtavate translatsiooni vigade sagedust. Neid mutatsioone nimetatakse ribosoomi võimekuse mutatsioonideks (ribosome ambiguity mutations - ram).

Tetratsükliin inhibeerib samuti aa-tRNA seandumist ribosoomi A-saiti. Tetratsükliin seondub nii pro- kui eukarüootsete ribosoomidega. Eukarüoodid ei ole aga tetratsükliini suhtes enamasti tundlikud, kuna rohi ei pääse eukarüootide rakkudesse. Väga huvitav on tetratsükliini resistentsuse mehhanism. Bakterites on leitud valk (TetO), mis tagab tetratsükliini resistentsuse. TetO valk eemaldab ribosoomidega seondunud tetratsükliini. See reaktsioon on sõltuv GTP hüdroliüsist. TetO valk ise aga on homoloogne elongatsioonifaktor G'ga (EF-G). Piltlikult väljendudes pumpab TetO valk ribosoomidest GTP hüdroliüsi abil seondunud tetratsükliini välja.

Peptiidsideme sünteesi ja peptiidahela pikenemist inhibeerivad antibiootikumid (koloroamfenikool, sparsomütsiin, erütromütsiin, linkomütsiin, klindamütsiin ja nukleotiidsed antibiootikumid). Peptiidsideme sünteesi inhibeerivad väga paljud antibiootikumid, millest siin käsitleme vaid mõnda. Kloroamfenikool ja sparsomütsiin

on kõige tüüpilisemad ensüümi inhibiitorid, nad seonduvad ribosoomi peptidüültransferaasse tsentri aktseptor saiti (ribosoomi A saidi osa, kuhu seondub tRNA 3' ots - CCA-aa), takistades aminoatsüül-tRNA (aktseptorsubstraadi) seondumist ribosoomi aktiivtsentrisse. Kloroamfenikool ja sparsomütsiin takistavad peptiidsideme moodustumist konkurentse inhibitsiooni kaudu.

Ribosoomide resistentsuse kloroamfenikooli ja sparsomütsiini suhtes tagavad mutatsioonid 23S rRNA's (domäänis V, nn. peptidüültransferaasses regioonis). Kuna resistentsuse nende peptiidsideme sünteesi inhibeerivate antibiootikumide suthes annavad mutatsioonid 23S rRNA's, siis on tõenäoline, et ribosoomi peptiidsideme sünteesi eest vastutav piirkond – peptidüültransferaasne tsepter – koosneb kas tervenisti või osaliselt 23S rRNA'st. rRNA kesket osa peptiidsideme sünteesil ja substraatide (aa-tRNA, pep-tRNA) sidumisel toetavad ka teised biokeemilised andmed. Mutatsioonanalüüsiga on tuvastatud, et pep-tRNA nukleotiid C74 paardub peptiidsideme moodustumise protsessis 23S rRNA numleotiidiga G2252 (moodustub Watson-Crick aluspaar). Ka fotoafiinsusmärkega substaatide ristsidumise, keemilise modifikatsiooni eest kaitsmise ja modifitseeritud substraatide selekteerimisega saadud tulemused viitavad 23S rRNA kindlate piirkondade, mis kõik asuvad domäänis V, lähedusele või otsesele osalusele ribosoomi peptidüültransferaasele tsentrile.

Erütromütsiin kuulub makroliidsete antibiootikumide rühma. Makroliidid (lisaks erütromütsiinile kuuluvad siia rühma veel paljud, näiteks karbomütsiin, spiramütsiin, leukomütsiin, nidamütsiin, oleandomütsiin) inhibeerivad peptiidahela pikenemist. Erütromütsiin blokeerib peptiidahela kasvu ribosoomis ainult sünteesi algusfaasis ja ei mõjuta ei translatsiooni initsiatsiooni ega peptiidi sünteesi kui ahel on pikem kui 6-7 aminohapet. Seepärast arvatakse, et makroliidid takistavad kasvava peptiid ja ribosoomi vahelist interaktsiooni, tõenäoliselt peptiidi sisenemist ribosoomi suuremat subühikut läbivasse tunnelisse. Erütromütsiini resistentsuse tagavad mutatsioonid ribosoomi valgus L4, L22 ja 23S rRNA's. Seega võib arvata, et erütromütsiin seondub ribosoomis nii suurema subühiku valkudega kui 23S rRNA'ga. Makroliidide sidumiskiirkond ribosoomis kattub osaliselt kloroamfenikooli sidumiskohaga. Makroliidide ja kloroamfenikooli seondumine ribosoomidele on teineteist välistav. Erütromütsiini, nagu paljude teiste antibiootikumide resistentsus bakterites, saavutatakse ka teiste mehhanismide abil peale mutatsioonide ribosoomi komponentides, näiteks permeaablust (ravimi transport bakterisse) mõjutavad mutatsioonid.

