

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
molekulaarbioloogia õppetool

KAI VIRUMÄE

**tRNA 3'-CCA ROLLIST TRANSLATSIOONIL
JA
AMINOHAPPE ROLLIST AMINOATSÜÜL-tRNA SELEKTSIOONIL**

Magistritöö

Juhendaja:
Jaanus Remme

Tartu 2005

SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 tRNA struktuur	7
1.2. Aminoatsüül-tRNA süntetaasid ja aminoatsüleerimine.....	8
1.3. Ribosoomi struktuur.....	10
1.4. Translatsiooni initsiatsioon ja terminatsioon	11
1.5. Translatsiooni elongatsioon.....	12
1.5.1. Kolmikkompleksi seondumine	12
1.5.2. Peptidüültransferaas	15
1.5.3. Translokatsioon.....	16
1.6. tRNA interaktsioonid ribosoomiga	18
1.6.1. tRNA 3`-CCA interaktsioonid ribosoomis	19
2. MATERJAL JA MEETODID	21
2.1 tRNA ja mRNA <i>in vitro</i> transkriptioniks vajalikud konstruktid	21
2.2. tRNA ja mRNA <i>in vitro</i> transkriptsioon	21
2.3. tRNA ja mRNA puhastamine	22
2.4. tRNA aminoatsüleerimine ja aminohapejäagi N-atsüleerimine.....	23
2.5. Ensüümide ekspressioonikonstruktid ja puhastamine.....	25
2.6. S100 ensüümifraktsiooni eraldamine rakulüsaadist.....	26
2.7. Ribosoomi subühikute eraldamine sahharoosigradiendis	27
2.8. <i>Tight-coupled</i> 70S ribosoomide eraldamine tsonaalsel tsentrifuugimisel. .	27
2.9. Polü(GUA)₄₄ sõltuvad <i>in vitro</i> eksperimendid	28
2.9.1 polü(GUA) ₄₄ sõltuvad translatsioonikatsed	29
2.9.2. polü(GUA) ₄₄ sõltuvad dipeptiidikatsed	30
2.9.3. polü(GUA) ₄₄ sõltuvad translokatsioonikatsed	30
2.9.4. Val-tRNA, NAcVal-tRNA ja deatsüleeritud tRNA seondumine ribosoomidele.....	31

2.10. polü(GUU)₄₈ sõltuvad <i>in vitro</i> eksperimendid	31
2.10.1 polü(GUU) ₄₈ sõltuvad translatsioonikatsed	31
2.10.2. GTPaasireaktsioonid	32
3. TULEMUSED.....	34
3.1. tRNA A76G asenduse funktsionaalne tähtsus ribosomaalsel translatsioonil	34
3.1.1. Asenduse A76G mõju tRNA ^{Val} aminoatsüleerimisele.....	34
3.1.2. A76G asendusega Val-tRNA ^{Val} aktiivsus polü(GUA) ₄₄ sõltuval <i>in vitro</i> translatsioonil.....	34
3.1.3. A76G asendusega Val-tRNA ^{Val} aktiivsus polü(GUA) ₄₄ sõltuva translatsiooni initsiatsioonil ja elongatsioonil.....	39
3.1.5. A76G asendusega deatsüleeritud tRNA ^{Val} liikumine ribosoomi P-saidist E-saiti	42
3.1.6. A76G asendusega NAcVal-tRNA ^{Val} liikumine ribosoomi A-saidist P-saiti	43
3.2. Aminohappe osa multifunktsionaalsete aa-tRNA selektsioonil.....	44
3.2.1. Multifunktsionaalsete tRNAde aminoatsüleerimine.....	45
3.2.2. Aminoatsüleeritud multifunktsionaalsed tRNAd polü(GUU) ₄₈ sõltuvas translatsioonis	46
3.2.3. Kahe aminohappe vaheline konkurents polü(GUU) ₄₈ sõltuvas kotranslatsioonis	47
3.2.4. GTPaasi reaktsioon	52
4. ARUTELU.....	55
4.1. tRNA₁^{Val} A76G asenduse funktsionaalne tähtsus ribosomaalsel translatsioonil	55
4.2 Aminohappe osa multifunktsionaalsete aa-tRNA selektsioonil.....	58
KOKKUVÕTE.....	64
SUMMARY.....	65
KASUTATUD KIRJANDUS	66
LISA.....	74

KASUTATUD LÜHENDID

AARS - aminoatsüül-tRNA süntetaas

Aa-tRNA - aminoatsüül-tRNA

AlaRS - alanüül-tRNA süntetaas

ATP, CTP, GTP, UTP - adeniin-, tsütidiin-, guaniin-, uridiin-trifosfaat

EF-G - elongatsiooni faktor G

EF-Tu - elongatsiooni faktor Tu

EF-Ts - elongatsiooni faktor Ts

IF - initsiatsioonifaktor

RF - terminatsioonifaktor

RRF - ribosoomi vabastav faktor, ribosome release factor

PAAG - polüakrüülamiidgeel

PheRS, AlaRS, ValRS - fenüülalanüül-, alanüül-, valüül-tRNA süntetaas

PPaas - pürofosfataas

PTC - 50S ribosoomi peptidüültransferaasi keskus

SRL - 23S rRNA sartsiin-ritsiin ling

ValRS – valüül-tRNA süntetaas

SISSEJUHATUS

Valgu biosünteesil toimub mRNA vahendatud geneetilise info tõlkimine valkude aminohappeliseks järjesuseks. Keskne osa selles protsessis on tRNA^l, mis transpordib aminohappe ribosoomi, tunneb ära mRNA koodoni ning osaleb peptiidahelale uue aminohappe lisamisel. Selleks, et osaleda aminoatsüleerimisel ja peptiidi sünteesil peab tRNA 3'otsas olema üheaahelaline CCA järjestus. Selle järjestuse abil seondud tRNA aminoatsüül-tRNA süntetaasiga ning tRNA terminaalse adenosini A76 riboosi 2' - või 3' - hüdroksüülile seotakse aminohappejääk (*Liu ja Horowitz 1994*). tRNA CCA järjestus on tähtis seondumisel nii EF-Tu^gga (*Liu et al 1994*) kui ribosoomi suure subühiku A- ja P-saiti (*Samaha et al 1995; Kim ja Green 1999; Wower et al 2000*). Ribosoomiga seondumine fikseerib tRNA peptidüültransferaasi reaktsiooni jaoks, kuna tRNA terminaalne A76 on koht, kus toimub peptiidideme moodustumine (*Chladek ja Sprinzl 1985*). Peptidüültransferaasi reaktsiooni jaoks on oluline tRNA CCA järjestus (*Tetzuka ja Chladek 1990*) ning mutatsioonid selles piirkonnas mõjutavad tRNA aktiivsust (*Tamura 1994*).

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli võrrelda A76G asendusega tRNA^{Val} aktiivsust metsiktüüpi tRNA^{Val} aktiivsusega polü(GUA) sõltuval polüvaliin ahela sünteesil ning translatsiooni elongatsiooni erinevatel etappidel.

Aminohappe lülitumine valku on määratud kahe protsessi: aminoatsüül-tRNA sünteesi ning ribosoomis toimuva dekodeerimisprotsessi poolt. Siiani on arvatud, et aminohappe seleksioon toimub vaid aminoatsüül-tRNA süntetaaside poolt ja aminoatsüleerimisprotsessi täpsuse tagab aminoatsüül-tRNA süntetaasi spetsiifika aminohappe ja tRNA suhtes ning kineetilise *proofreading* mehhanismid. Aminohappe lülitumine polüpeptiidi sõltub eelkõige koodon-antikoodon kompleksi moodustamisest ning selle stabiilsusest (*Rodnina & Wintermeyer, 2001ab*). Ribosoomi peptidüültransferaasne tšenter on koht, kuhu seonduvad erineva suuruse ja reaktiivsusega aminohapped. Aminohappe reaktiivsus so võime moodustada peptiidideme, on tähtis parameeter, millest sõltub aminohappe polüpeptiidi lülitamise efektiivsus. Aromaatsete aminohapete derivaadid - A-Tyr ja A-Phe - on peptidüültransferaasis kõige tugevamad aktseptorsubstraadid ning väikesed aminohapped, nagu näiteks A-Gly, kõige nõrgemad (*Chladek ja Sprinzl 1985; Krayevsky ja Kukhanova 1979*). Aminohapete reaktiivsuse ja neile vastavate koodon-antikoodon dupleksi vahel on negatiivne korrelatsioon (*Remme ja VILLEMS 1985*)

