

Lubau vastuvõetud
21. mai 1974. a.
K. Leht

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Eksperimentaalfüüsika kateeder

Biokeemia kateeder

TRU võistlustööde komisjoni otsusega

18. juuni

19. 74 a. on määratud kõesalevale tööle

I aukind

TRU Teaduslik sekretär

5S RNA STRUKTUURIST

D i p l o m i t ö ö

Töö teostaja: E. Vink,

füüsikaosakonna

V k. üliõpilane

Juhendajad: R. Villems,

med. kand., n.t.t.

A. Lind,

dotsent med. kand.

K. Leht
21.5.74

Tartu 1974

S i s u k o r d

Kasutatavad lühendid	4
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	7
I. Nukleiinhapete struktuurist	7
II. Madalmolekulaarsete nukleiinhapete struktuurist	9
1. tRNA struktuurist	9
2. Ribosomaalse 5S RNA struktuurist	10
2.1. 5S RNA primaarne ning sekundaarne struktuur	10
2.2. 5S RNA tõenäoselise sekundaarne struktuur	12
2.3. 5S RNA konformatsioon lahuses	13
III. Madalmolekulaarsete ribonukleiinhapete konformatsiooni uurimismeetodid	15
IV. Konformatsiooni uurimine termodenaturatsiooni spektrite abil	17
V. Isotermilised konformatsioonilised üleminekud	20
Eksperimentaalne osa	22
I. Materjalid ja meetodid	22
1. Kasutatavad reaktiivid ja preparaadid	22
2. Kasutatud aparaat	22
3. 5S RNA isoleerimine	23
3.1. 5S RNA isoleerimine roti maksast	23
3.2. 5S RNA kromatograafia ja rekromatograafia sephadex G-75 kolonnil	24
3.3. 5S RNA puhastamine sephadex G-15 kolonnil	24
4. 5S RNA leelishüdrolüüs	26
5. 5S RNA isotermilised konformatsioonilised üleminekud	27
5.1. Na ⁺ ioonidega tiitrimine	27
5.2. Mg ²⁺ ioonidega tiitrimine	27
6. Töökaitse	29

II. Tulemused	30
1. 5S RNA isoleerimine	30
2. 5S RNA leelishüdrolüüs	30
2.1. Roti maksast eraldatud 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidi ^{de} segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient	31
2.2. Roti maksast eraldatud 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi arvutamine	34
2.3. Eksperimentaalse 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalkõvera võrdlemine hüpoteetiliste diferentsiaalkõveratega	34
2.4. Empiirilise võrrandi ning eksperimentaalse leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektri sobivus	35
3. 5S RNA sulamiskõverate järgi aluspaaride arvu ning spiraalsuse astme määramiseks kasutatava hüpoteesi kontroll	36
4. 5S RNA isotermilised konformatsioonilised üleminekud	38
4.1. 5S RNA tiitrimine Na ⁺ ioonidega	38
4.2. 5'-nukleosiidmonofosfaatide segu tiitrimine Na ⁺ ioonidega	38
4.3. 5S RNA tiitrimine Mg ²⁺ ioonidega	38
III. Tulemuste arutelu ja järeldused	40
1. 5S RNA isoleerimine	40
2. 5S RNA leelishüdrolüüs	41
3. Isotermilised konformatsioonilised üleminekud	42
Kokkuvõte	43
Kasutatav kirjandus	44
Resümees (vene keeles)	47
Resümees (inglise keeles)	48

Kasutatavad lühendid

- RNA - ribonukleiinhape
DNA - desoksiribonukleiinhape
A - adnosiin
G - guanosiin
U - uridiin
C - tsütidiin
5S RNA - ribosomaalne ribonukleiinhape sedimentat-
siooni koefitsiendiga 5 Svedbergi ($1S = 10^{-13}s$)
tRNA - transport ribonukleiinhape

Kasutatud lühendid vastavad IUPAC-IUB kinnitatud reeglitele,
vt. J. Molecular Biology, 1971, 55, 299-310.

Mittekonventsiaalsed lühendid

- 1 O.D.U. _{λ} - aine hulk 1 ml lahuses, milline mõõdetuna 1 cm
optilise teepikkusega küvetis omab ekstinktsioo-
ni 1 lainepikkusel λ

S i s s e j u h a t u s

Eluprotsessid pole võimalikud organiseerimata, struktuurita aines. Just struktuursus tagab elutegevuse ning tema korrapärasuse.

Kaasaegse molekulaarbioloogia üheks põhiülesandeks ongi makromolekulide struktuuri väljaselgitamine.

Nukleiinhapped omavad erakordselt tähtsaid bioloogilisi funktsioone. Nad on selleks materiaalseks substantsiks, mis sisaldab endas geneetilist informatsiooni. Teisest küljest on nukleiinhapped kõige otsesemalt seotud spetsiifiliste valkude biosünteesiga.

Kuuekümnendatel aastatel saavutati otsustavat edu madalmolekulaarsete ribonukleiinhapete struktuuri uurimisel.

Kõrgmolekulaarsete RNA-de ning ribosoomi struktuuri uurimine on alles arenemisjärgus. Ribosomaalne 5S RNA isoleeriti esmakordselt 1964.a. E. colist (Rosset, Monier, 1963). 5S RNA osutus ribosoomi universaalseks komponendiks, kuid tema funktsioon on siiani teadmata.

Tänaseks on primaarne struktuur välja selgitatud seitsmel 5S RNA-l. Nende 5S RNA-de primaarsete struktuuride teadmine, minoorsete komponentide puudumine ning suhteliselt madal molekulaariga muudavad selle ribonukleiinhappe madalmolekulaarsete RNA-de konformatsiooni uurimise sobivaks objektiks.

Vaatamata eriti väiksemolekulaarsete RNA-de intensiivsele uurimisele viimastel aastatel, puuduvad senini kindlad seiskohad nii nende sekundaarse kui ka tertsiaarse struktuuri kohta.

Torkab näiteks silma suur erinevus eri meetoditel määratud kaksikspiraalsuse astmes, kuigi kõik need andmed on saadud põhiliselt spektraalsete uurimismeetoditega - ultravioletsete ja infrapunaste spektrite ning tsirkulaarse dikroismi ning optilise rotatsiooni dispersiooni uurimisel neeldumisspektri ultravioletses osas. Nimetatud raskuste põhjuseks võib pidada asjaolu, et:

a) Puuduvad seni piisavad andmed elementaarsete protsesside kohta, nagu aluspaaride moodustumise täpne mehhanism, mitmesuguste struktuuri elementide mõju kaksikspiraali stabiilsusele jne.

b) Eri autorid erinevates uurimustes pole alati küllaldast tähelepanu pööranud mõõtmistingimuste ühtlustamisele, ehkki juba suhteliselt ammu on teada, et RNA-de konformatsioon ja viimase stabiilsus sõltub oluliselt lahustist.

Eeltoodut arvestades valiti käesoleva töö ülesandeks:

1. Vajaliku puhtusastmega individuaalse RNA molekuli eraldamine - selleks valiti 5S ribosomaalne RNA.
2. 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi määramine teelise kontsentratsiooni arvutamiseks.
3. Vastasiooni^{de} (Na^+ ja Mg^{2+}) poolt põhjustatud 5S RNA isotermiliste konformatsiooniliste muutuste täpsem uurimine:
 - a) kontsentratsioonide arvutamiseks eri ioonse jõuga lahustes;
 - b) tingimuste määramiseks, millistel 5S RNA 20° juures omab maksimaalselt hüpokroomset struktuuri.
4. Tõestada 5S RNA sulamiskõverate järgi alusepaaride arvu ning spiraalsuse astme määramiseks kasutatava hüpoteesi õigsust.

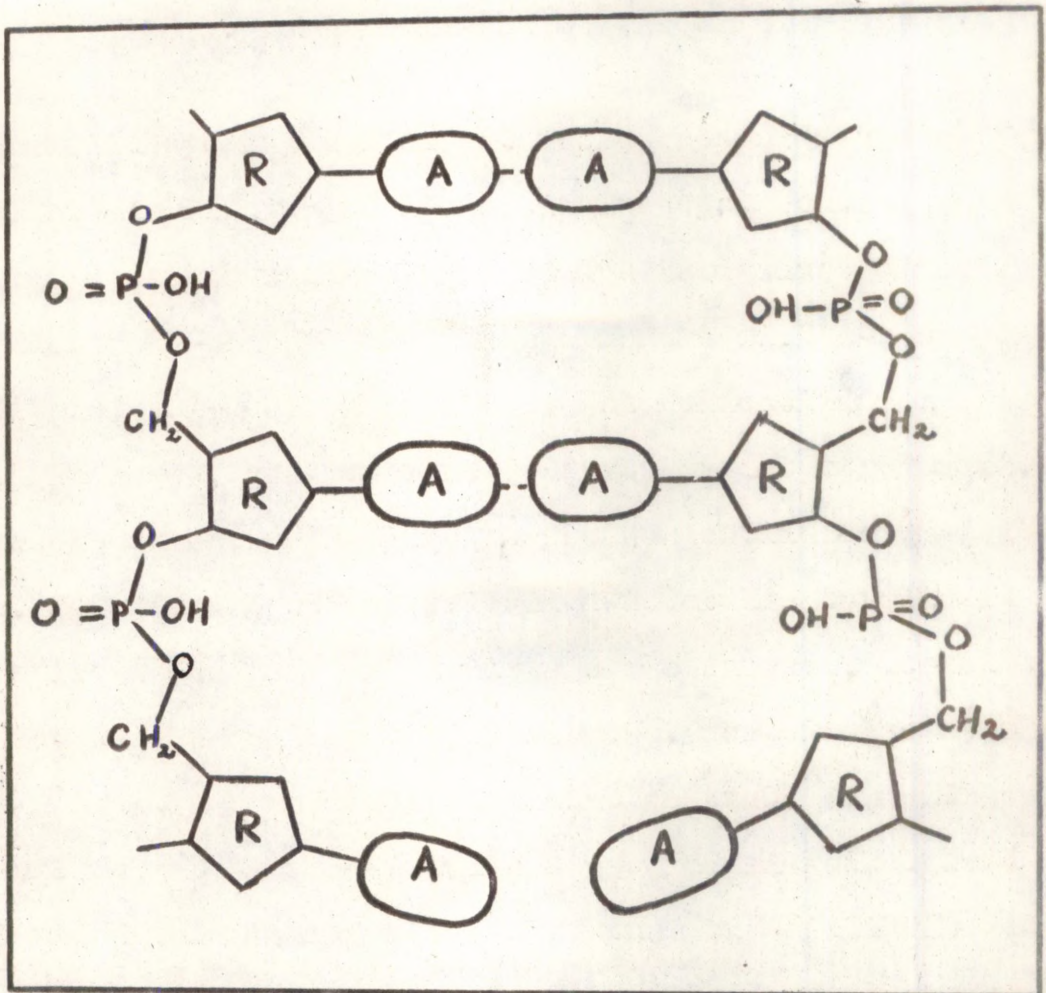
Kirjanduse ülevaade

I. NUKLEIINHAPETE STRUKTUURIST

Nukleiinhape kujutab endast fosfopentooside ahelat pentoosijääkidele kinnitunud lämmastikalustega. Pentoosijääk koos temaga seotud fosfaatrühma ja lämmastikalusega moodustavad nukleotiidi-polünukleotiidahela monomeeri. RNA-s on pentoosiks riboos, DNA-s desoksiriboos. Polünukleotiididel eristatakse primaarset, sekundaarset ja tertsiaarset struktuuri. Primaarseks struktuuriks nimetatakse nukleotiidide järjestust ahelas. Sekundaarse struktuuri all mõistetakse tavaliselt kaksikspiraalsete ja üheaahelaliste osade suurust, koostist ja paigutust tasapinnalises projektsioonis. Tertsiaarse struktuuri all mõistetakse molekuli ruumilist ehitust. Nukleiinhapete primaarne struktuur määrab selle biopolümeeri kõik teised struktuursed vormid. Primaarne struktuur on täielikult selgitatud umbes kahekümnel tRNA-l ja seitsmel 5S RNA-l.

1953.a. esitasid Watson ja Crick DNA sekundaarse struktuuri mudeli, kus kaks antiparalleelset polünukleotiidide ahelat on keerdunud teineteise ümber. Vesiniksidemete abil on spetsiifiliselt paardunud adeniin tümiiniga ja guaniin tsütosiiniga (joon. 1). RNA sekundaarse struktuuri kohta pärinevad esimesed täpsemad andmed 1959-60 aastaist (Fresco jt. 1963).

Esitati hüpotees, mille kohaselt RNA-des eksisteerivad üheaahelalised ja kaksikspiraalsed osad. Erinevalt DNA-st on enamasti RNA üheaahelaline [redacted] ja kaksikspiraalsed osad moodustuvad üheaahelalise molekuli tagasipöördumisel. RNA kor-



Joonis 1. Kaksikspiraali moodustumine kahest polinukleotiidi ahelast

R- riboos

A- lämmastikalus

ral on spetsiifiliselt paardunud adeniin uratsiiliga ja guaniin tsütosiiniga. Peamised tegurid, mis määravad sekundaarse struktuuri, on:

1. "stacking"-interaktsioonid;
2. fosfaatide interaktsioonid;
3. solvendi interaktsioonid;
4. molekulide soojusliikumine;
5. vesiniksidemed.

Nende tegurite tasakaalu muutustega kaasnevad muutused sekundaarses struktuuris. "Stacking"-interaktsiooni all mõistetakse interaktsioone piki polünukleotiidses ahelas, mis toimivad lämmastikaluste tasapindade vahel. Põhilisteks komponentideks loetakse siin Wan-der-Waalsi ja Londoni tunge. "Stacking"-interaktsioon takistab aluste pöörlemist ümber fosfaat-riboositelje. "Stacking"-struktuuri üleminek spiraalsest vormist amorfseks on pidev. Vesiniksidemed kindlustavad lämmastikaluste spetsiifilise paardumise.

Nende faktorite iseloom, mis määravad, missugused nukleotiidid sisalduvad kaksikspiraalsetes osades, ei ole praegu teada. Samuti ei ole kindel, kas natiivse RNA molekuli sekundaarne struktuur on unikaalne või eksisteerib mitmeid üksteisega tasakaalus olevaid variante.

Tertsiaarse struktuuri moodustamisel toimub RNA molekuli ruumiline kokkupakkumine. Mõnede autorite poolt on kindlaks tehtud, et tertsiaarne struktuur eksisteerib ainult teatavate lahuse ioonsete jõudude juures, kusjuures näiteks vajalik $MgCl_2$ kontsentratsioon on 10^{-3} M ning vajalik NaCl kontsentratsioon 1 M (Reeves jt. 1970; Römer jt. 1970).

II. MADAIMOLEKULAARSETE RIBONUKLEIINHAPETE STRUKTUURIST

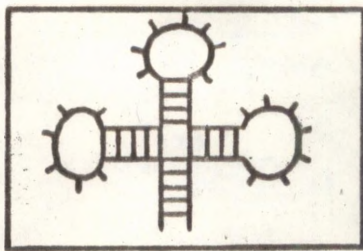
1. tRNA struktuurist

Bioloogiliste funktsioonide ja molekulkaalu järgi eristatakse RNA nelja rühma. Transport RNA e. tRNA molekul koosneb 76-85 monomeerist. Molekulkaal on ligikaudu 25000. Funktsiooniks on aktiveeritud aminohapete transport ribosoomidesse. Iga le aminohappele vastab üks või mitu spetsiifilist tRNA-d.

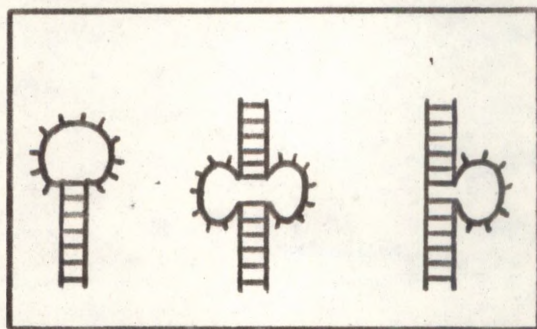
Nagu öeldud, on umbes 20 tRNA primaarne struktuur teada. 1965.a. esitasid Holly jt. sekundaarse struktuuri jaoks lihtsa, nn. "ristikheinalehe" mudeli. Selles mudelis on kaksikspiraalsed ning üheaahelalised osad paigutatud vastavalt joonisele 2.