Linkomütsiin ja klindamütsiin (linkoosamiidid) inhibeerivad samuti peptiidsideme sünteesi ribosoomidel. Nad blokeerivad aminoatsüül-tRNA 3'-otsa (aktseptorsubstraadi) fikseerimist ribosoomi peptidüültransferaases tsentris ja on selle omaduse poolest sarnased kloroamfenikooliga. Viimasega aga samuti makroliididega on neil osaliselt kattuv sidumiskiirkond ribosoomidel. Mõned 23S rRNA mutatsioonidest, mis tagavad makroliidide resistentsuse annavad ka linkoosamiidide resistentsuse.

Peptiidsideme sünteesi ribosoomidel inhibeerivad ka nukleotiidsed antibiootikumid: amitsetiin, bamitsetiin, plikatsetiin, blastitsidiin S, gougerotiin.

Lisaks nimetatule veel terve rida antibiootikume takistavad peptiidsideme sünteesi ribosoomidel, millest mõned näited: glutaarimiidid (tsükloheksimiid, streptividoon), streptogramiinid (vernamiitsiin, virginiamiitsiin), krüptopleuriin, krototsiin.

Ribosomaalset translatsioonitakistust inhibeerivad tiostreptoos, viomütsiin ja spektinomütsiin. Neist esimene, tiostreptoos, seondub ribosoomi suurema

subühikuga. Tiostreptooni seondumiskoha moodutavad ribosoomi valk L11 ja 23S rRNA. Tiostrepton ja viomütsiin blokeerivad ribosoomi struktuurse muutuse, mis on vajalik translokatsiooni (mRNA ja 2 tRNA molekuli kompleksi liikumine ribosoomis ühe koodoni võrra) toimumiseks. Tiostrepton, aga mitte viomütsiin blokeerib ka elongatsioonifaktor G seondumise ribosoomidega, mis võimendab translokatsiooni inhibeerimist veelgi. Tiostreptooni resistentsuse tagavad 23S rRNA modifitseerimine või muteerimine ja valgu L11 puudumine ribosoomidest. Viomütsiini resistentsuse tagavad mutatsioonid nii 23S kui 16S rRNA's ja seega on põhjust arvata, et see ravim seondub mõlema ribosoomi subühikuga. Kuna viomütsiin on 8 aminohappe jäägist koosnev peptiid, siis peab tema seondumiskoht olema ribosoomi kahe subühiku vahel sest oma väikeste mõõtmete tõttu ei saaks ta muidu mõlema subühikuga seonduda. Spektinomütsiin, mis takistab EF-G seondumist ribosoomidega, blokeerib samuti translokatsiooni takistades EF-G suunatud reaktsiooni. Spektinomütsiini resistentsuse annavad ribosoomidele mutatsioonid ribosoomi väiksema subühiku valgus S5 ja 16S rRNA's. Spektinomütsiin seondub ainult ribosoomi väiksema subühikuga. On huvitav märkida, et EF-G seondub põhiliselt ribosoomi suurema subühikuga. Spektinomütsiini efekt translokatsioonile toimub ilmselt kahe subühiku omavahelise orientatsiooni muutmise kaudu.