Käesoleva töö teises osas püüame multifunktsionaalsete tRNAde abil aru saada aminohappe osast aminoatsüül-tRNA seleksioonil.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 tRNA struktuur

Raku kesksel protsessil, valgu biosünteesil, on oluline osa tRNA^l, mis tunneb ära mRNA koodoni ja osaleb aminohappe transpordil ja peptiidahelale uue aminohappe lisamisel. tRNA avastas 1958. aastal Paul Zamecnik *in vitro* translatsiooni eksperimenti tehes. Esimese tRNA^{ala} järjestuse tegi peale 7 aastat kestnud uurimist 1965.a. kindlaks Robert Holley. Holley kirjeldas tRNA sekundaarstruktuuri ristikeinaku kujulisena - 3 heelikslingu-, ühe lisalingu- ja üheaahelalise 3'-CCA-otsaga. 1974 aastal kirjeldasid Alexander Rick ja Aaron Klug pärmi tRNA^{Phe} kristallstruktuuri. tRNA tertsiaarstruktuuril on 2 olulist piirkonda: antikoodonling mRNA koodoni äratundmiseks ja aktseptorheeliks koos 3'-otsas oleva üheaahelalise CCA järjestusega.

Kõigi teada-tuntud küpsete st protsessitud ja modifitseeritud deatsüleeritud tRNA 3'otsas paikneb alati paardumata üheaahelaline universaalselt konserveerunud CCA järjestus, mis seostub enamasti üle puriinaluse tRNA aktseptorheeliksile (*Chladek ja Sprinzl 1985*). Kuigi *E. coli* tRNA 3'-CCA on genoomne, lisatakse see paljude prokarüootide tRNA^l dele posttranskriptsioonilise protsessimise käigus ATP(CTP)-tRNA nukleotidültransferaasi poolt. tRNA 3'-CCA järjestus on korrastatud struktuuriga, mida stabiliseerivad stäking-interaktsioonid aktseptorheeliksis (*Chladek ja Sprinzl 1985*). Kuigi tRNA stäking-interaktsioonid vähenevad 3'-otsa pool ja terminaalne A76 liikumisvabadus on suurem kui C75, mõjutab terminaalne A76 deleteerimine kogu tRNA struktuuri (*Krayevsky ja Kukhanova 1979*). Arvatakse, et keskkonna muutuste mõjul toimuvad tRNA 3'-CCA struktuurimuutused võimaldavad tRNA^l seonduda erinevate substraatidega (*Chladek ja Sprinzl 1985*).

Kõigil tRNA^ldel peab olema terminaalne CCA järjestus, et osaleda aminoatsüleerimisel ja peptiidi sünteesil. tRNA terminaalne adensiin A76 riboosi 2'- või 3'- hüdroksüülile seondub estersidemega aminohappejääk ning selle järjestuse abil seondub tRNA aminoatsüül-tRNA süntetaasiga (AARS) (*Liu ja Horowitz 1994*). tRNA CCA järjestuse tähtsust on näidatud ka kolmikkompleksi moodustumisel (*Liu et al 1994*). CCA järjestuse seondumine ribosoomi suure subühikuga 23 rRNA konserveerunud alustega (*Samaha. et al 1995; Kim ja Green 1999*) fikseerib tRNA

peptidüültransferaasi reaktsiooniks. tRNA terminaalne A76 on kuht, kus toimub keemiline reaktsioon - peptidüültransferaas (*Chladek ja Sprinzl 1985*).

1.2. Aminoatsüül-tRNA süntetaasid ja aminoatsüleerimine

Geneetilise koodi transleerimine polüpeptiidseks järjestuseks vajab õige aminoahappe lülitamist õigele tRNAle. Aminohappejäägi sidumise tRNA`le katalüüsib aminohappespetsiifiline aminoatsüül-tRNA süntetaas (AARS). AARS moodustavad ATP seondumissaidi topoloogia põhjal kaks kindlat ensüümide perekonda, mis omakorda jaotuvad seondatava aminohappe omaduste või struktuuri järgi alamklassideks. Klass I ensüümid seonduvad tRNAle aktseptorheeliksile väikese vao poolt ja sellest tulenevalt seovad aminohappe A76 riboosi 2'-OH külge (*Giege et al 1998*). Klass II ensüümid seonduvad tRNA aktseptorheeliksile suure vao poolt ja seovad aminohappe A76 riboosi 3'-OH külge. Erandiks on klass II ensüüm PheRS, mis seob aminohappejäägi 2'-OH külge. Sellest tulenevalt on ka tRNA 3'-CCA ots kahe klassi ensüümidel aktiivtsentris erinevalt orienteeritud.

tRNA identifitseerimine AARS poolt on tagatud kindlate nukleotiididega üheaahelalistes piirkondades, kindlate aluspaaridega heeliksites või struktuuri motiividega (*Giege et al 1998*). tRNA ja AARS vahelist interaktsiooni soodustavaid struktuuriotsi nimetatakse identsuselementideks ning takistavaid antideterminantideks. AlaRS jaoks on üheks olulisemaks identsuselemendiks G3:U70 aluspaar tRNA aktseptorheeliksis ja selle interaktsiooni poolt põhjustatud heeliksi tertsaarne struktuur (*Lovato et al 2004*), samas ValRS jaoks on sama aluspaar üheks antideterminandiks (*Liu et al 1997*). Kuigi tRNA alused on ohtralt modifitseeritud, ei oma modifikatsioonid olulist mõju aminoatsüleerimisele (*Giege et al 1998*).

Aminoatsüleerimise reaktsioon koosneb kahest osast. Aminohappe seondumisel ensüümi aktiivtsentrisse, sünteesitakse ATP juresolekul aktiivne intermediaat - aminoatsüül-adelülaat:



Seejärel seotakse aminohappejääk ensüümile seondunud tRNA 3`-terminaalse A76 2`- või 3`-hüdrosüülile:



Aminoatsüleerimise toimub kationide (eelkõige Mg^{2+} -ioonide) osalusel. Mg^{2+} -ioon olla AARS aktiivtsentri struktuuriosa või osaleda katalüüsis (Arnes ja Moras 1997). Näiteks SerRS aktiivtsentris aitavad Mg^{2+} -ioonid stabiliseerida ATP konformatsiooni moodutades silla β - ja γ - fosfaatide vahel, GlnRS ja AsPRS aktiivtsentris assisteerib Mg^{2+} β - fosfaadilt elektroni ülekannet.

Kuigi tRNA on rakus ohtralt modifitseeritud, ei ole modifikatsioonid aminoatsüleerimisel hädavajalikud ning AARS tunneb ära ka *in vitro* transkribeeritud tRNA`sid (Liu ja Horowitz 1994; Liu et al 1997; Lillemäe, 2000; Aid, 2003). Katsed on näidanud, et tRNA viimase nukleotiidi asendamine muudab tRNAVal seondumisafiinsust ValRS`le (Liu ja Horowitz 1994). Eriti järsult langeb A76G asendusega tRNA seondumine ensüümile. Vaatamata sellele lülitab ensüüm aminohappe ka terminaalsete asendustega tRNA`dele (Liu ja Horowitz 1994). Sellest järeldati, et ValRS katalüüsitsentris võiksid tekkida vesiniksidemed, mis A76G puhul võimalikud pole (Liu ja Horowitz 1994). Nagu hiljem on näidatud on aminoatsüleerimisel oluline tRNA terminaalsete A76 N1 positsiooni protoneeritus (Tardif et al 2001). Aminohappejäägi hüdrolüüsumise järgi on näidatud, et estersideme reaktiivsust ei mõjuta tRNA 3`-ots vaid seotud aminohappe jäägi protoneeritus (Chladek ja Sprinzl 1985). Positiivselt laetud Val-tRNA hüdrolüüsib 90x kiiremini kui sama aa-tRNA neutraalne jääk. Aminohappe N-atsüleerimine suurendab aa-tRNA stabiilsust (Chladek ja Sprinzl 1985).