Selgus, et lähtudes oletusest, et kaksikspiraalsed ning üheaahelalised osad moodustuvad vastavalt alusepaaride hulga maksimaalsuse printsiibile (Tinoco jt. 1971), saab kõikide tuntud järjestustega tRNA molekulide sekundaarsed struktuurid viia vastavusse "ristikheinalehe" mudeliga. Erinevate tRNA-de primaarsetest struktuuridest moodustatud "ristikheinalehtede" võrdlemisel (Arnott, 1971) saadi, et kõigis neis on vastavate kaksikspiraalsete ja üheaahelaliste osade paigutus analoogne ning vastab järgmisele mudelile (joon. 3).

tRNA tertsiarse struktuuri uurimisel on efektiivsemaks meetodiks röntgenstruktuur analüüs. Viimaste andmete põhjal (Kim jt. 1973) omab tRNA ruumis järgmist kokkupakkunud struktuuri (joon. 4).

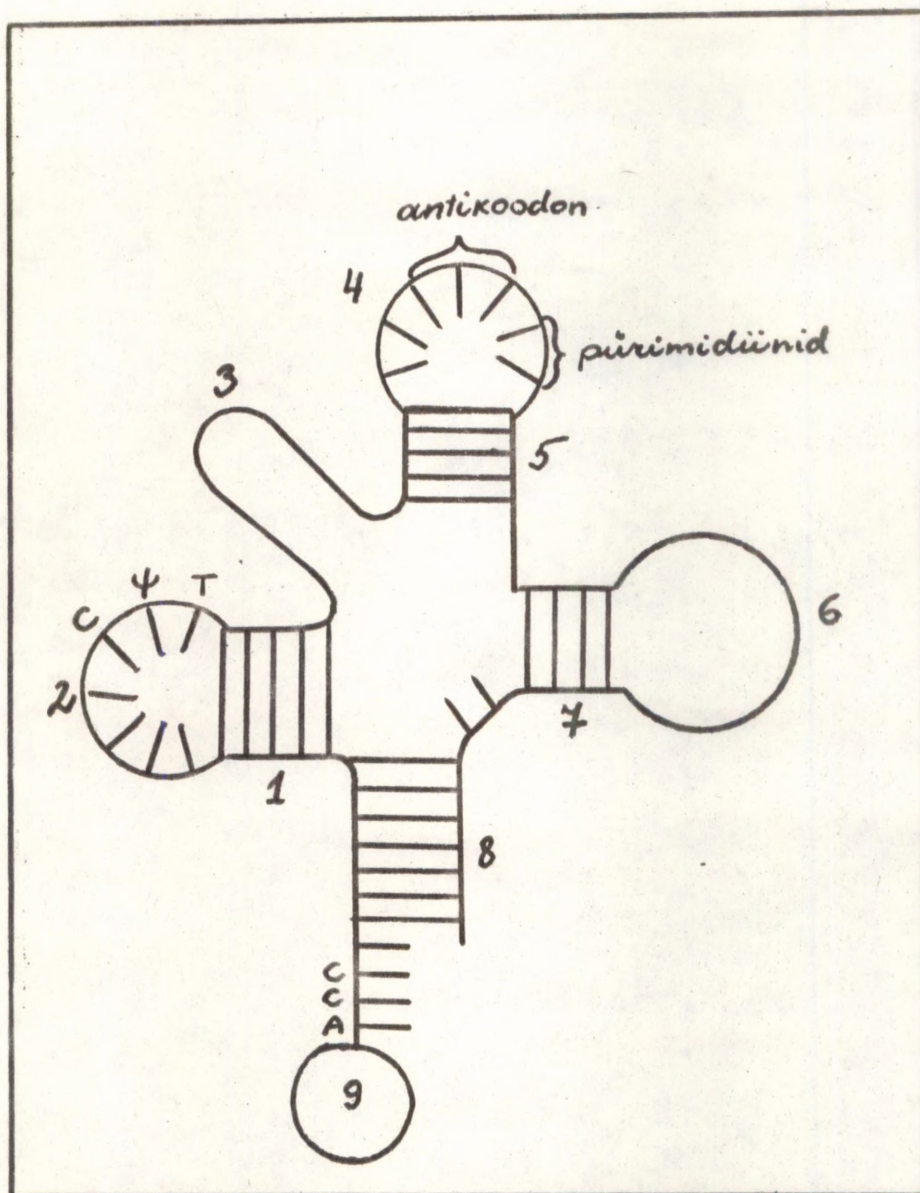


Joonis 2. "Ristikheinalehe" struktuur



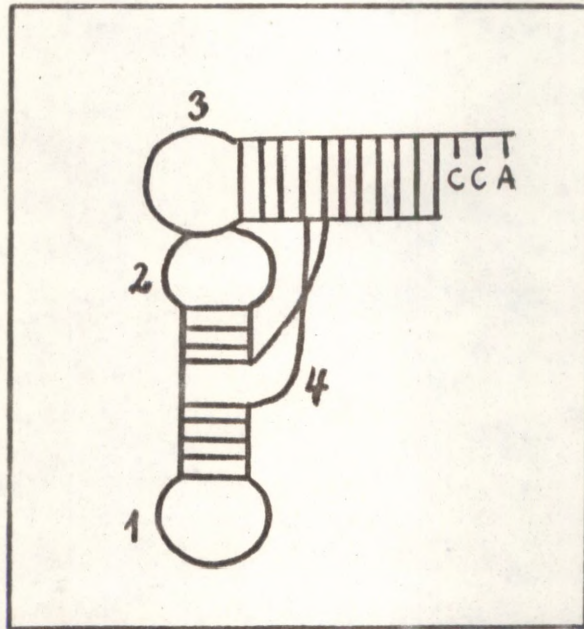
1.ling 2.vaheling 3.mõhn

Joonis 6.



- Joonis 3. tRNA struktuur koos haakunud aminohappega
1. universaalse tetranukleotiidi kaksikspiraal
 2. universaalse tetranukleotiidi ling
 3. lisaling
 4. antikoodoni ling
 5. antikoodoni kaksikspiraal
 6. dihydrouridiini ling
 7. dihydrouridiini kaksikspiraal
 8. aminohappe kaksikspiraal
 9. aminohape

T- ribotümidin, Ψ - pseudouridiin



Joonis 4. tRNA tertsiaarne struktuur

1. Antikoodoni ling
2. Dihüdrouriidiini ling
3. Universaalse tetranukleotiidi ling
4. Lisaling

2. Ribosomaalse 5S RNA struktuurist

Ribosomaalne e. rRNA sisaldub ribosoomides. Bakteriaalsete rakkude koostises on leitud rRNA-d sedimentatsiooni koefitsiendiga 23S, 16S, 5S; Loomsete rakkude koostises sedimentatsiooni koefitsiendiga 26S, 18S, 5S. rRNA molekulkaal on 0,05-1,2·10⁶. Esmakordselt isoleeriti 5S RNA 1964.a. E.colist (Rosset, Monier, 1963).

5S RNA osutus ribosoomi universaalseks komponendiks, kuid tema funktsioon on siiani teadmata.

2.1. Ribosomaalse 5S RNA primaarne ning sekundaarne struktuur

Tänaseks on 5S RNA primaarne struktuur määratud E.coli, KB, P.fluorescens, S.cervisiae, Xenopus laevis neeru, ovaariumi ja HeLa rakkude jaoks.

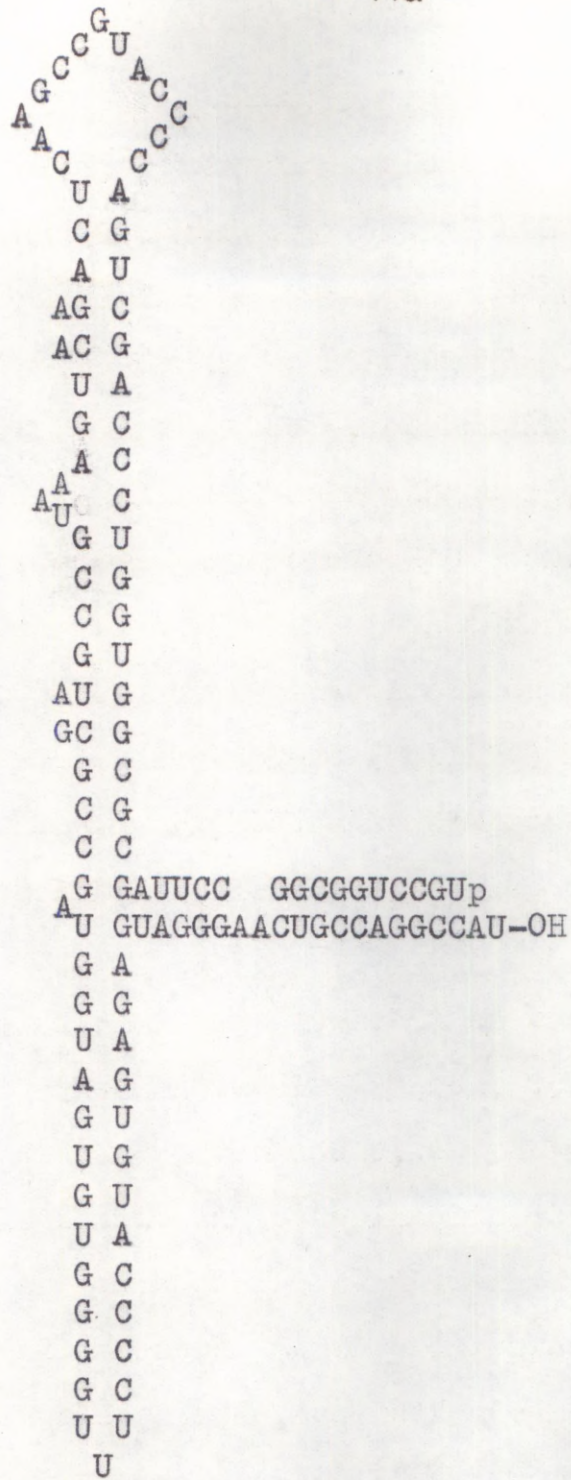
Nende primaarsete struktuuride teadmine andis võimaluse koostada 5S RNA sekundaarse struktuuri mudelid.

E.coli jaoks on siiani välja pakutud 10 erinevat sekundaarset struktuuri (Brownlee jt. 1967; Boedtker, Kelling, 1967; Raacke, 1968; Madison, 1968; Cantor, 1967; Forget, Weissmann, 1969; Lapidus, Rosen, 1970; Du Buy, Weissmann, 1971), mis põhinevad osaliselt füüsikalise-keemiliste omaduste mõõtmisel ning osaliselt spekulatiivsetel kontseptsioonidel tema funktsioonist ribosoomis. Ükski neist ei ole täielikult kooskõlas kirjanduses toodud eksperimentaalsete andmetega. Kui lähtuda nukleotiidses koostisesest ning eeldada, et moodustuvad ainult A·U ja G·C paarid ning kolmikkompleksid on välistatud, siis

võiks E.coli 5S RNA-s olla 95% ja KB rakkude 5S RNA-s 92% nukleotiididest kaksikspiraalsetes osades (Richards, 1969). Selline jaotus saaks realiseeruda 10^{78} erineval viisil.

Enamus nendest skeemidest on aga kas steeriliselt võimatu või liiga lühikeste kaksikspiraalsete osade tõttu ebapüsivad. Tinoco töödest on teada, et kaksikspiraalne osa on püsiv, kui ta sisaldab vähemalt kolm aluspaari, kusjuures üks neist paaridest peab sel juhul olema G·C paar. Kui see oletus on õige, siis võib E.coli 5S RNA sisaldada maksimaalselt 36 aluspaari, s.o. 60%. Eksperimentaalselt on saadud kaksikspiraalsete osade protsendiks 65%-st (Kelling) kuni 82%-ni (Cantor). Viimasel juhul on arvestatud ka U·G paaride tekkimise võimalikkust. Tegelikult pole nende paaride olemasolu lõplikult tõestatud.

Järgneval joonisel (joon. 5) on toodud E.coli 5S RNA sekundaarse struktuuri mudel (Madison, 1968). Lewis ja Doty (1970) jõudsid aga järeldusele, et 5S RNA sekundaarset struktuuri ei olegi võimalik tasapinnaliselt esitada. Ilmselt on andmeid 5S RNA sekundaarse struktuuri koostamiseks veel vähevoitu. Siiani määratud 5S RNA primaarsete struktuuride sarnasus lubab siiski oletada, et ka nende molekulide ruumilised struktuurid on sarnased. Veelgi enam, võiks loota, et eksisteerib universaalne 5S RNA mudel, mis vaatamata mõningatele individuaalsetele kõrvalekaldumistele, vastaks kõikidele 5S RNA-dele.



Joonis 5. E.coli 5S RNA mudel (Madison, 1968)

2.2. 5S RNA tõenäosim sekundaarne struktuur

Võimalike sekundaarsete struktuuride edasisel uurimisel tuleb eelkõige arvestada termodünaamikast tuntud tõsiasi, et madalaima vabaenergiaga struktuur on stabiilseim ning seega tõenäosim. Sellest termodünaamika seaduspärasusest lähtus oma töös ka Tinoco (Tinoco, Uhlenbeck, Lewine, 1971). Samas eeldati, et kaksikspiraalse osa moodustumine koosneb kahest etapist:

1. Esimese paari teke.
2. Järgnevate paaride teke.

Mõlemad etapid annavad oma osa kaksikspiraali moodustumise vabaenergiasse. Kogu vabaenergia muutus kaksikspiraalse osa tekimisel RNA molekulis:

$$\Delta G = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m^\infty}\right) - 2,3 RT \log \mu_m,$$

kus μ_m on tõenäosus, et m mittepaardunud alust moodustavad linge.

T_m^∞ - polümeeri sulamispunkt,

ΔH - entalpia muutus,

T - temperatuur, mille juures toimus kaksikspiraalse osa teke.

Lähtudes sellest tuletatud valemist ning katseandmetest, arvutati mainitud töös stabiilsuse arvud erinevate alusepaaride, lingo, vahelingude ning mõhnade jaoks. Vastavad struktuursed moodustised on antud joonisel 6. (vt. lk. 9a)

Arvestades seda, et stabiilsus^e arv RNA sekundaarse struktuuri jaoks on temas sisalduvate elementide stabiilsuse arvude summa ning et struktuur suurima stabiilsus^e arvuga on stabiilseim, jõuti järeldusele, et tõenäosima struktuuri tingimuseks

on maksimaalne alusepaaride ning minimaalne lingude ja mõhna-
de arv. Seega teades 5S RNA primaarset struktuuri, teame me
ka tema tõenäoseimat sekundaarset struktuuri.

Samas töös on välja arvutatud stabiilsuse arvud erinevate
autorite poolt välja pakutud E.coli 5S RNA mudelite jaoks
(tabel 1).

T a b e l 1

Autor	Stabiilsuse arv	AU+GC paarid
Cantor	30	43
Lewis	15	32
Boedtker, Kelling	17	32
Madison	16,5	32
Raacke	-22	27

Peab ütlema, et toodud andmete tõenäosuses on alust kahelda.

2.3. 5S RNA konformatsioon lahuses

Mõnedel tingimustel võib 5S RNA omada lahuses mitut sta-
biilset konformatsiooni, mis erinevad nii kromatograafiliste
(Scott jt. 1968) kui optiliste (Aubert jt. 1968) omaduste
poolest.

Mitmetes töodes on püütud määrata konformeeride natiiv-
suse kriteeriumit, mis on määratud võimega lülituda riboso-
maalsete 50S osakeste koostisesse, ning selgitada konformeeride
struktuurilisi erinevusi.

Vajalik oleks teada, kas 5S RNA esinemine lahuses mitmes

konformatsioonis on seotud 5S RNA eraldamise tingimustega.

On näidatud, et 5S RNA E.coli-st kauaaegne hoidmine isegi külmutatud vesilahuses viib konformatsioonilistele muutustele (Mirzabekov, Griffin, 1972).

Analoogseid resultaate on saadud ka meie laboratooriumis - roti maksast eraldatud 5S RNA kauaaegne hoidmine sademena piirituses NaCl juuresolekul, toob kaasa sulamiskõvera kuju muutuse (Villems, avaldamata andmed).

Küsimus 5S RNA erinevatest konformatsioonidest vajab edasist uurimist.

III MADALMOLEKULAARSETE RIBONUKLEIINHAPETE KONFORMATSIOONI UURIMISMEETODID

Kõigepealt tuleb mainida, et konformatsiooni all mõtleme siin nii sekundaarset kui tertsiaarset struktuuri - st. struktuuri tervikuna ning et madal- ning kõrgmolekulaarsete RNA-de konformatsiooni uurimismeetodid printsipiaalselt üksteisest ei erine, kuid madalmolekulaarsete RNA-de struktuuride suhtelise lihtsuse tõttu on nende puhul katsetulemused üldiselt täpsemalt interpreteeritavad.