Elongatsioonifaktoritega seonduvad antibiootikumid on kirromütsiin ja fusiidhape. Kirromütsiin seondub EF-Tu'ga aga ei takista EF-Tu komplekseerumist GTP ja aa-tRNA'ga. Kui selline nelik-kompleks seondub ribosoomi A saiti toimub küll EF-Tu suunatud GTP hüdrolyüs aga ei toimu EF-Tu ja GDP dissotsiatsiooni ribosoomidelt ja peptiidsideme sünteesi ning valgusünteesi elongatsioon peatub. Mutatsioonid EF-Tu's annavad resistentsuse kirromütsiini suhtes. Fusiidhappel on sarnane efekt, aga ta seondub EF-G'ga ja stabiliseerib EF-G·GDP kompleksi ribosoomiga takistades niiviisi järgmise elongatsioonitsükli toimumist.

Transkriptsioon

Ülevaade ja terminid

RNA süntees e. geneetiline transkriptsioon on RNA süntees DNA alusel, mis on geenide avaldumise peamine regulatsiooni tase. RNA polümeraasid (lühendid RNA pol; RNAP) on ensüümid, mis vastutavad RNA sünteesi eest. Seepärast on RNA polümeraas võtme-ensüümiks geenide aktiivsuse regulatsioonil. Just selle ensüümi vahendusel määratakse rakkudes millised geenid avalduvad, millal ja millises ulatuses. DNA sõltuv RNA polümeraas sünteesib DNA järjestuse alusel RNA ahela kasutades substraadina nukleosiid trifosfaate. Keemilisest seisukohast on tegemist polükondensatsiooni reaktsiooniga, mille käigus sünteesitakse fosfodietersidemed polünukleotiidahelasse ja reaktsiooni käigus vabanevad pürofosfaadi jäägid (vt. joonis 11.6). Nii nagu kõik nukleiinhapete biosünteesi reaktsioonid, kulgeb ka RNA süntees rakkudes 5' → 3' suunas. Rakuliste organismide RNA polümeraasid koosnevad paljudest subühikutest. Mitterakuliste mikro-organismide (viiruste) RNA polümeraasid, mis ei vaja keerukat regulatsiooni, võivad koosneda ka ühest polüpeptiidist. Transkriptsioon, nagu ka kõigi teiste makromolekulide sünteesi protsessid jagatakse kolmeks: **initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon**. RNA süntees algab DNA ahela kindlast kohast nn. **start saidist**. Enne kui süntees algab, peab RNA polümeraas seonduma DNA kindla piirkonnaga, mida kutsutakse geeni **promootoriks**. Promootorid on kindla järjestusega DNA lõigud (vt. allpool). Lisaks promootoritele on ka teisi DNA järjestuse elemente, mis suunavad transkriptsiooni alustamist. DNA järjestuse

elemente, mis osalevad samal DNA molekulil transkriptsiooni initsiatsioonil, kutsutakse *cis* järjestusteks või *cis* elementideks. RNAP seondub DNA promootorpiirkonnaga koos lisafaktoritega, mis hilisemal ahela pikendamisel (elongatsioonil) ei osale. Selliseid lisafaktoreid tuntakse *trans* faktorite nime all. Eriti palju on RNAP'ga seonduvaid *trans* faktoreid eukariootsetes organismides, kus *transkriptsiooni aktiveerivad faktorid* (lühend TAF) on määrava tähtsusega transkriptsiooni alustamisel. Lisafaktorid osalevad promootori äratundises ja aitavad RNAP'il seonduda "õige" DNA piirkonnaga. Ka RNA ahela pikendamisel (elongatsioonil) osalevad mitmed lisafaktorid, millest teeme juttu allpool. RNA sünteesi lõpetamine võib vähemalt prokariootides toimuda nii terminatsioonifaktorite osavõtul (ρ -sõltuv terminatsioon) kui ilma nendeta (ρ -sõltumatu terminatsioon). Eukariootide transkriptsiooni terminatsioonist on vähem teada, kuid see toimub tõenäoliselt ainult terminatsioonifaktorite vahendusel.