Kõigil AARS`idel on olemas aktiivsaad adenülaadi sünteesimiseks ja aminoatsüleerimiseks. Süntetaasi poolt õige substraadi äratundmine on valgusünteesi seisukohalt väga oluline. Enamus süntetaase on väga spetsiifilised aminohappe selektsioonil. IleRS ja ValRS võivad aga seondada ja aktiveerida ka kognaatsele aminohappele struktuurilt sarnase aminohappe. Tekkinud mittekognaatne aminohappeadenülaad kas hüdrolüüsitakse või aminoatsüleerimise reaktsiooni järgselt deatsüleeritakse vale aminohappega aminoatsüleeritud tRNA.

Fersht jt. oletasid juba 20 aastat tagasi, et AARS on ka RNA-sõltuv ensümaatiline proofreading aktiivsus või editeerimise mehhanism (ülevaade Fukai et al 2000). IleRS näitel pakkusid nad välja "kaksiksõela" mudeli, kus treoniin kui isoleutsiinist suurem aminohape välistatakse aminoatsüleerimisel ja väiksem - valiin - hilisema aminoatsüül-tRNA editeerimise käigus. Hiljem on leitud, et klass I ensüümidel editeerimise sait, mille moodustab lisa peptiidjärjestusest (nn. *connective polypeptide*)(Arnes ja Moras 1997). Editeerimise saidil on täheldatud aminohappe-

adenülaadi hüdrolüüsimise ja aa-tRNA hüdrolüüsimise võime ja paikneb aminoatsüleerimise saidist 35Å kaugusel (*Fukai et al 2000; Tardif et al 2003*).

1.3. Ribosoomi struktuur

Ribosoomis toimub geneetilise info transleerimine RNA järjestuselt valgu aminohappeliseks järjestuseks. Ribosoomide struktuur ja funktsioon on evolutsiooniliselt väga konserveerunud. Bakterite ribosoomid, molekulmassiga 2,5 MD, on väikesed ja seetõttu hästi uuritud. 70S ribosoom moodustub 30S ja 50S subühikute assotsieerumisel molekulidevaheliste sildade kaudu (*Yussupov 2001*). Mõlema subühiku massist moodustab RNA ligikaudu 2/3. *E.coli* väike subühik koosneb 16S rRNAst (1542 nt) ja 21 valgust ning suur subühik 23S rRNAst (2904 nt), 5S rRNAst (120 nt) ja 34 erinevast valgust.

30S subühiku 16S rRNA sekundaarstruktuuri moodustavad 36 heeliksit, mis omavahel integreerudes moodustavad 4 kompakset domääni (*Wimberly et al 2000*). Valgud aitavad stabiliseerida rRNA tertsiaarset struktuuri seondudes mitme heeliksiga (*Yussupov et al 2001*).

50S subühiku 23S rRNA tertsiaarne struktuur koosneb rohkem kui 130 heeliksist. 23S ja 5S rRNA moodustavad 7 sekundaarstruktuuri domääni. Erinevalt 30S subühikust, on 50S subühiku tertsiaarstruktuuri domäänid üksteisega läbipõimunud (*Ban et al 2000; Yussupov et al 2001*), moodustades ühe suure hemisfäärilise domääni - 50S subühiku keha.

Kahe subühikuvahelisse alasse seonduvad tRNA'd (*Yussupov et al 2001*). tRNA antikoodon ots aluspaardub 30S subühikus mRNAga. Ribosoomi 30S subühikuga seostud eelkõige geneetilise informatsiooni dekodeerimine so tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise sobivuse detekteerimine. tRNA 3'-CCA ots koos aminohappe- või kasvava peptiidiga seondub 50 S subühikus peptidüültransferaasi tsesstrisse (*Yussupov et al 2001*). 50S subühikutel on peale peptidüültransferaasiaktiivsuse ka faktoride sidumise võime.

Vaatamata ribosoomi rohkele valgusisaldusele ei sisalda ribosoomi funktsionaalselt tähtsad piirkonnad nagu näiteks subühikute kokkupuute alad, peptidüültransferaasne keskus ning ribosoomi A- ja P-saidis olevate tRNAde antikoodonite ja mRNA koodoni vaheliste kontaktide piirkonnad peaaegu üldse valke (*Clemons et al 1999; Yussupov et al 2001*). Ribosoomi väikese subühikus asub vaid

valk S12 RNA-rikkas osas, millel on kokkupuude 50S subühikuga. Lisaks asuvad valgud S7 ja S15 30S subühiku piirkonnas, mis on osaleb tRNA ja subühikute vahelistes kontaktides (*Schluzen et al 2000*).

1.4. Translatsiooni initsiatsioon ja terminatsioon

Translatsiooni initsiatsiooniks on vajalik mRNA Shine-Dalgarno järjestuse komplementaarne seostumine ribosoomi 30S subühiku 16S rRNA 3' järjestusega ning initsiatsioonifaktoreid IF1, IF2 ja IF3. Initsiatsiooni faktor IF3 on anti-assotsiatsioonifaktor, mis seostub 30S subühikuga 50S subühiku seondumise kohale selleks, et blokeerida 70S assotsiatsioon (*Kisselev ja Buckingham 2000*). IF3 soodustab fMet-tRNA seostumist initsiatsioonil kui ka terminatsioonijärgset deatsüleeritud tRNA dissotsiatsiooni 30S subühikult (*Kisselev ja Buckingham 2000*). IF1 seondumisel 30 subühiku A-saiti, IF2-GTP-fMet-tRNA ja mRNA seondumisel fikseerub mRNA startkoodon 30S subühiku P-saidis. Peale IF1 ja IF3 dissotsiatsiooni ning moodustub 70S initsiatsiooni kompleks ning GTP hüdroolüüsi järgselt dissotsieerub IF2 (ülevaade *Maiväli 2004*). Järgneb EF-Tu-GTP-aa-tRNA seondumine 70S ribosoomi A-saiti ning peale esimest peptiidsidet, peptiidahela elongatsioon.

Polüpeptiidahel vabaneb ribosoomilt kui ribosoomi A-saiti seondub terminatsioonikoodoniga interakteeruv translatsiooni terminatsioonifaktor RF (*release factor*) (*Kisselev ja Buckingham 2000*). Terminatsioonifaktorid vahendavad mRNA koodoni peptidüültransferaasesse tsentrisse kus vastusena toimub peptidüül-tRNA hüdroolüüs. Sellisel juhul on peptidüültransferaases tsentris kasvava peptiidi aktseptoriks H₂O ning peptidüül-tRNA hüdroolüüsitakse. Rakkudes ei ole stoppkoodoni jaoks kindlat tRNAd, kui välja arvata stopp-koodonit läbilugevaid supressor-, selenotsüsteiini- ja pürrolüsiini-tRNA`sid. Eubakterites on translatsiooni lõpetamiseks 2 terminatsioonifaktorit ja mõlevad peavad ära tundma vähemalt 2 stoppkoodonit - RF1 tunneb ära UAA ja UAG ning RF2 UAA ja UGA (*Kisselev ja Buckingham 2000*).

Vaatamata sellele, et eukarüootsete, prokarüootsete ja mitokondri terminatsioonifaktorite järjestused on erinevad, on neis kõigis ülikonserveerunud GGQ (Gly-Gly-Gln)-motiiv (*Kisselev ja Buckingham 2000*). Arvestades, et RF1 kui RF2 tunnevad ära mitmeid stoppkoodoneid, pole GGQ-motiiv seotud stoppkoodoni

äratundmisega vaid tõenäoliselt on peptidüül-tRNA`ga seondumise motiiv ning vahendab peptidüül-tRNA hüdrolüüsiks. Leitud on ka RF1 kõrgelt konserveerunud PAT-järjestus ja RF2 SPF-järjestused, mis võiksid määrata stopp-koodoni spetsiifilisuse (*Kisselev ja Buckingham 2000*). Need terminatsioonifaktorite tripeptiidsed järjestused interakteeruvad arvatavasti stopp-koodoni nukleotiididega. Peale RF1 või RF2 poolt indutseeritud peptiidi hüdrolüüsi seondub ribosoomidega RF3 inaktiivses GDP vormis (ülevaade *Maiväli 2004*). Aktiivne RF3·GTP moodustub vaid siis kui ribosoomi A-saidis on RF1 või RF2 ja P-saidis deatsüleeritud tRNA. RRF (*ribosome release factor*) ja EF-G seonumisel katalüüsitakse 70S ribosoomi dissotsiatsiooni (ülevaade *Maiväli 2004*). Kuidas RRF 70S dissotsiatsiooni katalüüsib pole selge. 30S jääb seotuks mRNA ja tRNA`ga, ning nagu eelpool öeldud, viimase dissotsiatsiooni soodustab IF3 seondumine 30S subühikuga.