Eelnevates peatükkides andsime ülevaate kahe enamuuritud madalmolekulaarse ribonukleinhappe - tRNA ning 5S RNA - kindlaks määratud ning oletatavatest struktuursetest omadustest. Ülevaates toodud uurimismeetodid ei moodusta muidugi kogu meetodite arsenalit, mis on küllalt suur ning täieneb pidevalt uute meetoditega. Allpool toome täiuslikkusele mittepresetendeeriva uurimismeetodite loetelu:

1. keemiline modifitseerimine
2. osaline hüdrolüüs
3. oligonukleotiidide sidumine
4. tiitrimetria
5. fluorestsentsmeetodid
6. kalorimeetrilised meetodid
7. viskosimeetria

8. elektronmikroskoopia
9. infrapunane spektroskoopia
10. ultravioletne spektroskoopia
11. optilise rotatsiooni dispersiooni mõõtmine
12. tsirkulaarse dikroismi mõõtmine
13. tuumamagnetresonants
14. elektronspinresonants
15. röntgenstruktuuranalüüs:
- ~~16.~~ madal-nurkne röntgenkiirte hajumine
17. ultratsentrifugaalanalüüs

Toodud uurimismeetodite arvukuse tõttu pole ilmselt siinkohal otstarbekas nendel lähemalt peatuda. Allpool vaadeldakse põhjalikumalt (vt. ka "Tulemuste arutelu ja järeldused") ainult käesolevas töös kasutatud meetodeid.

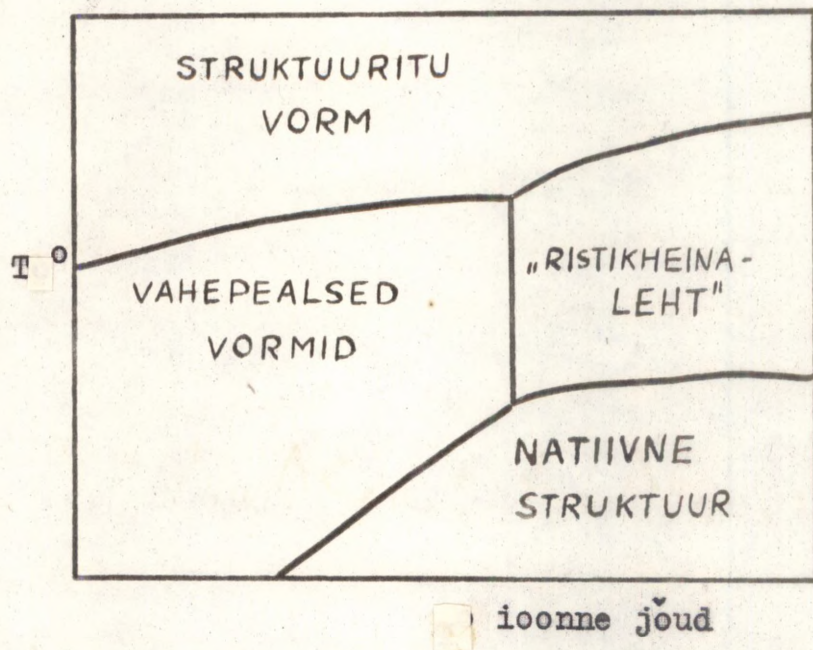
IV. KONFORMATSIOONI UURIMINE TERMODENATURATSIOONI SPEKTRITE ABIL

On teada, et nukleinhapete konformatsioon on tundlik temperatuuri suhtes. Madalatel, alla 20°C temperatuuridel, omab nukleinhape natiivset konformatsiooni. Mõnede autorite arvates eksisteerib natiivne konformatsioon ainult positiivsete metallioonide juuresolekul.

tRNA konformatsiooni temperatuurist ning ioonset jõust sõltuvuse kohta on Cole jt. (1972) esitanud järgmise hüpoteesi:

Temperatuuri kasvades toimub natiivse konformatsiooni lagunemine eelkõige aluspaaride vaheliste vesiniksidemete katkemise tõttu. Mida suurem on lahuse ioonne jõud, seda kõrgem on temperatuur, mille juures moodustub lõplikult lahti sulanud üheaheelaline nukleinhappe molekul. Esimeses järjekorras sulavad lahti need paarid, mis eksisteerivad ainult tänu kõrgele ioonsele jõule ning mille tõttu molekul omab tertsiaarset struktuuri. Selle tulemusel saame nn. "ristikheinalehe" struktuuri. Edasisel temperatuuri tõstmisel katkevad need vesiniksidemed, mis põhjustavad molekuli sekundaarse struktuuri. Samaaegselt vesiniksidemete katkemisega toimub ka "stacking" tungide vähenemine. Erinevalt vesiniksidemete katkemisest, mis on kooperatiivne, on see protsess mittekooperatiivne. Nukleinhapete konformatsioonilised üleminekud termodenaturatsioonil toovad endaga kaasa tugeva ultravioletse kiirguse neeldumise suurenemise e. nn. hüperkroomse efekti.

Hüperkroomsed muutused esitatakse termodenaturatsiooni diferentsiaalspektritena, s.o. molaarse eksinktsiooni koefit-



Joonis 7. tRNA konformatsiooni sõltuvus temperatuurist ning lahusti ioonsest jõust (Colejt, 1972)

siendi muutuse sõltuvusena lainepikkusest. Termodenaturatsioonispektrid kaksikspiraalide jaoks, mis sisaldavad ainult A•U või G•C paare, on esitatud joonisel 8 (Cox, 1970). Siinkohal olgu rõhutatud, et samasugused diferentsiaalkõverad saadakse ka kaksikspiraalsete osade leelishüdrolüüsil.

1963.a. esitas Fresco hüpoteesi RNA sekundaarse struktuuri uurimiseks termodenaturatsiooni spektrite abil. Eeldades, et A•U ja G•C paarid annavad denaturatsiooni spektrisse sõltumatu osa, määrati selles töös denaturatsiooni spektrite järgi A•U ja G•C paaride suhteline hulk. Kvantitatiivselt oli hüpoteesi kuju järgmine:

$$\frac{\Delta E_{\lambda}}{C} = f_{A\cdot U} \Delta \epsilon_{A\cdot U, \lambda} + f_{G\cdot C} \Delta \epsilon_{G\cdot C, \lambda}, \text{ kus}$$

ΔE_{λ} - lahuse neeldumise muutus,

$f_{A\cdot U}, f_{G\cdot C}$ - kogu nukleotiididest see osa, mis moodustab vastavalt A•U, G•C paarid,

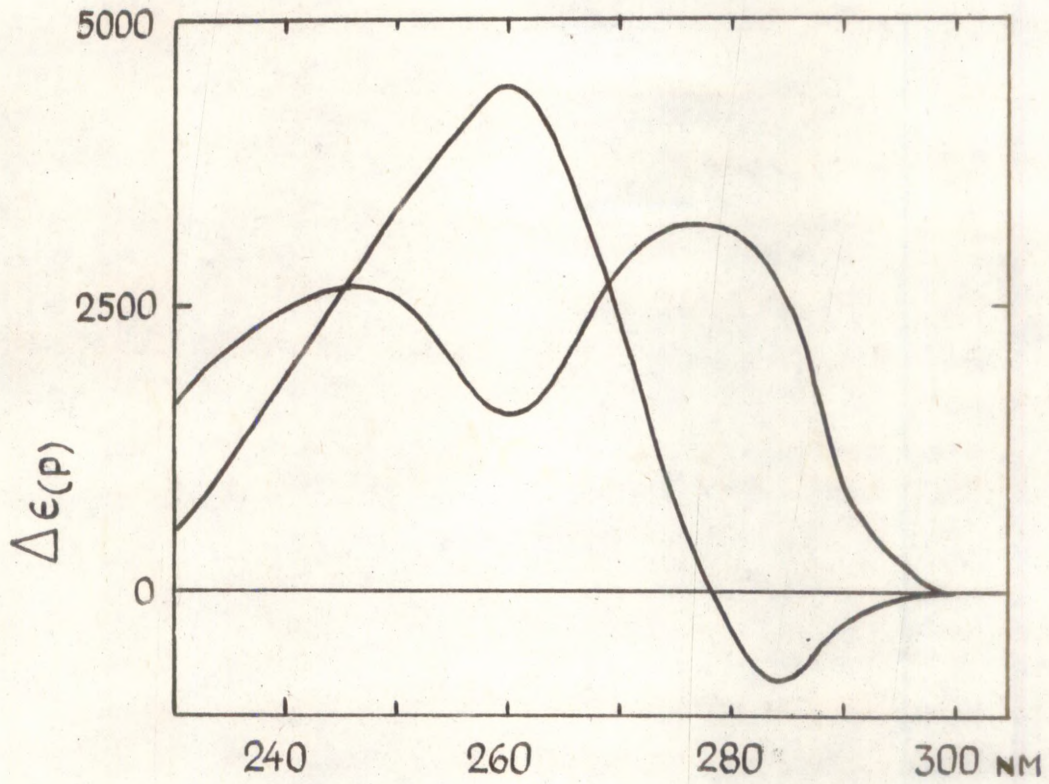
C - nukleotiidide molaarne kontsentratsioon lahuses.

$\Delta \epsilon_{A\cdot U, \lambda}, \Delta \epsilon_{G\cdot C, \lambda}$ - molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi muutus lainepikkusel λ .

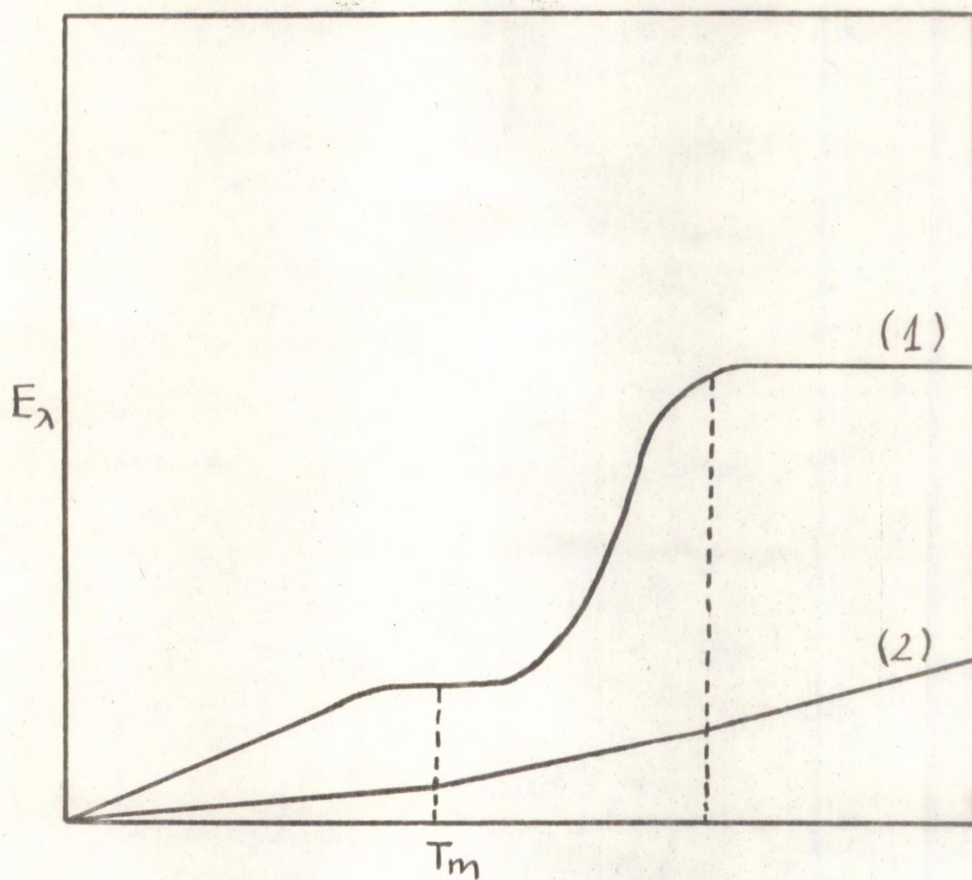
Fresco hüpoteesil on rida puudusi.

1. Pole arvestatud üheaheelalise "stacked"-struktuuri olemasolu.

On kindlaks tehtud, et näiteks 5S RNA puhul mittespiraliseerunud osadest tingitud hüperkroomia moodustab 280 nm juures 10% kogu muutusest (Villems, 1972). Selle tulemuse saamisel on arvestatud nii algselt nukleiinhappe molekulis olevaid, kui ka eri faasides spiraliseerunud osade lahtisulamisest tekkinud üheaheelalisi osi. Tegelikult spiraliseerunud osade lahtisulamisest tingitud sulamiskõvera saamiseks tuleks seega joonisel 9 eksperimentaalselt saadud kõverast (1) lahu-



Joonis 8. Termodenaturatsiooni diferentsiaal-
spektrid A·U ja G·C aluspaaride
jaoks (Cox, 1970).



Joonis 9. Eksperimentaalne termodenaturatsiooni spekter (1).

Mittespiraliseerunud osadest tingitud hüperkroomia (2).

tada mittespiraliseerunud osadest tingitud hüperkroomia (2).

2. Pole arvestatud mittespetsiifiliste aluspaaride esinemise võimalikkust ja teisi hüperkromismi põhjusi.

Natiivse 5S RNA konformatsiooni iseärasuseks on termodenaturatsioonikõverate astmeline iseloom (Scott jt. 1968; Cramer, Erdmann, 1968; Gray, Saunders, 1973), mis viitab sellele, et 5S RNA kaksikspiraalsed osad erinevad oma termostabiilsuse^e poolest. Erinevate osade erinevad termostabiilsused on põhjustatud G·C paaride erinevast sisaldusest (Gray, Saunders, 1973).

5S RNA sulamiskõverate järgi on õnnestunud määrata ka 5S RNA spiraalsuse astet ning alusepaaride arvu (Villems, 1972). Töö eksperimentaalses osas on esitatud spiraalsuse astme määramiseks kasutatud hüpoteesi õigsuse sõltumatu kontroll.

V. ISOTERMILISED KONFORMATSIOONILISED

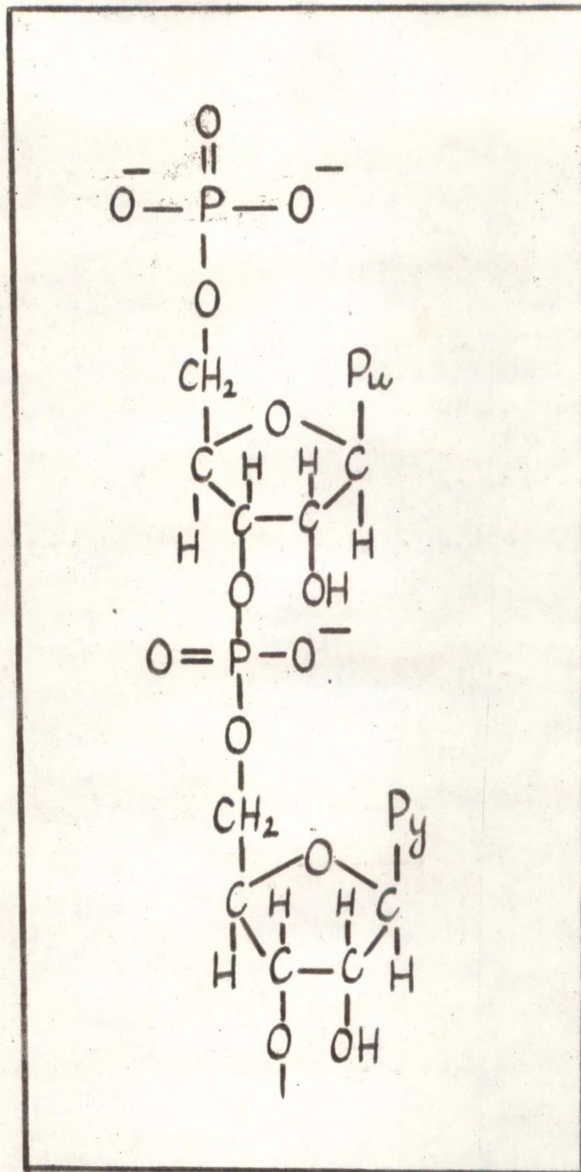
ÜLEMINEKUD

On teada, et positiivsed ioonid põhjustavad RNA isotermilisi konformatsioonilisi üleminekuid. Nende ioonide stabiliseerivat toimet demonstreerivad katsed, mis näitavad RNA termodenaturatsioonispektrite (Reeves jt. 1970; Römer jt. 1970; Riesner jt. 1969; Richards jt. 1970; Yang, Crothers, 1972), neeldumiskoefitsiendi, optilise rotatsiooni dispersiooni, tsirkulaarse dikroismi (Goldstein jt. 1972) ning teiste füüsikalise-keemiliste omaduste sõltuvust lahuse ioonsest jõust.