RNA polümeraasid

Pro- ja eukariootsete organismide ribosoomid on väga sarnased nii ehituselt kui talitluselt. RNA polümeraasid vahel on olulisi erinevusi pro- ja eukariootide vahel, samuti on RNA sünteesi regulatsioonis suuri erinevusi. Kui prokariootidel on üks aktiivne RNA polümeraas, siis eukariootidel on neid kolm. Vaatleme kõigepealt **prokariootset RNA polümeraasi** eubakterite näitel. Nagu eespool märgitud seonduvad transkriptsiooni eri etappidel RNAP'ga erinevad faktorid, millest mõnda peetakse ensüümi koostisosaks. *E. coli* **RNAP holoensüüm** (täisensüüm) koosneb neljast erinevast polüpeptiidist (valgust), millest üks on kahe koopiana. Holoensüümi erinevaid osi tähistatakse kreeka tähtedega. Holoensüümi komponendid ja neid kodeerivad geenid on toodud alljärgnevas tabelis:

Escherichia coli RNA polümeraasi subühikud ja nende geenid

geen	subühiku tähis	molekulmass
<i>rpoA</i>	α (alfa)	40 kDa
<i>rpoB</i>	β (beeta)	156 kDa
<i>rpoC</i>	β' (beeta prim)	160 kDa
<i>rpoD</i>	σ (sigam)	32-90 kDa

Holoensüümis on kaks α subühikut, üks β , üks β' subühik ja üks σ subühik ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) molekulmassiga 428-486 kDa. Transkriptsiooni elongatsiooni viib läbi põhi- e. tuumikensüüm ('core enzyme' ingl. k.), milles puudub σ subühik, seega $\alpha_2\beta\beta'$. σ subühik osaleb ainult translatsiooni initsiatsioonil suunates põhiensüümi seondumist promootoriga. Kuna bakteri kromosoomides on mitut tüüpi promootoreid, siis on ka neile vastavaid σ faktoreid mitu. Neist põhiline on σ^{32} , molekulmassiga 32 kDa, valk mis suunab suure enamuse bakteri geenide avaldumist.

1999. aastal avaldati kolm olulist tööd RNA polümeraaside ruumilisest struktuurist (vt. *Cell* vol. 98, Sep. 17), mis kirjeldavad pärmi RNAP II (kuni 6 Å lahutuse tasemel) ja bakteri *Thermus aquaticus* RNA polümeraasi põhiensüümi (3,3 Å lahutuse tasemel) ruumilist struktuuri.

Struktuursed andmed aitavad mõista kuidas toimub σ faktor stimuleerib RNAP seondumist promootoriga ja kuidas ensüümi struktuur muutub kinniseks peale 8 esimese nukleotiidi lülitumist kasvavasse RNA ahelasse. DNA kaksikahel, millelt toimub RNA transkriptsioon on seotud RNAP β ja β' subühikute vahele ning on seotud mõlemalt poolt ensüümi, seega teeb DNA kaksikahel poolkaare ümber RNAP ensüümi. RNAP maksimaalne läbimõõt on 150 Å, aga RNA sünteesi initsiatsiooni käigus katab RNAP

70-90 aluspaari DNA ahelast, seega 235-305 Å, mida seletab RNAP-DNA kompleksi kolmemõõtmeline struktuur, kus DNA pöörduv ümber RNAP ensüümi. DNA on transkriptsiooni käigus tihedalt seotud RNAP subühikute vahele, mis seletab transkriptsiooni kõrge protsessiivsuse.

Eukariootsest transkriptsioonist

Eukariootidel on reeglina rohkem geene kui prokariootidel. Näiteks imetajatel arvatakse olevat 40 000 erinevat geeni, kuna prokariootidel on neid rohkem kui 10x vähem. Seepärast on ka eukariootide geenide regulatsiooni mehhanismid oluliselt komplitseeritumad. Lisaks on hulkraksetel eukariootidel erinevad rakutüübid ja koed, milles ekspresseeruvad erinevad geenikomplektid. Eriti keeruliseks muudab geeni ekspressiooni regulatsiooni hulkraksetes organismides rakkude diferentseerumine individuaalse arengu käigus, mille eri astmetel avalduvad erinevad geenikomplektid ja toimub ulatuslik geenide avaldumise ümberlülitumine.

palju DNA cis elemente ja trans faktoreid

Erienevalt reguleeritud geeniperekonnad

5'TOP näiteks on housekeeping geenid

Üheaegselt avalduvatel geenidel sarnased faktorid (osaliselt kattuvad) ja ka homoloogsed DNA cis järjestused, millega faktorid seonduvad

Sarnaselt reguleeritavatel geenidel homoloogsed DNA regulaatorjärjestused, mis on samade või sarnaste transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadeks.