1.5. Translatsiooni elongatsioon

1.5.1. Kolmikkompleksi seondumine

Rakus on üle 50 aa-tRNA, mis on enamasti seotud kolmikkompleksi EF-Tu- ja GTP`ga. Kolmikkompleks on vahevormiks aa-tRNA seondumisel ribosoomile. Kristallstruktuurid kolmikkompleksid EF-Tu·GDPNP ja Phe-tRNA^{Phe} või Cys-tRNA^{Cys} ga näitasid, et EF-Tu kõik kolm domääni interakteeruvad aa-tRNA`ga, kuigi valgu ja tRNA vahel ei ole palju kontakte (*Nissen et al 2000*). Eelpool nimetatud kolmikkompleksi kristallstruktuuri järgi seondub EF-Tu tRNA T-heeliksiga, aktseptorheeliksi 1. ja 2. (võib-olla ka 3.) positsiooni lämmastikaluste suhkur-fosfaatselgrooga ning üheahelalise 3'-CCA otsaga. Aminohape paigutub EF-Tu I ja II domääni vahelisse vaku (*Nissen et al 2000*). Kolmikkompleksi moodustumist mõjutab tRNA üheahelalise 3'-CCA otsa pikkus (*Chladek ja Sprinzl 1985*). Seondumisafiinsus väheneb nii üheahelalise järjestuse lühenedes kui pikenedes. Kolmikkompleksi seondumisafiinsust vähendavad ka tRNA terminaalse A76 ribosijäägi modifikatsioonid (*Chladek ja Sprinzl 1985*).

Kuigi EF-Tu peab ära tundma väga erinevaid aa-tRNA`sid, on erinevate aa-tRNA`de seondumisafiinsus kolmikkompleksi sarnane. Hiljuti näidati, et aa-tRNA ühetaoline seondumine saavutatakse kompensatsiooni põhimõttel (*LaRiviere et al 2001; Dale et al 2004*). EF-Tu seob tugevamalt tRNA`sid, mille kognaatsed aminohapped on väikseid ja nõrga seondumisafiinsusega ning vastupidi. Läbi aa-

tRNA ühetaolise seondumisstrateegia on võimalik vähendada võimalikke aminoatsüleerimise vigu. Väiksema aminohappega misatsüleerimisel suureneb aa-tRNA dissotsieerumine EF-Tu`lt ning kognaatsest aminohapest suuremaga misatsüleeritud aa-tRNA seondub kolmikkompleksi liialt tugevalt (*LaRiviere et al 2001*).

EF-Tu seondub nii L-aa-tRNA 2'- kui 3'-isomeeriga. Kuna 2'- aminoatsüülderivaatide seondumine ribosoomi A-saiti ei ole produktiivne toimub enne peptidüültransferaasi reaktsiooni transatsüleerimine. Transatsüleerimise protsessi ei mõjuta tRNA 3'-CCA ega muud tRNA struktuurielemendid (*Chladek ja Sprinzl 1985*).

mRNA järjestuse transleerimisel valgu aminohappeliseks järjestuseks selekteerib ribosoom koodon-antikoodon sobivuse järgi välja õige aa-tRNA ·EF-Tu·GTP kolmikkompleksi. Kolmikkompleksi seondumine ribosoomile on mitmeosaline. Algselt toimub kiire ja labiilne kolmikkompleksi koodonsõltumatu seondumine (*Pape et al 1998*). Tõenäoliselt toimub seondumine tänu elektrostaatilisele jõule ribosoomi A-saiti tihedamini kui ükskõik kuhu teise ribosoomisaiti. Kolmikkompleksi esialgses seondumises ribosoomi A-saiti on tähtsad interaktsioonid EF-Tu ja ribosoomi vahel, sest vaba aa-tRNA seondumine ribosoomi A-saiti oluliselt aeglasem (*Rodnina ja Wintermeyer 2001ab*). Võimalik, et kolmikkompleksi esialgsel seandumisel osaleb valgu L7/L12 C-terminaalse järjestus (*Valle et al 2003*).

Kolmikkompleksi seandumisele järgneb koodoni äratundmine või koodonile mittevastava aa-tRNA dissotsiatsioon (*Rodnina ja Wintermeyer 2001ab*). Nii kognaatne kui lähikognaatne aa-tRNA (cognate ja near-cognate aa-tRNA, erinevus ühes aluses antikoodonis) seandumise ja koodoni äratundmise kiirus on sarnane. Kognaatse aa-tRNA dissotsioon ribosoomilt on aga vähemalt 100 korda aeglasem ning sõltuv Mg^{2+} - ionide kontsentratsioonist ja temperatuurist (*Pape et al 1999, Gromadski ja Rodnina 2004*). Kognaatse aa-tRNA seandumist stabiliseerib korraliku koodon-antikoodon dupleksi moodustumisel indutseeritud 16S rRNA dekodeeriva tsentri konformatsiooniline muutus.

Ribosoomi 30S subühiku kristallstruktuuri põhjal välja pakutud mudeli järgi põhjustab aa-tRNA seondumine dekodeerivas tsentris 16S rRNA G530 konformatsiooni muutuse (syn→anti) ning seandumise antikoodoni 2. ning koodoni 3. positsioonis olevate alustega (*Schluenzen et al 2000; Ogle et al 2001*). G530

konformatsioonimuutus põhjustab omakorda 16S rRNA heeliksi 44 A1492 ja A1493 seondumise vastavalt koodon-antikoodon heeliksi esimese ja teise aluspaariga (*Schluzen et al 2000; Ogle et al 2001*). A1492 ja G530 interakteeruvad lisaks 30S subühiku valguga S12, mis stabiliseerib konformatsioonimuutuse (*Ogle et al 2001*). Ribosoomi kristallstruktuuri põhjal on teada, et kolmikkompleksi seondumisel muutub 50S subühiku L7/L12 jätke konformatsioon (*Valle et al 2003*). L7/L12 jätke koosneb kahest sagarast - millest üks osa, valguga L6 seotud sartsiin-ritsiin ling (SRL e heeliks 96) interakteerub EF-Tu I domääniga GTP seondumiskoha lähedal (*Stark et al 2002; Valle et al 2003*). L7/L12 jätke teine osa moodustub valgust L11 ja 23S rRNA heeliks 43 ja 44 fragmentidest ning on seotud EF-Tu GTPaasse aktiivsusega (*Valle et al 2003*)

Koodon-antikoodon äratundmisest indutseeritud konformatsiooniline muutus on signaaliks EF-Tu G-domäänile ja vallandab GTP hüdrolyüsi. Struktuurimuutustest põhjustatud katalüütsentri aktiveerimist nimetatakse induced fit. Arvatavalt aitab ribosoomi SRL orienteerida EF-Tu G-domääni selliselt, et GTP hüdrolyüs võimalikuks saab. GTP hüdrolyüs on sõltuv temperatuurist ja Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonist ning lähiskognaatse aa-tRNA`ga kolmikkompleksi seondumisel hüdrolyüsib GTP vähemalt 10 korda aeglasemalt. (*Pape et al 1999; Gromadski ja Rodnina 2004*). Vale aa-tRNA seondumisel GTP hüdrolyüsi peaaegu ei toimu. Pärast GTP hüdrolyüsi muutub EF-Tu konformatsioon. EF-Tu·GDP afiinsus aa-tRNA suhtes väheneb väheneb ning EF-Tu·GDP dissotsieerub.

Pärast EF-Tu dissotsiatsiooni järel liigub aa-tRNA 3'-ots 50S subühiku peptidüültransferaasitsentrisse (PTC) ning aa-tRNA seostub A-saiti (akommodatsioon). Moodustuvad spetsiifilised interaktsioonid tRNA ning ribosoomi 23S rRNA A-lingu aluste vahel (allpool).