Siinkohal on huvitav märkida, et nimetatud konformatsioonilisi muutusi on enamasti põhjustatud ühevalentsete Na^+ ning kahevalentsete Mg^{++} ioonide lisamisega. Analoogete tulemusi on saadud ühevalentsete Li^+ ning K^+ ja kahevalentsete Mn^{++} ning Ca^{++} ioonidega. Katsed teiste ühe- ning kahevalentsete metalliioonidega ei ole andnud positiivseid tulemusi. Vesilahuses, neutraalse pH juures, omab RNA polüanioonset iseloomu (joon. 10).

On selge, et positiivsete metalliioonide lisamisel suur negatiivne elektrostaatiline potentsiaal polüaniooni pinna lähedal ekraneeritakse. Teisest küljest on täiesti võimalik, et mõnel juhul on vastasioonid võimelised kinnituma polümeeri laetud punktidele. Danchin, (1972), kasutades paramagneetilisi mangaani ioone, näitas, et tRNA omab kaht tüüpi sidumiskohti.

Esimeste, nn. kooperatiivsete sidumiskohtade korral Mn^{++} ioonid vähendavad fosfaatrühmade elektrostaatilist tõukumist. Ekraneerimine toimub madalatel Mn^{++} ning kõrgetel monovalentse-



Joonis 10. Ioniseeritud nukleotiidahel

Pu - puriin (adeniin või guaniin)

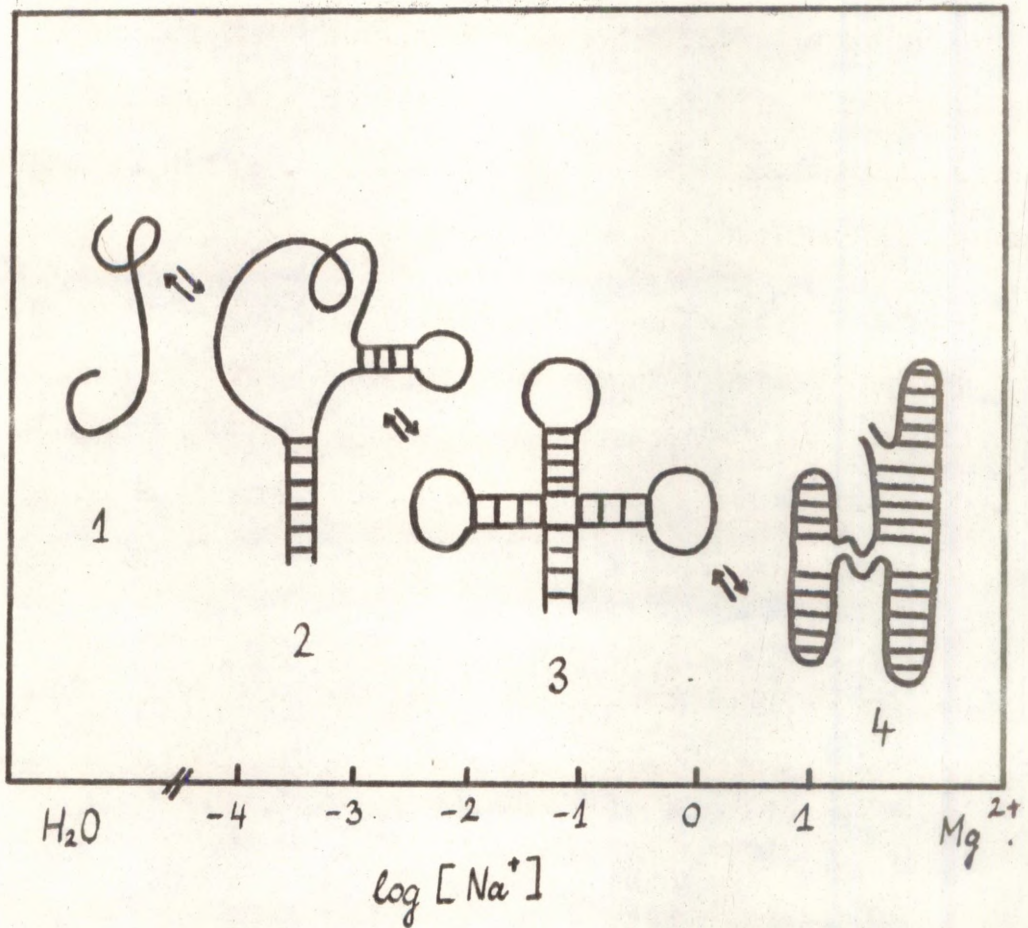
Py - pürimidiin (tsütosiin või uratsiil)

te (Na^+) ioonide kontsentratsioonidel.

Teine klass sidumiskohti võtab stabiliseerumisprotsessist osa kõrgematel Mn^{++} kontsentratsioonidel. Arvatakse, et kõrgematel kahevalentsete ioonide kontsentratsioonidel moodustub tertsiaarne struktuur. Peab ütlema, et küsimus stabiliseerumisprotsessi mehhanismist ning tertsiaarse struktuuri moodustumisest on siiani lahendamata.

Kindel on vaid see, et metallioonidest tingitud konformatsioonide muutused on kooperatiivsed ja ilmnevad näiteks Mg^{2+} ioonide korral kui $\text{Mg}^{2+}/\text{p} = 0,5$ (Reeves jt. 1970). See tähendab, et kõik fosfaadi jäägid peavad enne muutuse ilmnamist olema Mg^{2+} seotud.

tRNA isotermiliste konformatsiooniliste üleminekute jaoks tundub olema küllalt tõenäoline järgmine mudel (Goldstein, 1972).



Joonis 11. Mudel tRNA isotermiliste konformatsiooniliste üleminekute jaoks (Goldstein, 1972)

1. struktuuritu vorm
2. vahepealne aste
3. "ristikheinalaht"
4. tertsiaarne struktuur

Eksperimentaalne osa

I. MATERJALID JA MEETODID

1. Kasutatud reaktiivid ja preparaadid

Sephadex-id G-75, G-15

firma "Pharmacia Fine Chemicals" (Rootsi)

Fenool "x. r.", värskelt destilleeritud

EDTA - (naatrium) etüleendiamiintetraatsetaat, firma
"Renal" (Ungari)

Kakodüülhape firma "Koch & Light" (Inglismaa)

Anorgaanilised ühendid puhtusastmega

"o.c.r.", "x.r.", "r.A.a."

2. Kasutatud aparatuur

foto
Spektrõmeeter CQ-4

Spektrofotomeeter Perkin-Elmer 402 (Inglismaa)

Tsentrifuug UJP

Magnetsegaja MM-3

Frakts. kollektorid XKOB-01, firma LKB (Rootsi)

Kromatograafia süsteem

TTT3 "Radiometer" Taani elektroodidega

3. 5S RNA isoleerimine

3.1. 5S RNA isoleerimine roti maksast

5S RNA eraldati roti maksa ribosoomidest, mis võimaldas vabaneda glükogeeni kõrgmolekulaarsest fraktsioonist. 5S RNA eraldamisel üldisest tsütoplasmaalisest ribonukleiinhappest glükogeenist vabanemine on tehniliselt keeruline ning see raskendab 5S RNA puhastamist geelfiltratsioonil.

Kümne valge roti maksad pesti külma ($2-4^{\circ}$) 0,1 M NaCl lahusega vere eemaldamiseks ja homogeniseeriti 0,1 M NaCl-is 4 min. 8000 pööret/min. temperatuuril $2-6^{\circ}$. Saadud homogenisaati tsentrifugeeriti 30 min. 3000 pööret/min. temperatuuril $0-3^{\circ}$ tsentrifugeeriga IJMP. Supernatandile lisati ribosomaalse fraktsiooni sadestamiseks 1 M $MgCl_2$ nii, et viimase molaarsus oleks 0,1 ning hoiti 2 tundi 0° juures (jääl). Seejärel ribosoomid eraldati tsentrifugeerimisel nurkrootoriga tsentrifugeeril IJMP ühe tunni jooksul 6000 pööret/min. temperatuuril $0-3^{\circ}$. Ribosoomid suspendeeriti külmas ($2-4^{\circ}$) 0,1 M NaCl-is ning lisati võrdne hulk värskelt üleatunud fenooli (pH5). Seejärel suspensiooni segati magnetsegajal 30 min. ja tsentrifugeeriti 20 min. 3000 pööret/min. temperatuuril $0-3^{\circ}$. Ülemine veekiht eraldati ning rRNA sadestati dekanteeritud veekihist kahe osa etanooli lisamisega. Sadestamine toimus 20-24 tundi temperatuuril -15° . Seejärel sade eraldati tsentrifugeerimisel temperatuuril -10° , 30 min. 3000 pööret/min. ja lahustati 0,1 M NaCl-is. 4 M NaCl lisamisega viidi NaCl kontsentratsioon lahuses 1,5 M-ni ning seejärel hoiti lahust 24 tundi temperatuuril $2-3^{\circ}$. Selle tulemuseks oli kõrgmolekulaarse RNA sadestumine, mis eraldati tsentrifugeerimisel. tRNA ja 5S RNA sadestati superna-

tandist kahe osa etanooli lisamisega ning eraldati tsentri-
fuugimisel 3000 pööret/min. 30 min. temperatuuril -10° .

3.2. 5S RNA kromotograafia ja rekromotograafia sephadex G-75 kolonnil

tRNA ja 5S RNA sade lahustati minimaalses koguses 0,1 M NaCl-is (2 ml) ning kanti sephadex G-75 kolonnile (2,2x240 cm). Kolonni jahutati kraaniveega ($6-8^{\circ}\text{C}$). Elueerimine toimus 0,1 M NaCl-ga hüdrostaatilise rõhu all ligikaudse kiirusega 20 ml/tunnis. Ultravioletti neelava aine kontsentratsioon registreeriti "Uvicord II"-el 254 nm juures.

Sephadex G-75 kolonnil eraldatud 5S RNA fraktsioon koguti ning sadestati kahes osas etanoolis. Sadestamine toimus 24 tundi temperatuuril -15° , Seejärel sade eraldati tsentri-
fuugimisel 30 min. 3000 pööret/min. temperatuuril -10° ja lahustati minimaalses koguses 0,1 M NaCl-is. 5S RNA lahus kanti sephadex G-75 kolonnile (2,2x240 cm). Elueerimise tingimused olid samad, mis esialgsel kromotografeerimisel. Fraktsioonid koguti automaatse kollektoriga XKOB-1. Fraktsioonide suurus oli 5 ml. Fraktsioonide optilised tihedused määrati 260 nm juures spektrofotomeetril CΦ-4.

3.3. 5S RNA puhastamine sephadex-G-15 kolonnil

5S RNA desaltamiseks ning täielikuks puhastamiseks viidi läbi geelfiltratsioon sephadex G-15 kolonnil (25x3 cm).

Sephadex G-75 kolonnil eraldatud 5S RNA koguti, määrati optiline tihedus 260 nm juures spektrofotomeetril CΦ-4 ning maht. Seejärel aurutati kokku 6 ml-ni ning kanti sephadex G-15

kolonnile.

Esimesel etapil toimus elueerimine 0,01 M EDTA-ga ligikaudse kiirusega 100 ml/tunnis. Fraktsioonid koguti automaatse kollektoriga XKOB-1. Fraktsioonide suurus oli 5 ml. Fraktsioonide optilised tihedused määrati 260 nm juures spektrofotomeetril CФ-4. 5S RNA koguti, aurutati kokku 10 ml-ni ning kanti uuesti sephadex G-15 kolonnile. Teisel etapil toimus elueerimine 0,001 M EDTA-ga endise kiirusega. Fraktsioonide kogumine ning nende optiliste tiheduste määramine toimus analoogselt eelneva etapiga.

Osale kogutud 5S RNA-st lisati 0,25 M kakodüülhappe puhvrit (pH 7,0; 0,001 M EDTA) nii, et puhvri lõppkontsentratsioon oleks 0,01 M. Teine osa 5S RNA-st viidi 0,1 M fosfaatpuhvri lisamisega 0,01 M fosfaatpuhvrisse (pH 7,0). Kolmas osa 5S RNA-st aurutati kokku 5 ml-ni ning kanti uuesti sephadex G-15 kolonnile. Elueerimine toimus tridestilleeritud veega. Fraktsioonid koguti ning optilised tihedused määrati analoogselt eelnevaga. Kogutud 5S RNA külmutati temperatuuril -10° .

4. 5S RNA leelishüdrolüüs

Ligikaudu 2 O.D.U.₂₆₀ fosfaatpuhvril lahustatud 5S RNA-d lahjendati 0,01 M fosfaatpuhvriga 5 ml-ni. Seejärel lisati 0,4 ml 4 M NaCl. Lahuse spekter registreeriti spektrofotomeetriga CΦ-4 pH 7,0 juures. Pärast spektri fikseerimist 5S RNA lahus kaaluti ning seejärel lisati 0,3 M NaOH kuni lahuse pH = 11-ga. Hüdrolüüs kestis 24 tundi 37°C juures. 24 tunni möödudes lisati lahusele 0,3 M HCl kuni lahuse pH = 7,0-ga, ning kaaluti uuesti. Kaalumise oli vajalik lahjendusefekti arvutamiseks.

Hüdrolüüsitud 5S RNA spekter registreeriti spektrofotomeetriga CΦ-4.

5. 5S RNA isotermilised konformatsioonilised üleminekud.

5.1. Na⁺ioonidega tiitrimine

5S RNA isotermiliste konformatsiooniliste üleminekute põhjustamiseks tiitriti 0,01 M kakodüülhappe puhvris olevat 5S RNA-d NaCl-ga kontsentratsioonide vahemikus 10^{-3} - 2 M. Tiitrimisel kasutati järgmisi NaCl varulahuseid: 4 M; 2 M; 1M; 0,2; 0,1.

5S RNA spektreid mõõdeti järgmistel NaCl kontsentratsioonidel: 10^{-3} M; $5 \cdot 10^{-3}$ M; 10^{-2} M; $5 \cdot 10^{-2}$ M; 10^{-1} M; $5 \cdot 10^{-1}$ M; 1 M; 2 M.

1 M ning 2 M NaCl kontsentratsiooni saamiseks lisati 5S RNA lahusele kristalset NaCl. Tiitrimine toimus vahetult kvarttsküvettides, kusjuures NaCl lisati ka võrdlusküveti, et kõrvaldada võimalikke NaCl poolt põhjustatud ekstinktsiooni muutusi. Võrdlusküvetis oli 0,01 M kakodüülhappe puhver (pH 7, 0,001 M EDTA).

5S RNA spektrid erinevate ioonsete jõudude juures registreeriti spektrofotomeetriga Perkin-Elmer 402.

NaCl lisamisel tekkinud lahjendusefekti arvestati ekstinktsiooni muutuste arvutamisel. Analoogsel viisil tiitriti NaCl-ga ka 5'-nukleosiidmonofosfaatide segu.

5.2. Mg²⁺ioonidega tiitrimine

Mg²⁺ioonidega tiitrimisel kasutati vesilahuses olevat 5S RNA-d, mis viidi 0,25 M kakodüülhappe puhvri (pH=7) lisamisega 0,01 M-sesse kakodüülhappe puhvrise.

MgCl₂ kontsentratsiooni muudeti 10^{-7} - 10^{-3} M, kusjuures

kasutati järgmisi varulahuseid: 2 M; 0,2 M; 10^{-1} M; 10^{-2} M; 10^{-3} M; 10^{-4} M; 10^{-5} M.

5S RNA spekter mõõdeti järgmistel $MgCl_2$ kontsentratsioonidel: 10^{-7} M; $5 \cdot 10^{-7}$ M; 10^{-6} M; $5 \cdot 10^{-6}$ M; 10^{-5} M; $5 \cdot 10^{-5}$ M; 10^{-4} M; $5 \cdot 10^{-4}$ M; 10^{-3} M.

Tiitrimine toimus analoogselt eelneva punktiga. Spektrid registreeriti spektrofotomeetriga Perkin-Elmer 402.