Eukariootides on kolm erinevat RNA polümeraasi, millest igaühel on oma kindlad märklauageenide:

RNAP I vastutab ribosomaalse RNA geenioperonide (18S-5,8S-28S rRNA) transkriptsiooni eest.

RNAP II sünteesib valke kodeerivaid mRNA molekule

RNAP III transkribeerib 5S rRNA, tRNA ja mitmeid URNA molekule.

Epigeneetilised fenomenid

1. Prionid
2. Chaperonid (Hsp 90) mutatsioonide varjestajatena
3. RNA interferents
4. DNA metüleerimine ja geenide päritav repressioon

Geenide vaigistamine ja RNA interferents.

Geenide vaigistamise ja epigeneetilisele fenomenile on pühendatud ajakirja Science 10 Aug. 2001 erinumbri (vol. 293, No. 5532, p. 1064-1105) mitmed artiklid. Muude hulgas ka M. Matzke, et al., ibid. 1080-1083.

Kuna nähtus on avastatud 1980-ate lõpul taimedes ja 10 aastat hiljem loomadel, siis kasutatakse põhiliselt sama nähtuse tähistamiseks palju erinevaid termineid. Nagu ikka molekulaarbioloogias, on kasutusel suur hulk lühendeid, mille tähendust ei seletata just igal pool lahti.

Terminid ja lühendid:

RNA vahendatud geeni vaigistamine - homologsete RNA'de või RNA ja DNA interaktsioon viib geeni aktiivsuse kadumisele ja DNA metüleerimisele. Nähtus on levinud paljudes päristuumsete rühmades nagu taimed, pärmid, ussid, putukad ja imetajad. Eri taksonites kasutatakse erinevaid geeni vaigistamise mehhanisme. RNA vahendatud geeni vaigistamine toimub nii tuumas (taimedes) kui tsütoplasmas.

RNAi - RNA interferents, post-transkriptsiooniline geeni vaigistamine, mille käigus 2-ahelaline RNA suunab homologse mRNA lagundamist tsütoplasmas. Seda terminit kasutatakse *Drosophila* ja *Ceanorabditis*'e uurijate poolt. Kuna see lühend on RNA vahendatud geeni vaigistamise nähtuse tähistamiseks kasutatavatest kõige lühem, siis eelistan kasutada just RNAi'd.

PTGS - **p**ost-**t**ranskriptsiooniline **g**eeni vaigistamine (**s**ilencing). Kasutatakse taimede puhul. Kasutatakse ka lühendit PTGS/RNAi.

quelling - sama tähendusega termin *Neurospora* puhul. (quelling Ingl. k. - lämmatama, maha suruma)

dsRNA - kaheahelaline RNA (**d**ouble **s**tranded) on RNAi oluline vahendaja.

RdRP - RNA sõltuv RNA polümeraas suunab RNA sünteesi RNA matriitsi alusel, mille tulemuseks on dsRNA. See ensüüm ei ole RNAi toimumiseks vajalik kui rakus on suur kogus dsRNA'd.

RNAas III - dsRNA spetsiifiline endoribonukleaaas, mis hürdolüüsib rohkem kui 10 aluspaarise dsRNA fosfodiesteridemed. RNAi puhul toimub pikkade dsRNA'de lagundamine väiksemateks fragmentideks (21-25 aluspaari), mida viivad läbi RNAas III homologid, näiteks *Drosophilas* valk nimega Dicer.

siRNA - vaigistamist indutseeriv RNA on RNAas III sarnaste ensüümide hürdolüüsi produkt, 21-25 nt pikk, mis on kas "sense" või "antisense" järjestuse orientatsiooniga.

RISC - RNA indutseeritud vaigistuskompleks (**R**NA **i**nduced **s**ilencing **c**omplex). See on RNAi põhiline efektorkompleks, mis lagundab siRNA'ga homologse mRNA. Seega siRNA kuulub koos mitmete valkudega RISC kompleksi.

Helikaasid - dsRNA'd või dsDNA'd lahtiharutavad ensüümid. *Neurospora* puhul on leitud et DNA helikaas osaleb RNAi toimumisel. Teistes organismides on leitud, et RNAi jaoks on vajalikud RNA helikaasid.