Ribosoom selekteerib esialgsel seondumisel edukalt välja valed aa-tRNAd, kuid lähiskognaatse aa-tRNA seondumisel tekkiv ebastabiilne koodon-antikoodon dupleks ning seetõttu vähenenud GTP hüdrolyüs ei ole piisav vigade ärahoidmiseks selektsioonil. Enamus lähiskognaatseid aa-tRNAsid välistatakse GTP hüdrolyüsile järgneva kineetilise proofreadingu käigus, kuna ebastabiilse seotuse tõttu ribosoomiga toimub lähiskognaatse aa-tRNA dissotsiatsioon kiiremini kui akomodatsioon ja peptidüültransferaasi reaktsioon (*Thompson ja Stone 1977; Ruusala et al 1982*). Võrreldes algse selektsiooniga ei ole GTP hüdrolyüsile järgnev kineetiline proofreading mõjutatud puhvri koostisest (*Pape et al 1999*).

1.5.2. Peptidüültransferaas

Piirkonda ribosoomi suures subühikus, kus katalüüsitakse peptiidsidet nimetatakse peptidüültransferaasseks tsentriks (PTC). Peptidüültransferaasne tsepter kujutab endast kahe substraadiga ensüümi. Üheks substraadiks e doonoriks on peptidüül-tRNA karbonüülgrupi süsinik ning teiseks substraadiks e aktseptoriks aminoatsüül-tRNA α -aminogrupp. Nukleofiilne α -aminogrupp atakeerib karbonüügrupi süsinikku. Peptiid- e amiidsideme moodustamiseks vajalik energia saadakse aminoatsüül-tRNA estersideme lõhkumisest. Kasvava peptiidi aktseptoriks võib peale aminogrupi (-NH₂) olla ka H₂O. Hüdroolüüs toimub polüpeptiidi sünteesi lõppedes. Ribosoomid on võimelised sünteesima peale amiidsideme (CO-NH) ka ester- (CO-O), tioester- (CO-S) kui ka tioamiidsidet (CS-NH) (*Krayevsky ja Kukhanova 1979*).

Haloarcula marismortui 50S subühiku kristallstruktuuri uurimine on näidanud, et peptiidsideme sünteesikohas puuduvad valgud ning lähim on 23S rRNA A2451 kolmandas positsioonis olev lämmastik (N3) (*Nissen et al 2000*). On pakutud välja võimalus, et ribosoomi V domääni keskse lünga (PTC) konserveerunud A2451 võib hõlbustada A-saidi substraadi α -aminogrupi nukleofiilset atakki (*Muth et al 2000*). A2451 võiks siduda ribosoomi A-saiti seondunud aa-tRNA α -aminogrupilt prootoni, kergendades sellega aminogrupi nukleofiilset atakki peptidüül-tRNA karbonüülgrupi süsinikule ning andes prootoni omakorda P-saiti seondunud tRNA`le. Üheltpoolt kinnitavad hüpoteesi katsed, kus on demonstreeritud A2451 positsiooni viidud mutatsioonide letaalsust *in vivo* (*Thompson et al 2001*), teiselt poolt kummutavad aga A2451 positsiooni tähtsust mutantide tähelepanuväärne aktiivsus peptidüültransferaasi reaktsioonis (*Polacek et al 2003*). Peptidüültransferaasi reaktsiooni inhibeerivad ka ribosoomi P-saidis oleva tRNA 2' positsiooni deoksüleerimine (*Dorner et al 2002*; *Weinger et al 2004*). Võimalik, et peptidüül-tRNA 2'-hüdroksüüli hapnik osaleb prootoni ülekandes aa-tRNA aminogrupilt P-saidis oleva tRNA 3' hapnikule (*Dorner et al 2002*). Üldjuhul arvatakse, et keemiline katalüüs mängib ribosoomi peptidüültransferaasis väikest osa, kuna reaktsioon ise on energeetiliselt ribosoomile piisavalt kasulik.

Sünteesitav polüpeptiid liigub läbi tunneli. Ribosoomi tunneli moodustavad ribosoomi 23S rRNA domäänid I-V ning valgud L4 ja L22. Tunneli laius on

keskmiselt 15 Å ning pikkus ligikaudu 100 Å. Tunnelis kaitstakse kasvavat polüpeptiidi proteolüütilise lõikamise eest (*Yussupov et al 2000*).

1.5.3. Translokatsioon

Translokatsiooni käigus liiguvad ribosoomi A- ja P-saidi olevad tRNA'd koos mRNAga uutesse seondumissaitidesse ning toimub 30S subühiku liikumine 50S subühiku suhtes kusjuures tRNA'de liikumine toimub kahes osas. Mitmed eksperimendid on näidanud, et tRNA aktseptor- ja antikoodon-otsad liiguvad ribosoomis sõltumatult (*Moazed ja Noller 1989ab*). Hübridsaitide mudeli järgi liiguvad peale peptidüültransferaasi reaktsiooni tRNA'de 3'-otsad 50S subühiku suhtes ning peale EF-G sõltuvat translokatsiooni tRNA'de antikoodon-otsad koos mRNA'ga ribosoomi 30S subühiku suhtes. Seega paikneb peptidüül-tRNA 3'-ots paikneb alati ribosoomi P-saidis ja deatsüleeritud tRNA E-saidis (*Moazed ja Noller 1989ab*). Peptidüültransferaasi reaktsiooni järgselt liiguvad A- ja P-saidis olevate tRNA'de 3'-otsad vastavalt P- ja E-saitidesse, moodustuvad hübridsaidid (P/E ja A/P). Hübridses A/P-saidis olev peptidüül-tRNA ei ole võimeline reageerima A-saidi substraadi puromütsiiniga (*Sharma et al 2004*). Samas võib hübridne A/P-sait olla ka puromütsiinireaktiivne, eristudes puromütsiiniga mittereageerivast staadiumist (A/P*) (*Moazed ja Noller 1989b*).

Blanchard jt näitasid, et pärast aa-tRNA seondumist ribosoomi A-saiti toimub dünaamiline vahetus klassikalise (A/A) ja hübridsaidi (A/P) vahel. Peptiidsideme moodustumine destabiliseerib klassikalist saiti ning peptidüül-tRNA peatub A/P-hübridsaidis 3,5 korda rohkem aega kui aa-tRNA (*Blanchard et al 2004*). tRNA fluktueerumine kahe saidi vahel on RNA-RNA interaktsioonide tõttu sõltuv Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonist (*Blanchard et al 2004*).

Pretranslokatsioonilisele ribosoomile seondub EF-G(GTP). On näidatud, et EF-G seondumiseks on oluline hübridsaitidega ribosoom (*Semenkov et al 2000; Sharma et al 2004*). EF-G seondumine on kiire ja pöörduv ning GTP sõltumatu (ülevaade *Rodnina et al 2000*). EF-G GTP seandumisel interakteerub G-domään ribosoomi SRL-piirkonnaga ning translokatsioon algab ribosoomile seondunud EF-G-GTP-kompleksi GTPaasi aktiveerimisega (ülevaade *Rodnina et al 2000*). Hüdroolüüsil vabanev Pi põhjustab EF-G konformatsioonimuutuse, mille tulemusena stabiliseerub EF-G-ribosoom-kompleks ning väheneb EF-G dissotsiatsioon. Tõenäoliselt põhjustab EF-G