Diferentsiaalkõverate registreerimisel olid küvettides võrdsete ekstinktsioonidega 5S RNA lahused. $MgCl_2$ lisati ühte, puhvrit teise küvetti. Spektrofotomeetril Perkin-Elmer 402 registreeriti küvettide spektrite vahed.

Diferentsiaalkõverate meetodil on rida eeliseid.

1. Ei ole vaja arvestada lahjendusefekti.
2. Piisavalt kõrge 5S RNA kontsentratsiooni juures ($E_{260} = 2$) on võimalik registreerida märgatavalt väiksemaid ekstinktsiooni muutusi kui eelmise meetodi puhul.

6. Töökaitse

Ohutuse tagamiseks töötamisel biokeemialaboratooriumis juhitud sellekohasest eeskirjadest [9]; [12]; [13].

Töötamisel kontsentreeritud hapetega kanti kummipõlle ja kindaid.

Fenooli destilleeriti tõmbekapis ekraanieriva varje taga. Töötamisel fenooliga kanti kummipõlle ja -kindaid ning näokaitset. Fenooliaurude sisaldus laboratooriumi õhus ei ületanud kehtestatud normi 5 mg/m^3 [10].

Aparatuuri käsitamisel jälgiti tootva tehase poolt kaasa antud eksploatatsioonieskirju. Elektriaparaadid (laboratooriumitsentrifuugid, spektrofotomeetrid, kollektorid) olid maandatud ja maanduse efektiivsus kontrollitud vastavalt töökaitse eeskirjadele [11].

II. TULEMUSED

1. 5S RNA isoleerimine

Joonisel 12 on esitatud 5S RNA eraldamise kromatogramm roti maksast isoleeritud RNA-st sephadex G-75 kolonnil.

Kromatogrammilt on näha, et 5S RNA on eraldunud küllalt hästi nii kõrgmolekulaarsest RNA-st kui ka ribosomaalsest tRNA-st.

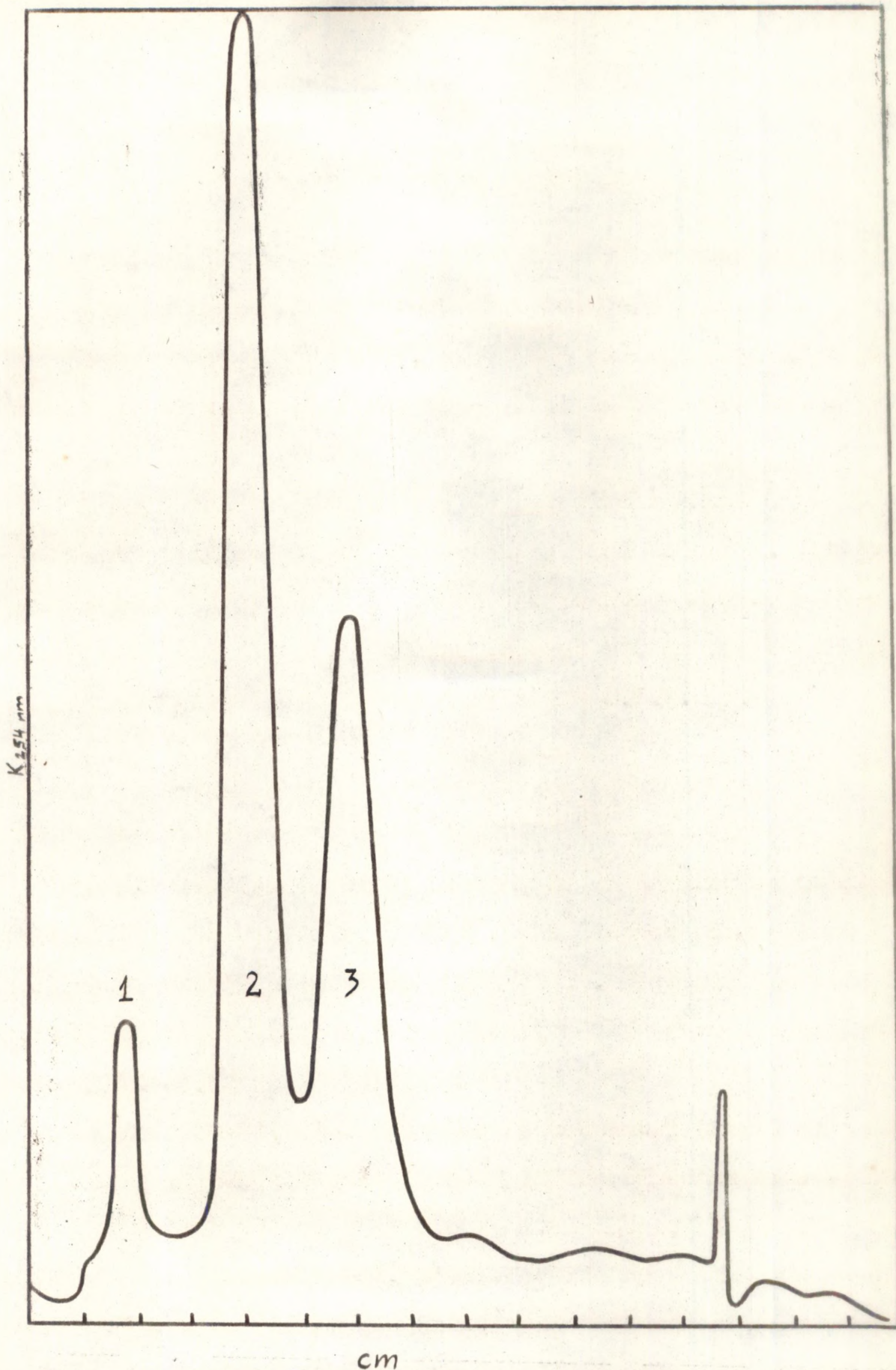
Veelgi suurema puhtusastme saavutamiseks viidi läbi 5S RNA fraktsiooni rekromatografeerimine samal kolonnil. Vastav kromatogramm on esitatud joonisel 13. Kogutud 5S RNA fraktsiooni maht oli 225 ml. Optiline tihedus 260 nm juures $E_{260} = 0,97$. Seega saadi 5S RNA ligikaudu 220 O.D.U.₂₆₀.

2. 5S RNA leelishüdrolüüs

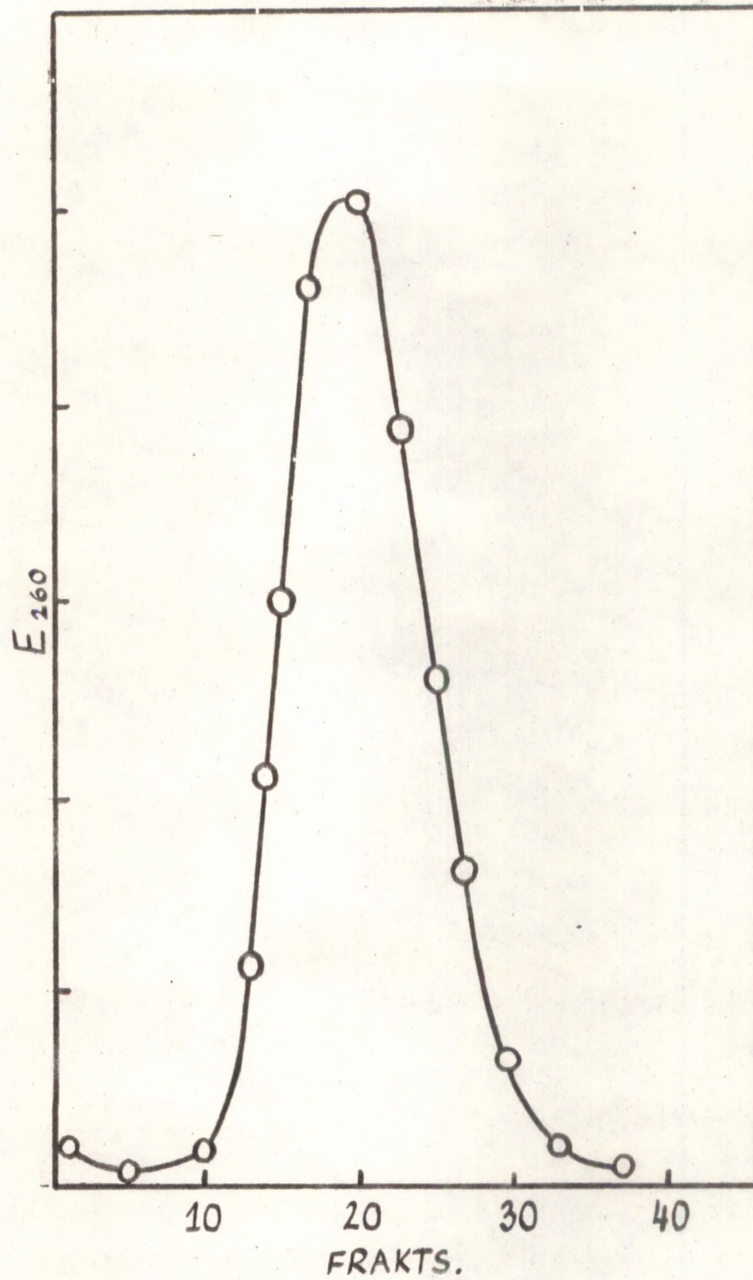
5S RNA leelishüdrolüüsi tulemuseks on lagunemine nukleosiid-2', 3'-fosfaatideks. 5S RNA spektrid enne ning pärast leelishüdrolüüsi on esitatud joonisel 14. Spektrid mõõdeti 0,01 M fosfaatpuhvril, 0,3 M NaCl-is, 20° juures, spektrofotomeetril CΦ-4.

Nukleosiid-2', 3'-fosfaatide segu spektri korral on arvestatud lahjendusefektist tingitud optilise tiheduse kahanemist.

Spektrite (1) ning (2) võrdlemisel näeme, et 5S RNA-ga ekvimolaarse nukleosiid-2', 3'-fosfaatide segu ekstinktsioon 260 nm juures on 5S RNA ekstinktsioonist suurem 54,8%. Samuti on näha, et spektri maksimum on leelishüdrolüüsi tulemusel nihkunud väiksemate lainepikkuste poole.



Joonis 12. Eraldatud RNA kromatograafia Sephadex G-75 kolonnil. Graafik joonistatud "Uvicord"i isekirjutaja lindilt. 1.-kmRNA, 2.-5S RNA, 3.- tRNA



Joonis 13. Roti maksast eraldatud 5S RNA
rekromatograafia Sephadex G-75 kolonnil.
Elueerimine toimus 0,1 M NaCl-ga kiirusega
20 ml / tunnis.

2.1. Roti maksast eraldatud 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient

Kuna roti maksast eraldatud 5S RNA nukleotiidne koostis on teada (Виллемс, Линд, 1971), saab mononukleotiidide neutraalseid spektreid kasutades (Pabst Circular OR-10, 1969) arvutada 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi.

Alljärgnevas tabelis 2 on toodud andmed roti maksast eraldatud 5S RNA nukleotiidse koostise kohta.

T a b e l 2

Roti maksast eraldatud 5S RNA nukleotiidne koostis

Alus	Arvuliselt 5S RNA-s	protsentuaalselt 5S RNA-s	$\epsilon_{260} \times 10^{-3}$
A	23	19,3	15,4
U	26	21,6	9,9
C	32	26,7	7,3
G	39	32,5	11,7

5S RNA-ga ekvimolaarse nukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient ϵ_{λ}^H arvutati järgnevate valemite abil:

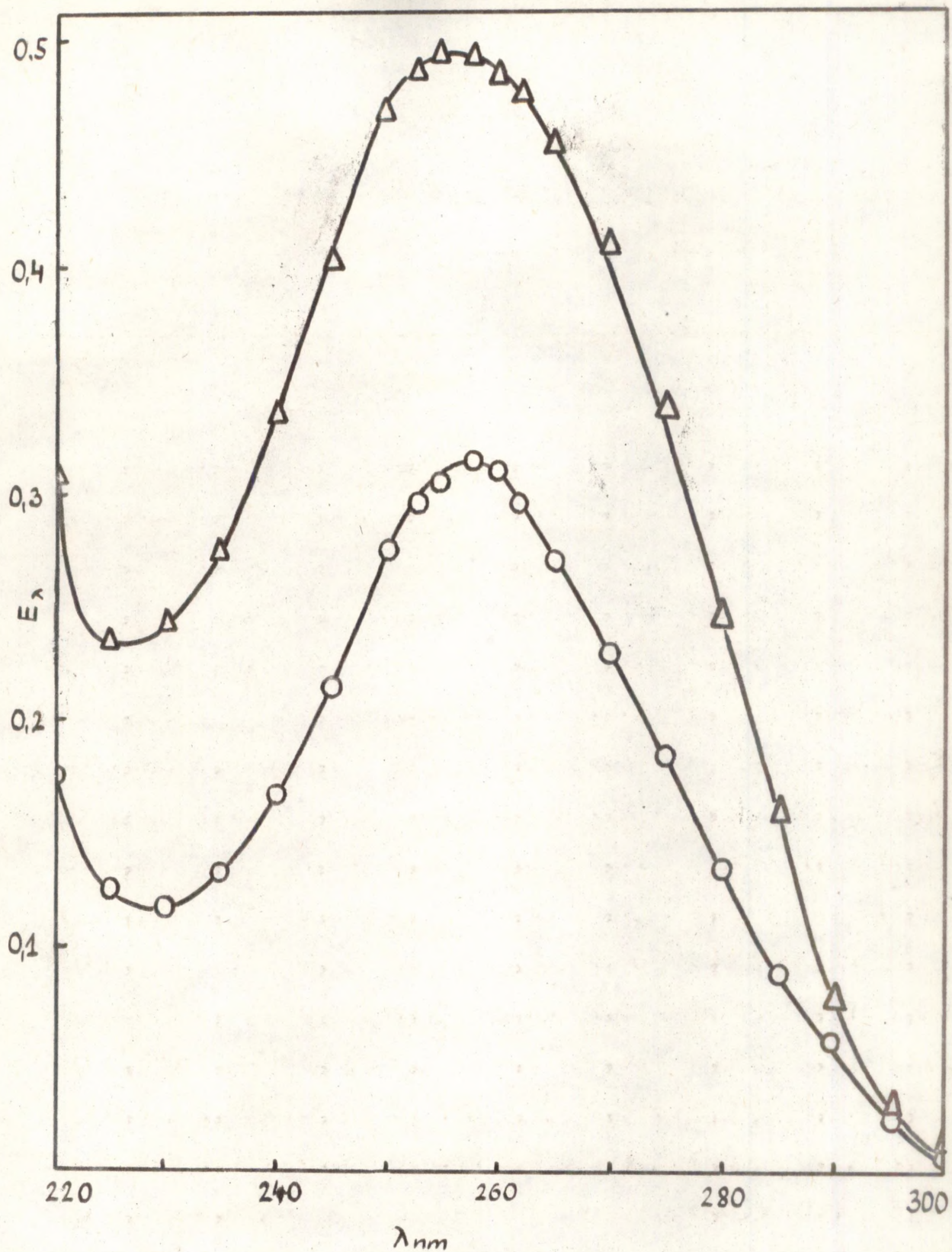
$$\epsilon_{\lambda}^H = \epsilon_{\lambda,G}^H \times 0,325 + \epsilon_{\lambda,A}^H \times 0,193 + \epsilon_{\lambda,U}^H \times 0,216 + \epsilon_{\lambda,C}^H \times 0,267$$

$$\epsilon_{\lambda,(G,A,U,C)}^H = \frac{\epsilon_{260,(G,A,U,C)} \times E_{\lambda(G,A,U,C)}}{E_{260(G,A,U,C)}}$$

kus $\epsilon_{\lambda(G,A,U,C)}^H$ on vastavate nukleotiidide molaarse ekstinktsiooni koefitsiendid, $\epsilon_{260(G,A,U,C)}$ vastavate mononukleotiidide molaarse ekstinktsiooni koefitsiendid 260 nm juures,

$E_{\lambda(G,A,U,C)}$, $E_{260(G,A,U,C)}$ - vastavate mononukleotiidide ekstinktsioonid lainepikkusel λ ning 260 nm (Pabst Circular OR-10, 1969). Arvutustulemused on esitatud tabelis 3.

Joonisel 15 on toodud 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient lainepikkustel 220-300 nm.



Joonis 14. 5S RNA spekter enne (1; O) ning pärast (2; Δ) leelishüdrolüüsi. Spektrid on võetud 0,01 M fosfaatpuhvrts, 0,3 M NaCl-is, pH 7,0, 20°C juures.