konformatsioonimuutus ka translokatsiooniks vajalikke ümberpaiknemisi ribosoomis ja indutseerib ribosoomi minekut translokatsiooni transitsioonistaadiumisse (ülevaade *Rodnina et al 2000*). Transitsioonistaadiumis olevas ribosoomis toimub A-saidi tRNA 3'-ots puromütsiin-reaktiivsesse A/P saiti, ning mõlema tRNA antikoodon-otsad liiguvad koos mRNAga oma posttranslokatsioonilisse positsiooni ja toimub subühikute liikumine teineteise suhtes (ülevaade *Noller et al 2000; Frank ja Agrawal 2000*). Translokatsioonil on oluline ka EF-G IV domään. Pretranslokatsioonilisel ribosoomil, kui EF-G G-domaään on seotud 50S subühiku SRL piirkonnaga, paikneb IV domään 30S subühiku valgu S4 seondumise kohas (*Frank ja Agrawal 2000, Yussupov et al 2001*). Pärast translokatsiooni täidab EF-G IV domään aga 30S subühiku dekodeeriva regiooni. Arvatakse, et EF-G IV domääni liikumine aitab stabiliseerida posttranslokatsioonilist staadiumi sel ajal kui ribosoom on transitsioonistaadiumis, takistades uue aa-tRNA seondumist A-saiti ning peptidüül- ja deatsüleeritud tRNA tagasilikumist (ülevaade *Rodnina et al 2000*). Pärast translokatsiooni dissotsieerub EF-G-GDP ning deatsüleeritud tRNA. Hübridsaitide mudeli järgi toimub EF-G sõltuva translokatsiooni järel kohene deatsüleeritud tRNA dissotsiatsioon ribosoomilt. Deatsüleeritud tRNA seondub E-saiti nõrgalt, ajutiselt ning pole seotud koodon-antikoodon interaktsiooniga (*Moazed ja Noller 1989ab*). Alternatiivne translokatsiooni mudel - α - ϵ domääni mudel - põhineb ribosoomi A- ja E-saidi vastastikusel seotusel ja deatsüleeritud tRNA translokatsioonijärgsel stabiilsel seotusel ribosoomi E-saidis (*Nierhaus et al 2000; Dabrowski et al 1998*). Korraga kahe tRNA sidumist ribosoomile toetavad katsed, mis näitasid A-saidi okupatsiooni ja E-saidist vabanemise kineetika sarnasust ning atsüül-tRNA lisamisest põhjustatud deatsüleeritud tRNA dissotsiatsiooni ribosoomilt (*Gnirke et al 1989*). Samuti kinnitavad püsivat kompleksi E-saidi tRNA ja ribosoomi vahel deatsüleeritud tRNA seotus ribosoomiga ka tsentrifuugimise järel (*Gnirke et al 1989*).

Deatsüleeritud tRNA koodonsõltuvat seondumist toetab ka kristallstruktuuride uurimine. Ribosoomi E-saidis oleva deatsüleeritud tRNA antikoodon-ots asetseb lähestikku P-saidi tRNA antikoodonlinguga (*Agrawal et al 2000; Yussupov et al 2000*) ning võimalik on vähemalt üks aluspaardumine koodon-antikoodon heeliksisis (*Cate et al 1999; Yussupov et al 2001*). Deatsüleeritud tRNA liikumine translokatsioonil ja dissotsieerumine ribosoomilt võib toimuda mitmes etapis. Translokatsiooni järgselt seostub deatsüleeritud tRNA esmalt koodonsõltuvalt ja tugevalt E-saiti ning seejärel koodonsõltumatult ja nõrgalt E2 saiti (*Agrawal et al*

2000). Keemilise modifikatsiooni katsete tulemused kinnitavad deatsüleeritud tRNA seondumist kahte erinevasse 23S rRNA piirkonda: valgu L1(U2112) ja L33(2394) seondumispiirkondadesse (*Boccheta et al 2001*). Erinevaid andmeid E-saidis oleva deatsüleeritud tRNA seotuse kohta on saadud kuna deatsüleeritud tRNA interaktsioon ribosoomiga on ioonitundlik ja sõltub nii Mg^{2+} ioonide kontsentratsioonist kui polüamiinide sisaldusest (*Semenkov et al 2000*).

1.6. tRNA interaktsioonid ribosoomiga

Interaktsioonid rRNA ja tRNA vahel aitavad stabiliseerida tRNA seondumist ribosoomile ning mõjutavad otseselt mitmeid funktsionaalseid protsesse: aa-tRNA selektsiooni täpsust, korrektse lugemisraami säilitamist; peptiidideme katalüüsi ning tRNA`de translokatsiooni. Kõik tRNA seondumissaidid ribosoomis on rRNA- rikkad kohad, seovad oma substraadi universaalselt konserveerunud struktuuriosadega ning enam-vähem sarnaselt (*Yussupov et al 2001*).

Kristallstruktuuride andmed toetavad ka varasemaid keemilise modifitseerimise tulemusi, vaid E- ja P-saidi tRNA lokaliseerimist ribosoomis on mõnevõrra erinev (*Yussupov et al 2001*). Nii A-, P- kui E- saidis olev tRNA paikneb kahe ribosoomi subühiku vahel sarnaselt. tRNA antikoodon-ots seondub RNA rikkasse piirkonda 30S subühikus. Ülejäänud tRNA osa (D-heeliks, L-pöörde ja aktseptorheeliks) seondub aga 50S subühiku katalüütilise tsentri lähedusse (*Yussupov et al 2001*).

A- ja P-saiti seondunud tRNA tasapinnad moodustavad omavahel 26° , E- ja P-saidi tRNAd aga 46° nurga. Tänu mRNA 45 kraadisele murdele dekodeerimistsentris, asetsevad mRNA kõrvuti asetsevaid koodoneid lugevad A- ja P- saidi tRNA antikoodonlingud üksteisest 10Å kaugusel ja aktseptorheeliksid vaid 5Å . P- ja E saiti seondunud tRNAde antikoodonlingude vaheline kaugus on väiksem - 6Å kuid aktseptorheeliksiste vahe suurem - 50Å (*Yussupov et al 2001*). Kristallstruktuuride uurimine on näidanud, et A- ja P-saidi tRNA`de omavaheline kaugus on vähim L-pöörde kohal. Seal on A-saidi tRNA D16 ja P-saidi tRNA U47 üksteisest vaid vesiniksideme kaugusel, kuid pole kindel kas need alused omavahel interakteeruvad (*Yussupov et al 2001*). Translokatsiooni käigus interakteeruvad tRNA`dega L-pöörde kohalt ribosoomi assotsieerumisel tekkinud sillad B1a ja B1b ning liiguvad selle kohaga kõige rohkem $40\text{-}50\text{Å}$ (*Yussupov et al 2001*).

1.6.1. tRNA 3'-CCA interaktsioonid ribosoomis

Ribosoomi P-sait on kristallstruktuuris tugeva elektrontihedusega, mis tähendab peptidüül-tRNA translatsiooni lugemisraami säilitamiseks vajalikku kindlat ja tugevat interaktsiooni ribosoomiga (*Cate et al 1999*). Ribosoomi A-saiti tRNA elektrontihedus on oluliselt nõrgem arvatavalt A-saidis toimuva diskrimineerimise tõttu (*Cate et al 1999*). Kristallstruktuuri analüüsi andmed kinnitavad Watson-Crick paardumist nii A-saidi tRNA C75 ja 23S rRNA A-lingus paikneva G2553 ning P-saiti seondunud tRNA C74 ja 23S rRNA P-lingu G2252 vahel (*Samaha et al 1995; Kim ja Green 1999; Yussupov et al 2001*).

Üldise arvamuse kohaselt asetub tRNA 3'-CCA ribosoomi A-saiti alles pärast EF-Tu dissotsiatsiooni (*Stark et al 2002; Valle et al 2003*). Samas on näidatud, et Phe-tRNA kolmikkompleksis interakteerub ka peptidüültransferaasi alustega U2506 ja U2585 (*Wower et al 2000*).

Haloarcula marismortui ja *Deinococcus radiodurans* 50S subühiku kristallid tRNA aktseptorheeliksi analoogiga näitasid, et tRNA seandumisel toimuvate konformatsiooniliste muutuste tõttu liigub 23S rRNA peptidüültransferaasse keskuse alus A2602 ribosoomi A- ja P-saidis olevate tRNA`de CCA-otste vahele ning U2585 võib moodustab vesiniksideme A-saidi tRNA A76 riboosi 2'-OH`ga (*Nissen et al 2000; Bashan et al 2003*). A-saidi substraadi A76 fikseerimist toetavad ka U2584, G2583 ning vähemal määral A2451, G2482 (*Nissen et al 2000*).

Thermus thermophiluse 70S kristallstruktuuri analüüs järgi interakteerub A-saiti seondunud tRNA C75 juba mainitud 23S rRNA alusega G2553 ning 3'-CCA selgroog 23S rRNA heeliksiga 89 (*Yussupov et al 2001*). 70S ribosoomi P-saiti seotud deatsüleeritud tRNA^{fmet} aktseptorheeliksi 3'-CCA interakteerub peptidüültransferaasse tsentri alustega A2602 ja U2585 (*Yussupov et al 2001*) lisaks tRNA C74 ja 23S rRNA P-lingu G2252 vahelisele interaktsioonile. Neid interaktsioone on näidatud ka 23S rRNA keemilisel modifitseerimisel saadud andmetega (*Samaha et al 1995; Boccheta et al 1998; Wower et al 2001*) Ribosoomi P-saidis tRNA 3'-terminaalne A76 tõenäoliselt ei ole seotud (*Cate et al 1999*).

Haloarcula marismortui 50S subühiku kristallid P-saiti on seotud peptidüültransferaasi transitsioonistaadiumi mudeliga - CCdA-p-puro - tRNA alused C74 kui C75 interakteeruvad *Watson-Crick* aluspaaridena 23S rRNA P-lingu G2252 ja

G2251 (*Nissen et al 2000*) ja dA76 ei seostu kuid võib stäkkuda A2451 riboosiga või moodustada vesiniksideme A2450 2'-hüdroksüüluga (*Nissen et al 2000*).

Nagu eelnevast näha on erinevusi substraatide seondumisel 70S või 50S ribosoomidega. Peptidüültransferaasi tsentri alused A2602 ja U2585 võivad assisteerida petidüültransferaasi reaktsiooni käigus toimuvat tRNA`de CCA otste spiraalset liikumist (*Bashan et al 2003; Agmon et al 2004*). Kusjuures võimalik, et A2602 on seotud A-saidi substraadi CCA-otsa ümberpaigutamisega ja U2585 kasvava peptiidi suunamisega peptiidi tunnelisse (*Bashan et al 2003; Agmon et al 2004*).

Ribosoomi E-saidis olev deatsüleeritud tRNA on kristallstruktuuril antikoodonlingu poolt elektrontihedam, mille järgi võib oletada stabiilset seondumist (*Cate et al 1999*). Deatsüleeritud tRNA seondumist ribosoomi E-saiti mõjutab mRNA (*Wower et al 2000*). Koos mRNA`ga seondumist deatsüleeritud tRNA valgu L33 seondumispiirkonda (C2394), ilma mRNA`ta nii valgu L1 (2112) kui L33 seondumispiirkonda (*Wower et al 2000; Boccheta et al 2001*). 70 S kristallstruktuuri analüüsist on teada, et E-saidi tRNA 3'-CCA ots asub eemal peptidüültransferaasest tsentrist, paikneb sügavas taskus ning on kontaktis 23S rRNA alusega C2394, heeliksiga 11, 74 ja 75 ning valguga L33. (*Yussupov, 2001; Schmeing et al 2003*). E-saiti seondumine on tRNA 3'-CCA sõltuv ja väga võimalik, et interaktsioon toimub tRNA A76 ja 23S rRNA C2394 vahel. On näidatud, et tRNA C75A76 ja A76 deleteerimisel kaob 23S rRNA C2394 *footprindi* jälg (*Moazed ja Noller 1989; Boccheta et al 2001*). 23S rRNA valgu L1 seondumispiirkonnas alused G2112, G2116 võivad stäkkuda tRNA aktseptorheeliksi 71. aluse riboosiga. See interaktsioon võib olla oluline EF-G sõltuval translatsioonil. (*Feinberg ja Joseph 2001*). Samuti on võimalik interaktsioon 23S rRNA A1853 tRNA 2-71 aluspaari vahel (*Yussupov et al 2001*). tRNA CCA-otsa modifitseerimine nõrgestab tRNA interaktsiooni E saidiga ja A76 ning vähemal määral C75 on vajalikud tRNA E-saidi afiinsuseks (*Lill et al 1989*). .

2. MATERJAL JA MEETODID

2.1 tRNA ja mRNA *in vitro* transkriptsiooniks vajalikud konstruktid

Katsetes kasutatud *E.coli* tüvest MRE 600 eraldatud tRNA^{tot} oli pärit firmast Boehringer. Kõik katsetes kasutatud tRNAde geenid olid kloonitud plasmidi pUC19 faagi T7 hilise promootori taha. *E.coli* metsik-tüüpi tRNA^{Val}₁ ja A76G asendusega tRNA^{Val}₁ (edaspidi lühidalt tRNA^{Val} variandid A76 ja G76) geene sisaldavad plasmiidid pFVal119 ja pFVal119/G76 oli konstrueeritud prof. Horowitzi laboris (Iowa State University, USA). Enne transkriptsiooni lineariseeriti DNA vastavalt restriктаasidega *FokI* (A76) või *MspI* (G76). G34-A35-C36 antikoodoni- ja G3:U70 aluspaariga *E. coli* tRNA^{Val}₂, *E. coli* tRNA^{Ala}₂ ja *S. cerevisiae* tRNA^{Phe} geene sisaldavad plasmiidid pCVX, pCAX ja pYFX olid saadud kingituseks Alexey Wolfson'ilt (University of Colorado at Boulder, USA). Enne transkriptsiooni lineariseeriti DNA restriктаasiga *MvaI* (*Bst*NI). DNA lõikamine vastavate restriктаasidega kindlustas tRNA transkriptidele korrektse 3'-CCA (*MvaI*, *FokI*) või 3'-CCG (*MspI*) otsa.

Polü(GTA)₄₄ järjestust sisaldav plasmiid oli saadud Tanel Tensonilt (TÜ TI). 5'-TAGTAGTAG ja 5'-TACTACTAC praimeritega amplifitseeritud polü(GTA) järjestus oli kloonitud plasmidi pLITMUS38 *ApaI* ja *EcoRV* saitide vahele. mRNA 5'-GGCCCGUAGA(GUA)₄₄ saamiseks lineariseeriti plasmidi enne transkriptsiooni restriктаasiga *BspT1*.

mRNA polü(GUU)₄₈ saamiseks vajaliku plasmidi konstrueeris Dr. A. Liiv (Eesti Biokeskus). Selleks oli amplifitseeritud polü(CAA)₃₄ ja polü(GTT)₃₆ oligotega polü(CAA) oligonukleotiidne järjestus ja kloonitud plasmidi pLITMUS38 *StuI* saiti. mRNA 5'-GG(GUU)₄₈ saamiseks lisati transkriptsioonisegusse lineariseerimata p(GUU)₄₈.

2.2. tRNA ja mRNA *in vitro* transkriptsioon

tRNAde ja mRNA(GUA)₄₅ transkriptsioon toimus transkriptsioonipuhvris: 40 mM Tris·HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 2 mM spermidiin, 10 mM DTT, millele oli lisatud 2,5 mM ATP, 2,5 mM CTP, 2,5 mM GTP, 2,5 mM UTP, 400 U/ml RNAasi inhibiitorit (RNasiin, Fermentas) ja 80 µg/ml lineariseeritud plasmidi.mRNA(GUU)₄₈

transkriptsiooniks oli transkriptsioonipuhvrise lisatud 2,5 mM CTP, 2,5 mM GTP, 5 mM UTP, 400 U/ml RNAasi inhibiitorit ning 80 µg/ml lineariseerimata plasmidi. Transkriptsioon aktiveeriti T7 RNA polümeraasi lisamisega ja kestis 37° C juures vähemalt 2 tundi. Transkriptsioon peatati NaOAc puhvri (pH 5.5) lisamisega lõppkontsentratsioonini 0,3 M.

Faagi T7 RNA polümeraasi geeni sisaldav plasmid pAR1219 oli saadud Dr. W. Studier'ilt (Brookhaven National Laboratory Upton, NY, USA). T7 polümeraasi ekspressioon indutseeriti 1 mM IPTG lisamisel BL21(DE3)/pAR1219 kultuurile tihedusel OD₆₀₀ 0,5. T7 polümeraas puhastati nagu seda on varem kirjeldanud (*Davanloo et al 1984*).

2.3. tRNA ja mRNA puhastamine

tRNA ja mRNA transkriptsioonisegu puhastati fenooliga ekstraheerides. Selleks lisati transkriptsioonisegule veega tasakaalustatud fenooli (pH 5.5) ruumilises suhtes 1:1. Peale mõneminutilist segamist ja toatemperatuuril lauatsentrifuugiga tsentrifuugimist (13000 rpm, 5 min) lisati uude reaktsioonitubi pandud vesifaasile fenoolijääkidest vabanemiseks kloroformi ruumilises suhtes 1:1. Peale järjekordset lühiajalist segamist ja toatemperatuuril lauatsentrifuugiga tsentrifuugimist (13000 rpm, 2 min) sadestati RNA vesifaasile lisatud kolme mahu -20°C 96° etanooliga (20-30 min, -20 °C). Sade tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (13000 rpm, 30 min, 4°C), pesti 70° etanooliga, tsentrifuugiti veelkord lauatsentrifuugis (13000 rpm, 10 min, 4°C), kuivatati SpeedVac'is ja lahustati deioniseeritud vees.

tRNA transkriptid puhastati DNAs 7 % või 12 % polüakrüülamiidgeel elektroforeesil. tRNA asukoht geelil visualiseeriti luminestseerival TLC-plaadil Silufol[®] lainepikkusel 254 nm. Markeri järgi lõigati geelist tRNAd sisaldav geelitükk. Purustatud geelitükke loksutati üleöö temperatuuril 4°C eluatsioonipuhvrise: 50 mM EDTA ja 0,5 M ammoniumatsetaati (pH 6.0). Pisikestest geelitükkidest vabanemiseks tsentrifuugiti elueerimispuhvrit lauatsentrifuugis hetkeks täispööreteni (13000 rpm, 4°C). tRNA sadestati etanooliga ning sade lahustati deioniseeritud vees.