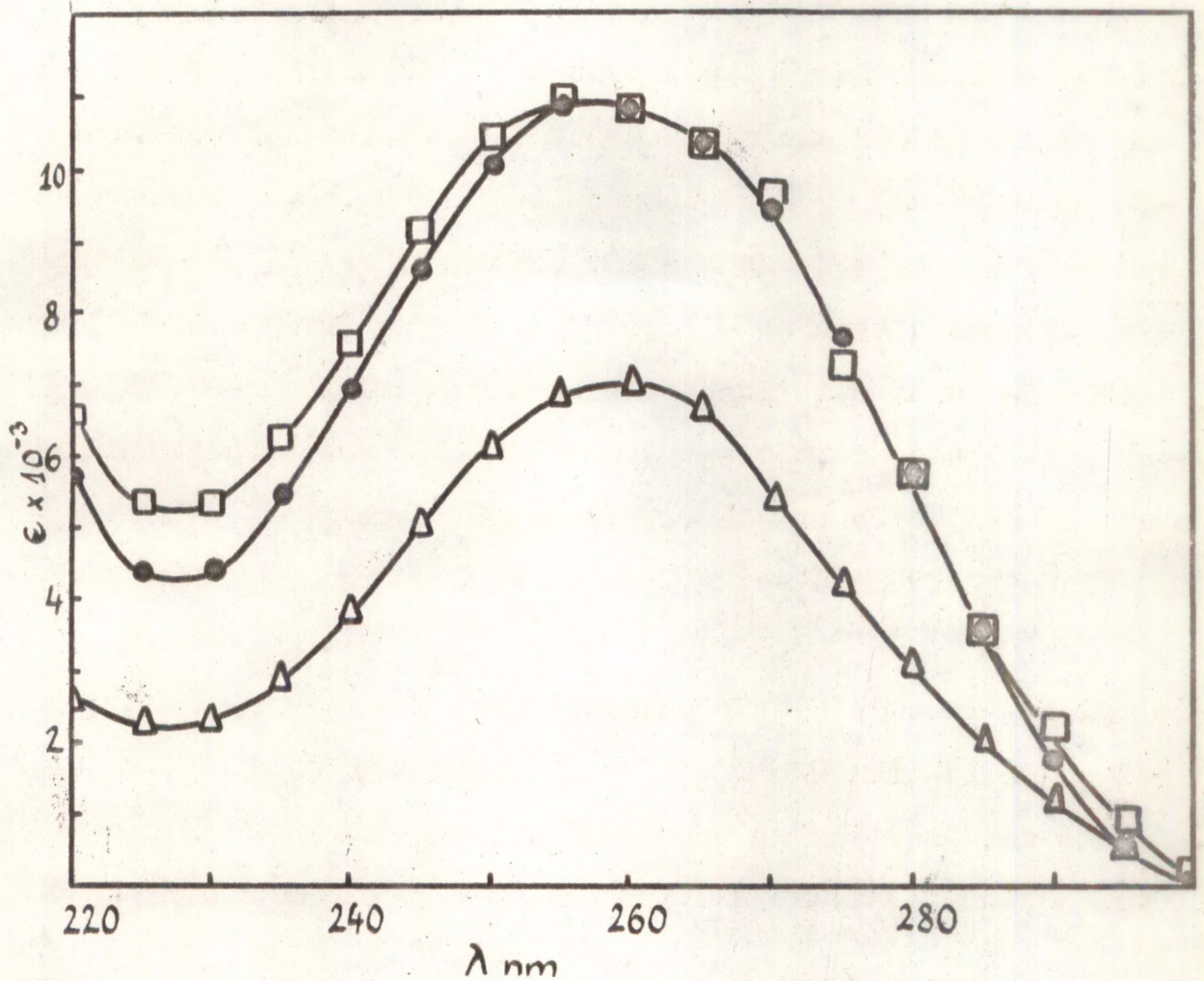
2.2. Roti maksast eraldatud 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi arvutamine

5S RNA spektrite järgi enne ning pärast leelishüdrolüüsi (joon. 14) leiame, et 5S RNA ekstinktsioon 260 nm juures on suurenenud 54,8%. Kuna leelishüdrolüüsil 5S RNA laguneb nukleosiid-2', 3'-fosfaatideks, võime spektrit (2) vaadelda kui 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu spektrit. Teades 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsienti 260 nm juures, leiame 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi. Saame, et 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsient 260 nm juures enne hüdrolüüsi $\epsilon_{5S,260}^{dH} = 7050$.

Analoogselt on leitud molaarse ekstinktsiooni koefitsiendid 5S RNA jaoks enne ning pärast leelishüdrolüüsi lainepikkuste vahemikus 220-300 nm. Tulemused on esitatud joonisel 15. Edasi arvutati 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspekter $\Delta\epsilon_{\lambda} = (\epsilon_{\lambda}^H - \epsilon_{\lambda}^{dH})$ (joon. 16).

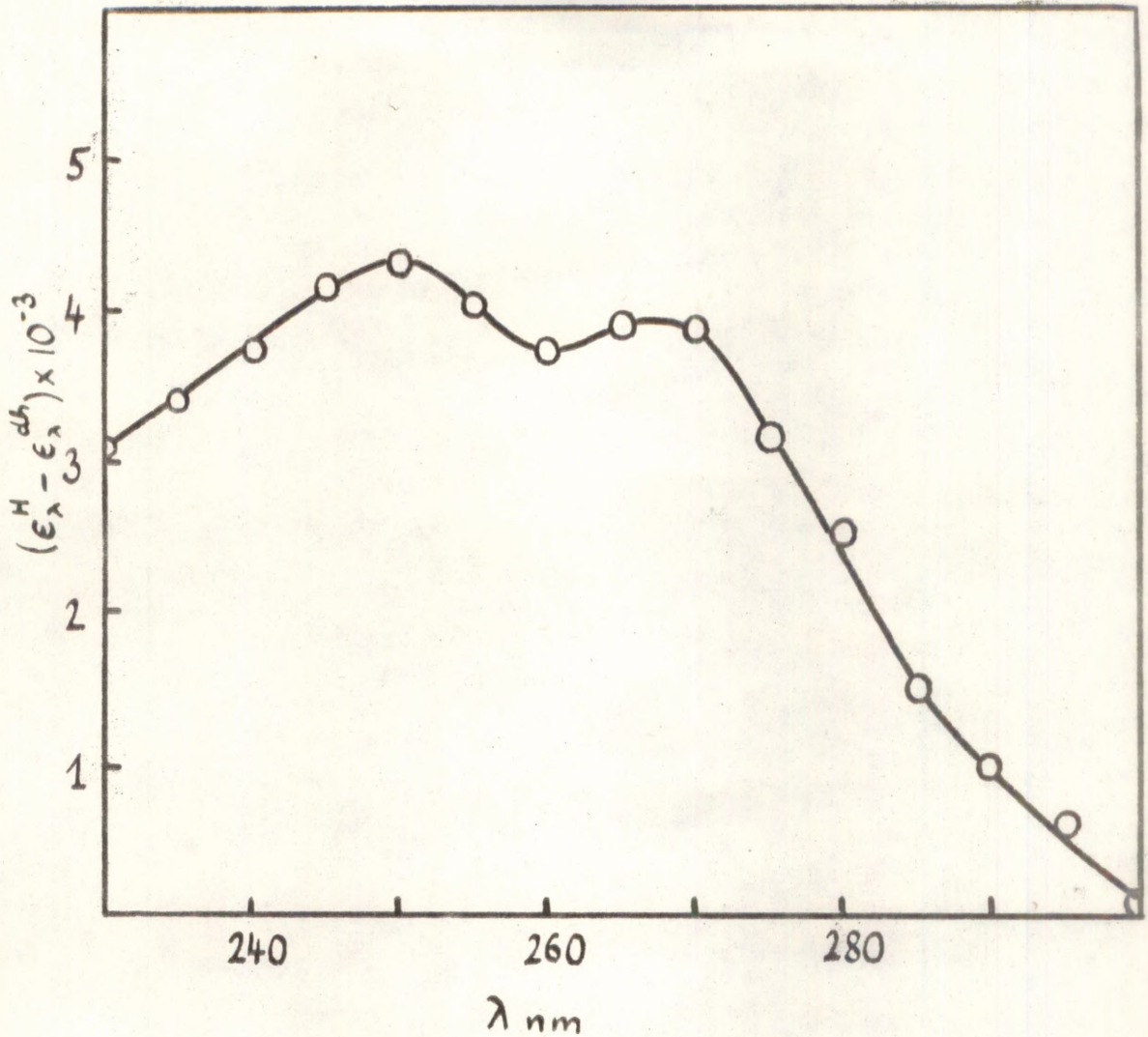
2.3. Eksperimentaalse 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalkõvera võrdlemine hüpoteetiliste diferentsiaalkõveratega

Joonisel 8 (Cox, 1970) on esitatud A·U ning G·C alusepaaride lahtisulamise diferentsiaalkõverad. Nende kõverate põhjal on välja arvutatud kaks hüpoteetilist kõverat mõlemaid alusepaare sisaldavate kaksikspiraalsete ahelate jaoks (joon. 17). Esimesel juhul (kõver IIa) on oletatud, et G·C paare on 70% ning A·U paare 30% alusepaaride koguhulgast. Teisel juhul

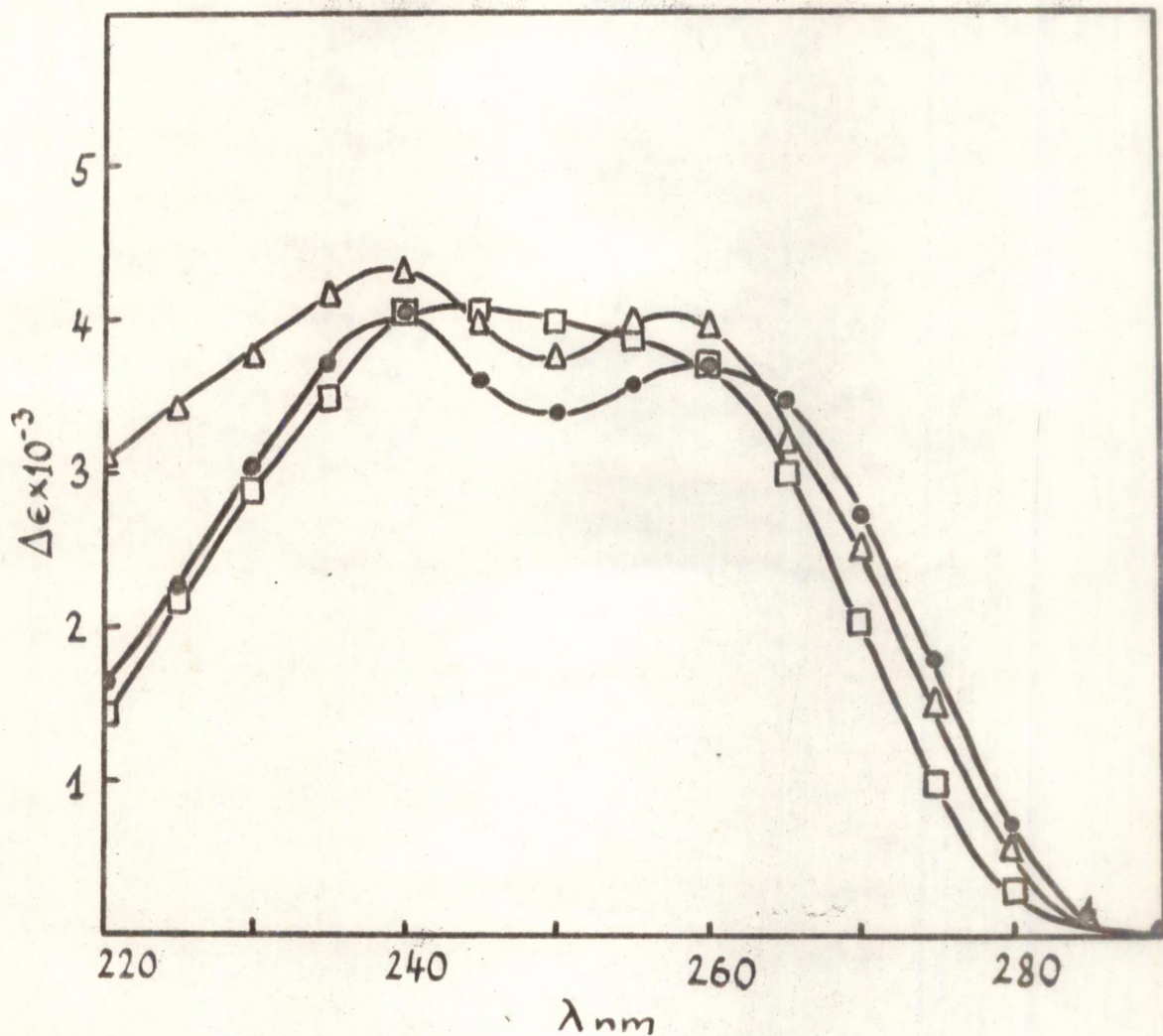


Joonis 15.

- - 5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient
- Δ - 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsient enne hüdrolüüsi
- - 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsient pärast hüdrolüüsi.



Joonis 16. 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaal-spekter. Spekter $(\epsilon_{\lambda}^H - \epsilon_{\lambda}^{dh})$ on võetud 0,01 M fosfaatpuhvrts, 0,3 M NaCl-is, pH 7,0 20° C juures.



Joonis 17.

1. Δ - roti maksast eraldatud 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspekter.
2. A·U; G·C paaride hüdrolüüsi diferentsiaalspektrite (Cox, 1970) järgi arvutatud hüpoteetilised spektrid
 - a) ● - 70% G·C + 30% A·U
 - b) □ - 50% G·C + 50% A·U

(köver IIb) on võetud, et mõlemaid alusepaare on 50% koguhulgast. Jooniselt on näha, et eksperimentaalse 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalkövera kuju sarnaneb enam köveraga IIa. Eksperimentaalse kövera nihkumine on ilmselt põhjustatud 5S RNA molekulis sisalduvate üheaahelaliste osade lahtisulamisest.

Seega oletus, et G•C paare on 70% ning A•U paare 30% alusepaaride üldhulgast, on küllalt tõenäone.

2.4. Empiirilise võrrandi ning eksperimentaalse leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektri sobivus

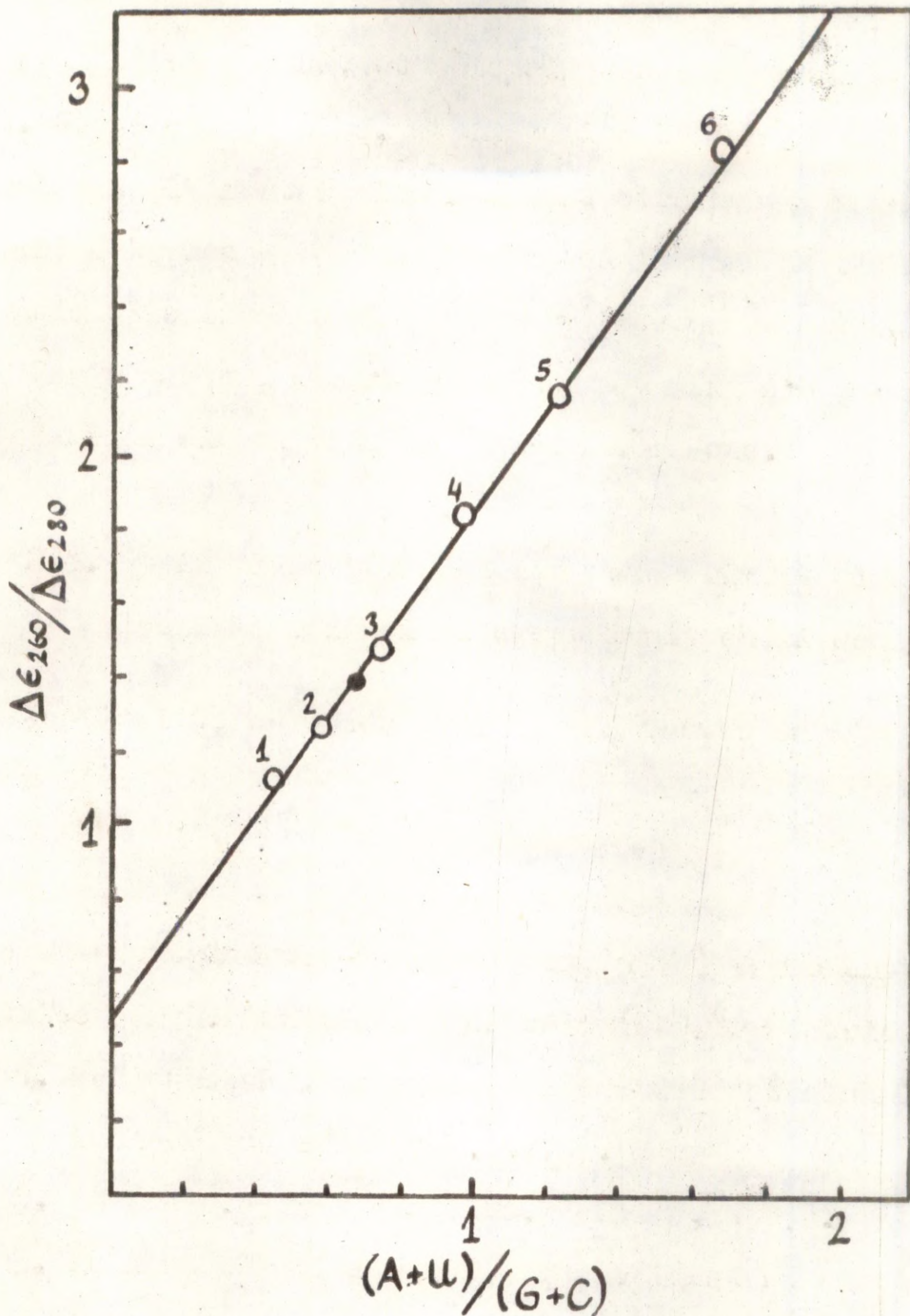
Joonisel 18 on toodud sirge, mis vastab empiirilisele võrrandile:

$$\frac{\Delta\epsilon_{260}}{\Delta\epsilon_{280}} = 1,38(A+U)/(G+C) + 0,45 \quad (A)$$

Sirge on arvutatud Cox-i poolt (Cox, 1970) termodenaturatsioonispektrite järgi. Punktid sirgel vastavad järgmistele RNA-dele.

1. Retikulotsüütide ribosoomide suuremast alaühikust isoleeritud rRNA (Cox, 1970).
2. 5S RNA E.colist (Boedker, Kelling, 1967).
3. Retikulotsüütide ribosoomide väiksemast alaühikust isoleeritud rRNA (Cox, 1970).
4. Kaksikspiraalne RNA (51% G+C) (Cox, 1970).
5. Tubaka mosaiikviiruse RNA (Fresco, 1963).
6. Kaksikspiraalne RNA (38% G+C) (Cox, 1970).

Roti maksast eraldatud 5S RNA jaoks $(A+U)/(G+C) \approx 1,69$. Seega peaks $\frac{\Delta\epsilon_{260}}{\Delta\epsilon_{280}}$, vastavalt empiirilisele võrrandile (A), võrduma 1,4-ga. Eksperimentaalsest 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektrist saame, et $\frac{\Delta\epsilon_{260}}{\Delta\epsilon_{280}} = 1,39$. Seega on roti maksast eraldatud 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaal-



Joonis 18. Sirge, mis vastab empiirilisele võrrandile $\Delta\epsilon_{260}/\Delta\epsilon_{280} = 1,38(A+U)/(G+C) + 0,45$ (Cox, 1970)

Seletus punktide 1-6 kohta antud lk. 35.

- - arvutatud roti maksast eraldatud 5S RNA leelis-hüdrolüüsi diferentsiaalspektri ning nukleotiidse koostise järgi.

spekter vastavuses teiste kirjanduses toodud ribonukleinhapete denaturatsiooni diferentsiaalspektritega ning eksperimentidist saadud tulemused usaldatavad.

3. 5S RNA sulamiskõverate järgi alusepaaride arvu ning spiraalsuse astme määramiseks kasutatava hüpoteesi kontroll

Kasutatava hüpoteesi järgi sisaldub 5S RNA molekulis ligikaudu 42-43 alusepaari, millest 29-30 on G•C ning 12-14 A•U paarid. See oletus põhineb KB-rakkude 5S RNA võimalike sekundaarsete struktuuride formaalsel analüüsil (Richards, 1969). Kontrolliks võeti variant, kus 5S RNA molekul sisaldab 30 G•C paari.

5S RNA-ga ekvimolaarse mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsient 280 nm juures on meil teada (tabel 3)

$$\epsilon_{280}^H = 5800$$

Analoogselt saame arvutada mononukleotiidide segu molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi 280 nm juures 30G ja 30 C lämmastikaluse jaoks:

$$\epsilon_{G-C, 280}^H = 3800$$

Lähtudes 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektrist (joon. 15) saame, et molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi muutus leelishüdrolüüsil 280 nm juures:

$$\Delta \epsilon_{280}^H = \epsilon_{280}^H - \epsilon_{280}^{dH} = 2500,$$

kus ϵ_{280}^{dh} ning ϵ_{280}^H on vastavad koefitsiendid enne ning pärast hüdrolüüsi.

Arvestades, et mittespiraliseerunud osadest tingitud hüperkroomia moodustab 280 nm juures 10% kogu muutusest (Villem, 1972), saame:

$$\Delta \epsilon_{280}^H = 2500 - 250 = 2250$$

Joonisel 8 (Cox, 1970) on esitatud A•U ning G•C lahtisulamise diferentsiaalkõverad, mis vastavad leelishüdrolüüsi diferentsiaalkõveratele. Näeme, et 280 nm juures A•U paaride sulamisest tingitud $\Delta \epsilon = 0$ ning G•C paaride sulamisest tingitud $\Delta \epsilon \approx \text{max}$. Seega

$$\Delta \epsilon_{280}^H = \Delta \epsilon_{G\cdot C, 280}^H,$$

kus $\Delta \epsilon_{G\cdot C, 280}^H$ on 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi muutus 280 nm juures täielikul hüdrolüüsil 30 G•C alusepaari lahtisulamise tõttu.

Edasi arvutame

$$\epsilon_{G\cdot C, 280}^{dh} = \epsilon_{G\cdot C, 280}^H - \Delta \epsilon_{G\cdot C, 280}^H = 1550$$

Kuna kirjanduse andmete põhjal (Cox, 1970) suureneb G•C paaride lahtisulamisel ekstinktsioon 280 nm juures 150%, siis teoreetilise $\Delta \epsilon_{G\cdot C, 280}^H$ jaoks saame väärtuse 3900, mis on kooskõlas eelpool arvatud tulemusega-3800.

4. 5S RNA isotermilised konformatsioonilised üleminekud

4.1. 5S RNA tiitrimine Na^+ ioonidega

5S RNA tiitrimisel NaCl-ga võis ekstinktsiooni vähenemist täheldada kõikidel lainepikkustel 220-320 nm-ni. 5S RNA ekstinktsiooni sõltuvus 260 nm juures NaCl kontsentratsioonist on antud joonisel 19. Näeme, et NaCl kontsentratsiooni muutmisel vahemikus 10^{-3} M - 2 M, kahanes 5S RNA ekstinktsioon 260 nm juures 5% oma algväärtusest, kusjuures 90% muutusest toimus NaCl kontsentratsioonide vahemikus $5 \cdot 10^{-3}$ - 10^{-1} M.

4.2. 5'-nukleosiidmonofosfaatide segu tiitrimine Na^+ ioonidega

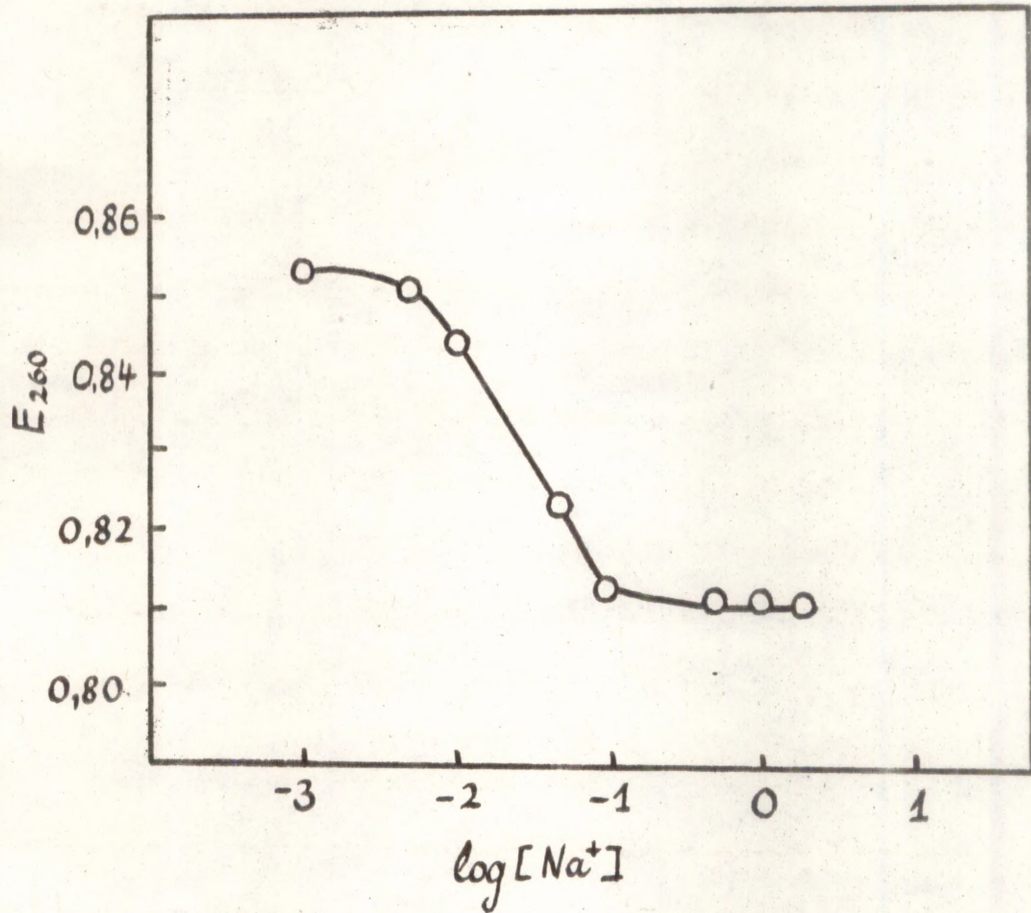
Väite tõestuseks, et 5S RNA tiitrimisel NaCl-ga saadud ekstinktsiooni muutused viitavad just konformatsioonilistele muutustele, tiitriti NaCl-ga ka 5'-nukleosiidmonofosfaatide segu (joon. 20).

Näeme, et ekstinktsioon sellise struktuurita 5'-nukleosiidmonofosfaatide segu puhul ei sõltu Na^+ ioonide kontsentratsioonist.

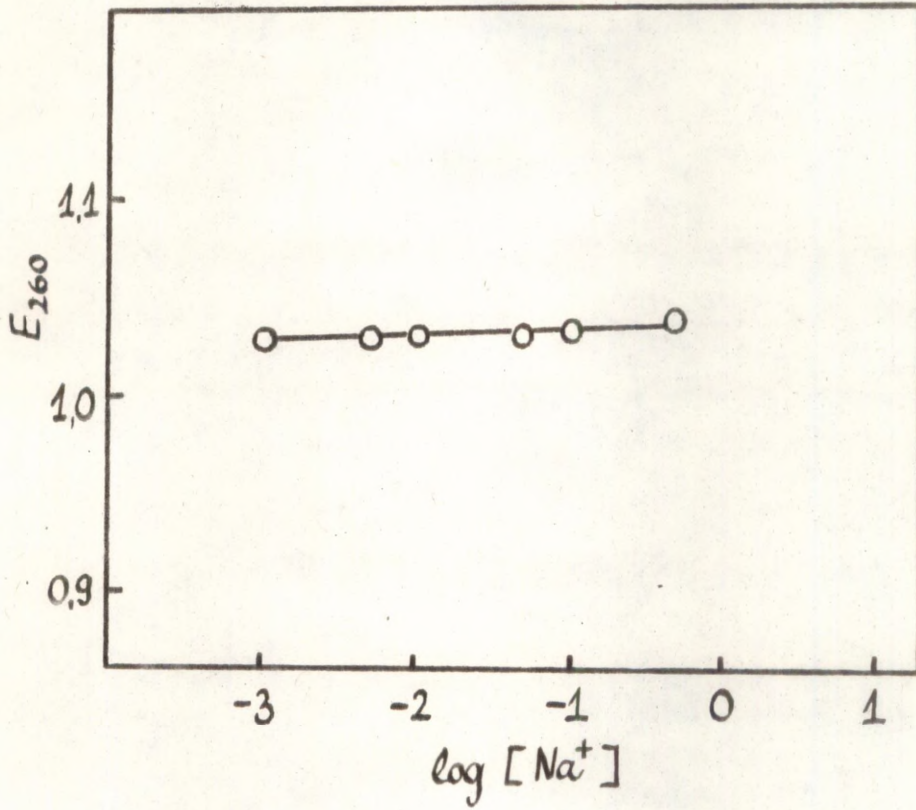
4.3. 5S RNA tiitrimine Mg^{2+} ioonidega

5S RNA ekstinktsioon vähenes MgCl_2 -ga tiitrimisel kõikidel lainepikkustel 220 nm kuni 320 nm-ni.

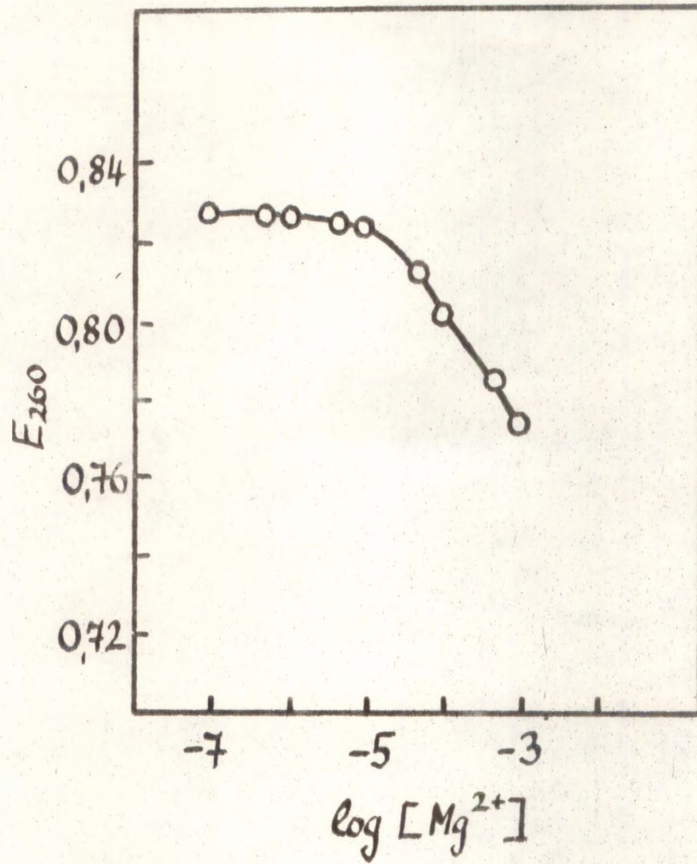
5S RNA ekstinktsiooni sõltuvus MgCl_2 kontsentratsioonist 260 nm juures on antud joonisel 21. Näeme, et 260 nm juures kahanes 5S RNA ekstinktsioon MgCl_2 kontsentratsiooni muutmisel



Joonis 19. 5S RNA tiitrimine NaCl-ga.



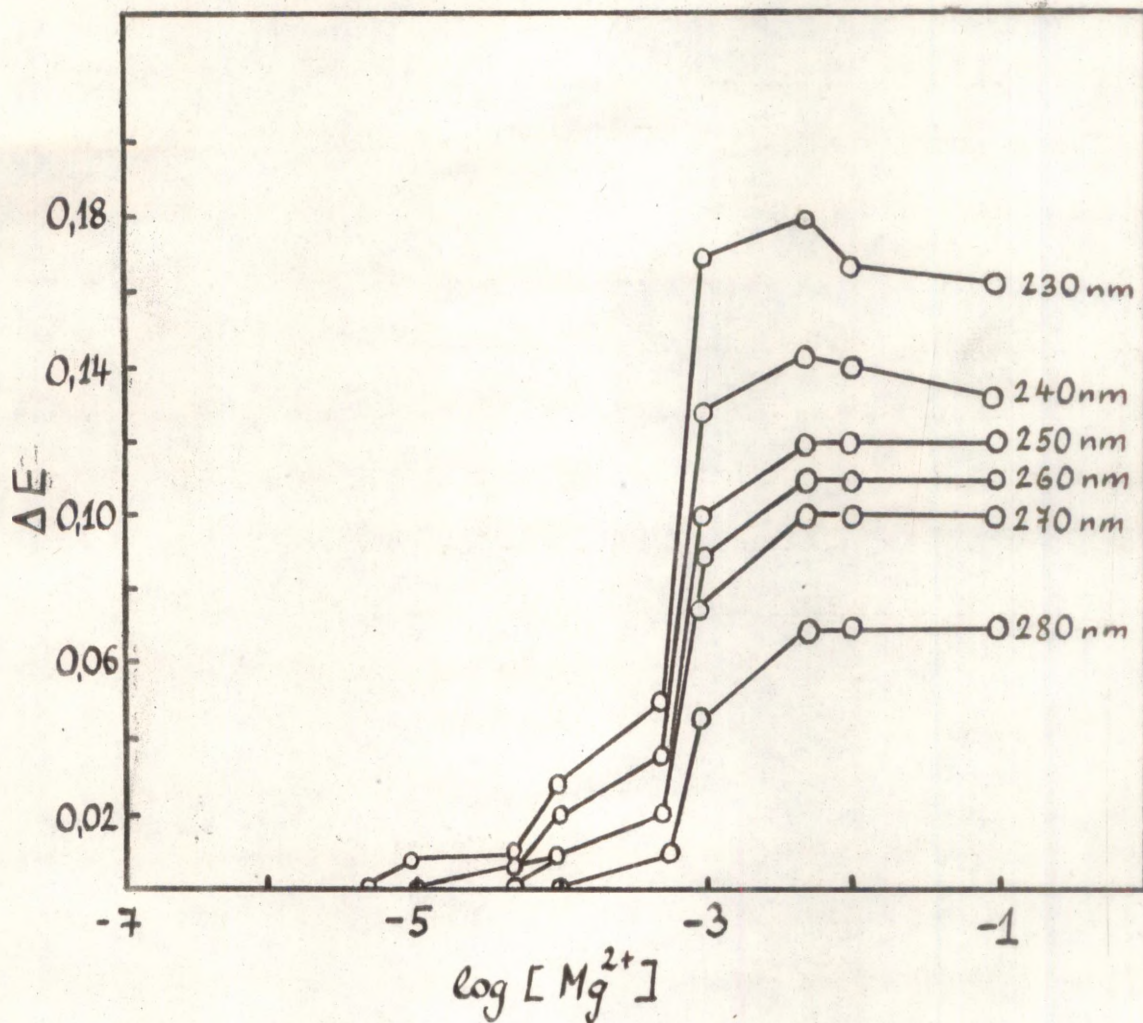
Joonis 20. 5' monofosfaatide segu tiitrimine NaCl-ga.



Joonis 21. 5S RNA tiitrimine $MgCl_2$ -ga.

10^{-7} M - 10^{-3} M-ni 6,75% oma algväärtusest. Muutusest 95% toimus MgCl_2 kontsentratsiooni vahemikus 10^{-5} - 10^{-3} M. MgCl_2 -ga tiitrimise diferentsiaalkõverad on esitatud joonisel 22. Näeme, et kõikidel lainepikkustel ekstinktsiooni muutus saab märgatavaks 10^{-5} M MgCl_2 kontsentratsiooni juures. Kontsentratsiooni vahemikus $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} M, toimub järsk ekstinktsiooni kahanemine, mis sõltuvalt lainepikkusest on 50% (280 nm) kuni 80% (230 nm) kogumuutusest.

Tiitritava 5S RNA ekstinktsioon 260 nm juures oli 1,55. Arvestades seda, et 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsient 260 nm juures on 7050 ning molekulaal 42000, saame 5S RNA lahuse molaarsuseks $2,3 \cdot 10^{-4}$. Seega toimub 5S RNA ekstinktsiooni järsk kahanemine MgCl_2 -ga tiitrimisel siis, kui 5S RNA ning MgCl_2 molaarsus on samas suurusjärgus.



Joonis 22. 5S RNA $MgCl_2$ -ga tiitrimise
diferentsiaalkõverad.

III. TULEMUSTE ARUTELU JA JÄRELDUSED

1. 5S RNA isoleerimine

5S RNA eraldamisega roti maksa ribosoomidest vabaneti glükogeeni kõrgmolekulaarsest fraktsioonist. Kuna 5S RNA eraldamisel üldisest tsütoplasmaalsest ribonukleiinhappest glükogeeni kõrgmolekulaarsest fraktsioonist vabanemine on raskendatud, tuleb ribosoomidest eraldamise meetodit lugeda eelistatunaks, kuigi 5S RNA saagis tsütoplasmaalsest ribonukleiinhappest on tavaliselt suurem kui ribosoomidest eraldamisel.

5S RNA eraldamiseks summaarsest tRNA-st ning kmRNA-st, kasutati kromatograafiat sephadex G-75 kolonnil. Eraldumine sephadex G-75 kolonnil oli rahuldav. Siiski viidi läbi veel 5S RNA fraktsiooni rekromatograafia suurema puhtusastme saavutamiseks.

5S RNA saagis oli ligikaudu 5 mg (75 g maksast). Kuna eraldatud 5S RNA-ga tuli edaspidi sooritada katseid kindlatel lahuse ioonsetel jõududel, viidi läbi puhastamine sephadex G-15 kolonnil. Loodetav puhtusaste on 1 Mg aatom/1 5SRNA molekul.

2. 5S RNA leelishüdrolüüs

5S RNA leelishüdrolüüsi spektri (joon. 14) ning mononukleotiidide neutraalsete spektrite abil (Pabst Circular OR-10, 1969) määrati 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koefitsient. 260 nm juures saadi molaarse ekstinktsiooni koefitsiendi väärtuseks 7050, millest kirjanduse andmete põhjal (Cox, 1970) võib järeldada, et kasutatav 5S RNA ei olnud lagunenu.

Kasutades 5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektrit (joon. 15) tõestati 5S RNA sulamiskõverate järgi alusepaaride arvu ning spiraalsuse astme määramiseks kasutatav^a hüpoteesi õigsus. Selle hüpoteesi järgi sisaldub 5S RNA molekulis ligikaudu 42 alusepaari, millest 30, s.t. 71% on G•C paarid.

5S RNA leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektri võrdlemisel hüpoteetiliste diferentsiaalspektritega (joon. 16) selgus samuti, et roti maksast eraldatud 5S RNA molekulis olevatest alusepaaridest on ligikaudu 70% G•C paarid.

Empiirilise võrrandi

$$\Delta \epsilon_{260} / \Delta \epsilon_{280} = 1,38(A+U)/(G+C) + 0,45 \quad (\text{Cox, 1970})$$

ning eksperimentaalse leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektri sobivus (joon. 18) tõendas eksperimendist saadud tulemuste usaldusväarsust.

3. Isotermilised konformatsioonilised üleminekud

Käesolevas töös kasutati isotermiliste konformatsiooniliste üleminekute fikseerimiseks asjaolu, et 5S RNA ruumiline kokkupakkumine positiivsete Na^+ ning Mg^{2+} ioonide mõjul toob endaga kaasa 5S RNA ekstinktsiooni kahanemise.

Eksperimendi tulemused näitavad, et Mg^{2+} ning Na^+ ioonidest põhjustatud konformatsioonilised üleminekud on kooperatiivsed, kusjuures nõutav MgCl_2 kontsentratsioon on 10^3 korda (10^{-3} M) väiksem vastavast NaCl kontsentratsioonist (1 M). Arvutustest saame, et MgCl_2 -ga tiitrimisel toimub üleminek siis, kui 5S RNA ning MgCl_2 molaarsused on samas suurusjärgus.

Na^+ ja Mg^{2+} ioonide mõju 5S RNA konformatsioonile on seletatav nende stabiliseeriva toimega, mis võiks olla tingitud negatiivsete fosfaatrühmade ekraniseerimisest positiivsete ioonidega. Stabiliseerumisprotsessi olemus on lõplikult välja selgitamata.

Teostatud katsetest saadud tulemustel on praktiline väärtus.

1. Teades lahuste ioonseid jõude, saame 5S RNA kontsentratsioone eri lahustes omavahel võrrelda.
2. Molekuli pinna uurimisel on tähtis, et molekul omaks natiivsele lähedast tertsiaarset struktuuri - oleks kokkupakitud. Lisades Na^+ või Mg^{2+} ioone vastavas koguses, võime olla kindlad sellise struktuuri olemasolus.

K o k k u v ö t e

1. Roti maksa ribosoomidest eraldati kromatograafiliselt puhas 5S RNA.

2. Määrati eraldatud 5S RNA molaarse ekstinktsiooni koeffitsient ning selle sõltuvus NaCl kontsentratsioonist lahuses neutraalse pH juures. 0,15 M NaCl, 0,01 M fosfaatpuhvril pH 7,0 juures on vastav arv 7050.

3. Kasutades leelishüdrolüüsi diferentsiaalspektrit ($\epsilon_{\lambda}^{dh} - \epsilon_{\lambda}^H$), arvutati 5S RNA jaoks:

- a) G•C ja A•U paaride absoluutne arv (vastavalt 29-30 ja 12-14);
- b) spiralisatsiooni aste (0,73).

Leiti, et saadud andmed on heas kooskõlas

- a) teoreetiliselt arvutatava diferentsiaalspektriga;
- b) termodenaturatsiooni diferentsiaalspektritest arvutatud G•C ja A•U paaride suhtelise hulgaga.

4. Uuriti 5S RNA isotermilisi konformatsioonilisi muutusi 20°C juures. Leiti, et 5S RNA tiitrimisel kahevalentsete vastasioonidega (Mg^{2+}) neutraalse pH juures toimub kooperatiivne konformatsiooniline üleminek siis, kui 5S RNA ja Mg^{2+} molaarsed kontsentratsioonid on samas suurusjärgus.

E. Linn

Kasutatud kirjandus

1. Бреслер, С.Е. Молекулярная биология. Наука, Л. (1973).
2. Виллемс, Р.Л. Канд. дисс. Тарту (1972).
3. Виллемс, Р.Л. Автореферат, Тарту (1972).
4. Виллемс, Р.Л., Линд, А., Труды по медицине XXIII, Тарту (1971).
5. Девидсон, Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. Мир, М. (1968).
6. Кочеткова, Н.К., Будовский, Э.И. Органическая химия нуклеиновых кислот. Химия. М. (1970).
7. Мартин, Р., Введение в биофизическую химию. Мир, М. (1966).
8. Методы исследования нуклеиновых кислот. Мир, М. (1970).
9. Основные правила безопасности работы в химической лаборатории. Утверждены Госкомитетом химической промышленности при Госплане СССР 10 февраля 1964 г. - Техника безопасности и производственная санитария в химической промышленности. "Химия, М. 705-761 (1965).
10. Санитарные нормы проектирования промышленных предприятий СН 245-71. Утверждены Госстроем СССР 5 ноября 1971 г. Стройиздат, 1972.
11. Elektriseadmete ehituse eeskirjad. 1. jagu. Üldeeskirjad.
12. Ritslaid, V. Töökaitse. II Töötervishoid. 283 lk. TRÜ rotaprint. Tartu (1971).
13. TRÜkeemiaosakonna praktikumide üldeeskirjad ja laboratooriumides töötamise kord. II parandatud väljaanne. 26 lk. TRÜrotaprint. Tartu (1973).

14. Arnott, S. The Structure of Transfer RNA, in: Progr. Biophys. Mol. Biol. 22, pp. 181-213 (1971).
15. Aubert, M., Scott, J.F., Reynier, M., Monier, R. Proc. Nath. Acad. Sci. U.S. 61, 292 (1968).
16. Boedtker, H., Kelling D.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 758, 1967.
17. Brownlee, G.G., Sanger, F.J. Mol. Biol. 23, 337 (1967).
18. Brownlee, G.G., Sanger, F., Barrell, B.G., Nature 215, 735 (1967).
19. Cox, R.A. Biochem. J. 120, 539 (1970).
20. Danchin, A. Biopolymer 11, 7, pp. 1317-1333 (1972).
21. DuBuy, B., Weissmann, S.M. J. Biol. Chem. 246, 747 (1971).
22. Forget, B.G., Weissmann, S.M. J. Biol. Chem. 244, 3148 (1969).
23. Fresco, J.R., Klotz, L.C., Richards, F.G. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 83 (1963).
24. Goldstein, R.N., Stefanovic, S., Kallenbach, N.R. J. Mol. Biol. 69, 2, pp. 217-236 (1972).
25. Gray, P.N., Saunders, G.F. Arch. Biochem. Biophys. 156, 104 (1973).
26. Holley, R., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisse, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A. Science 147, 1462 (1965).
27. Lapidus, R., Rosen, B.J. Theor. Biol. 27, 417 (1970).
28. Lewis, J.B., Doty, P., Nature 225, 510 (1970).
29. Madison, J.T. Ann. Rev. Biochem. 37, 131 (1968).
30. Mirzabekov, A.D., Griffin, B.E. J. Mol. Biol. 72, 633 (1972).
31. Pabst Circular OR-10 (1969).

32. Raacke, J.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 528 (1968).
33. Reeves, R.H., Cantor, C.R., Chambers, R.W. *Biochem.* 9, 20, pp. 3993-4002 (1970).
34. Richards, E.G. *Eur. J. Biochem.* 10, pp- 36-42 (1969).
35. Richards, E.G., Lecanidou, R., Geroch, M.E. *Eur. J. Biochem.* 34, pp. 262-267 (1970).
36. Riesner, D., Römer, R., Maass, G. *Biochem Biophys. Research Comm.* 35, 3 (1969).
37. Rosset, J., Monier, R. *Biochem. Biophys. Acta* 68, 653 (1963).
38. Römer, R., Riesner, D., Maass, G. *Eur. J. Biochem.* 15, pp. 77.84 (1970).
39. Scott, J.F., Monier, R., Aubert, H., Reynier, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33, 794 (1968).
40. Tinoco, J., Uhlenbeck, O.C., Levine, M.D. *Nature* 230, 9, pp. 362-367 (1971).
41. Uhlenbeck, O.C., Baller, J. Doty, P. *Nature* 225, 508 (1970).
42. Vigne, R., Yordan, B.R. *Biochem.* 53, 981 (1971).
43. Yang, S.K., Crothers, D.M. *Biochemistry* 11, 23 (1972).

Резюме

1. Из рибозом печени крысы выделили хроматографически чистую 5S РНК.

2. Определили коэффициент молярной экстинкции выделенной 5S РНК и определялась его зависимость от $NaCl$ в растворе при нейтральном pH . При pH 7,0, в 1М фосфатном буфере содержащем 0,15М $NaCl$ соответствующая величина равна 7050.

3. На основании дифференциального спектра щелочного гидролизата 5S РНК вычислено:

а) абсолютное число $G \cdot C$ и $A \cdot U$ пар, равное, соответственно 29-30 и 12-14.

б) степень спирализации (0,73).

Найдено что полученные результаты согласуются:

а) с теоретически рассчитанным дифференциальным спектром.

б) с рассчитанным на основе дифференциальных спектров термоденатурации относительным количеством $G \cdot C$ и $A \cdot U$ пар.

4. Исследовали изотермические конформационные переходы 5S РНК при 20 С. Конформационный переход при титровании 5S РНК двухвалентными противоионами (Mg^{2+}) происходит при однопорядковых молярных концентрациях 5S РНК и $MgCl_2$.

Summary

1. Chromatographically pure 5S RNA was isolated from the rat liver ribosomes.

2. The dependence of ϵ'_λ of 5S RNA upon NaCl concentration in the solvent was studied. In 0.01M-phosphate buffer, 0.15M NaCl, pH 7.0, it was found to be 7050.

3. Using the alkaline hydrolysis difference spectra of 5S RNA ($\epsilon_\lambda^{\text{alk}} - \epsilon_\lambda^{\text{H}}$) the number of G•C and A•U base pairs in the molecule (respectively 29-30 and 12-14) and double helical content (0.73) were calculated.

The experimental data are in good agreement with theoretically calculated difference spectra and the relative number of G•C and A•U base pairs calculated from the thermodenaturation difference spectra.

4. Isothermal conformational changes of 5S RNA at 20 C were studied. By titration with divalent counterions (Mg^{2+}) at neutral pH the isothermal conformational change occurs when molar concentrations of 5S RNA and Mg^{2+} are in the same degree of magnitude.