Fenooliga ekstraheeritud ja 0,3 M NaOAc puhvrise lahustatud mRNA polü(GUA)₄₄ transkriptsioonisegu puhastati nukleotiididest Sephadex-G50 geelfiltratsioonil 0,3 M NaOAc puhvriga (pH 5,5). mRNA sadestati etanooliga, kuivatati SpeedVac'is ning lahustati deioniseeritud vees.

mRNA polü(GUU)₄₈ puhastati transkriptsioonisegust kolonnidel (*Qiagen™ Plasmid Maxi Kit, Qiagen-tip 500*). Kolonn tasakaalustati 30 ml QRT puhvriga (puhvrite koostised on avaldatud *Qiagen® Plasmid Purification Handbook*). Peale transkriptsioonisegu kolonnile kandmist pesti kolonni 20 ml QRT puhvriga. tRNA elueeriti kolonnilt 2 x 5 ml QC puhvriga ja plasmiid elueeriti 2 x 5 ml QF puhvriga. Eluatsioonifraktsioonile lisati 0,7 mahtu isopropanooli RNA ja DNA sadestamiseks ja tsentrifuugiti koheselt (Sorwall SS-34, 15000g, 30 min, 4°C). Sadet pesti kergelt 4°C 70° etanooliga ja tsentrifuugiti uuesti (Sorwall SS-34, 15000g, 10 min, 4°C). Nii DNA kui RNA sade lahustati deioniseeritud vees.

2.4. tRNA aminoatsüleerimine ja aminohappejäägi N-atsüleerimine

tRNA aminoatsüleerimine toimus puhvris: 50 mM Tris·HCl (pH 8), 20 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 5 mM ATP. Puhver sisaldas 0,1 mg/ml *in vitro* transkribeeritud tRNA või 2 mg/ml tRNA^{tot} koos vastava aminohappega. Aminohapped: [¹⁴C]Val (246 mCi/mmol), [³H]Val (24Ci/mmol), [¹⁴C]Ala (162 mCi/mmol), [³H]Ala (52 Ci/mmol), [¹⁴C]Phe (469 mCi/mmol), [³H]Ser (34 Ci/mmol) olid firmast Amersham Biosciences. Segu inkubeeriti 5 minutit. Seejärel lisati aminohappele vastav puhastatud aa-tRNA süntetaas (ValRS, AlaRS või PheRS), *E.coli* lüsaadist eraldatud ensüümifraktsioon S100 või osaliselt puhastatud PheRS ja inkubeeriti 30 minutit. Inkubatsioonid toimusid kas temperatuuril 56°C (ValRS) või 37°C (AlaRS, PheRS, S100). Reaktsioon peatati NaOAc puhvri (pH 5,5) lisamisega lõppkontsentratsioonini 0,3 M. Aminoatsüül-tRNA puhastati fenooliga ekstraheerides ja etanooliga sadestades, kuivatati SpeedVac'is ning lahustati deioniseeritud vees.

tRNA₁^{Val} variantide A76 ja G76 ning tRNA^{tot} aminoatsüleerimiseks valiini või seriiniga sisaldas aminoatsüleerimissegu kas 3,8 µM [³H]Val, 30 µM [¹⁴C]Val või 6 µM [³H]Ser. Aminoatsüleerimine toimus 0,2 mg/ml ValRS (pVRSThermus) või 1/5 osa (v/v) S100 ensüümifraktsiooni juuresolekul. Saadi [¹⁴C]Val-tRNA (spetsiifilise aktiivsusega 500 dpm/pmol), [³H]Val-tRNA (30000 dpm/pmol) või [³H]Ser-tRNA^{tot} (74000 dpm/pmol).

Puhastatud tRNA₂^{Val}(GAC), tRNA₂^{Ala}(GAC), tRNA^{Phe}(GAC) *in vitro* transkriptid renatureeriti enne aminoatsüleerimist. Selleks kuumutati tRNA vesilahust 3 minutit temperatuuril 65°C, seejärel tõsteti Mg²⁺-ioonide lõppkontsentratsioon 15

mM lisades MgCl₂. tRNA vesilahus jahutati 20 minuti jooksul toatemperatuurini ja tõsteti seejärel jääle.

Natiivse tRNA^{tot} ja erinevate eelnevalt renatureeritud *in vitro* transkribeeritud tRNA (GAC) aminoatsüleerimisel valiiniga sisaldas puhver 20 µM [¹⁴C]Val või 0,7 µM [³H]Val/50 µM Val ning 0,2 mg/ml ValRS. Saadi [¹⁴C]Val-tRNA (500 dpm/pmol) või [³H]Val-tRNA (700 dpm/pmol)

Erinevate renatureeritud tRNA(GAC) aminoatsüleerimiselalaniiniga sisaldas puhver 10 U/ml pürofosfataasi, 400 U/ml Rnasiini, 30 µM [¹⁴C]Ala või 1,7 µM [³H]Ala/50 µM Ala ning 0,4 mg/ml AlaRS. Saadi [¹⁴C]Ala-tRNA (250 dpm/pmol) või [³H]Ala-tRNA (2000 dpm/pmol).

Erinevate renatureeritud tRNA(GAC) aminoatsüleerimisel fenüülalaniiniga sisaldas puhver 10 µM [¹⁴C]Phe, 40mM MgCl₂ ja 0,3 mg/ml PheRS või 1/5 osa (v/v) osaliselt puhastatud PheRS. Saadi [¹⁴C]Phe-tRNA (1000 dpm/pmol)

Natiivne [³H]Val-tRNA^{tot} ja *in vitro* transkribeeritud [³H]Val-tRNA₁^{Val} variandid A76 ja G76 puhastati EF-Tu(GTP)·Ni-NTA kolonni abil deatsüleeritud tRNAst ja aminohappest. EF-Tu(GTP)·Ni-NTA kolonni tegemiseks inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 37 °C 2000 pmooli histidiinsabaga *Thermus thermophiluse* EF-Tu(GDP) pesupuhvril: 100 NH₄Cl, 20 mM Tris·HCl (pH 7), 10 mM MgCl₂, 4 mM β-merkaptotoetanool koos 1mM GTP, 1mM PEP, 10 U püruvaatkinaasiga. EF-Tu(GTP)-lahus lisati pesupuhvril tasakaalustatud Ni-NTA geelile ning EF-Tu seondumiseks geelile keerutati tuubi 20 minutit temperatuuril 37 °C. EF-Tu(GTP)·Ni-NTA kolonnile lisati kahe mahu pesupuhvriga lahjendatud [³H]Val-tRNA vesilahus ja suletud kolonni hoiti 20 minutit toatemperatuuril. Kolonni pesti pesupuhvriga, mis sisaldas lisaks 1 mM GTP, 1 mM PEP ja 10 U püruvaatkinaasi. Seondunud [³H]Val-tRNA elueeriti puhvriga: 1M NaCl, 20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 20 µM GDP. Saadud fraktsioonid sadestati ja pesti etanooliga, kuivatati ja lahustati deioniseeritud vees. Aminoatsüül-tRNA aminogrupi atsüleerimine toimus vastavalt varem kirjeldatud meetodile (*Haenni ja Chapeville, 1966*). 50-100 µg/ml [³H]Val-tRNA vesilahusele lisati NaOAc puhvrit (pH 5,5) lõppkontsentratsioonini 3 M. 30 µl lahuse kohta lisati iga 20 minuti järel 1 µl äädikhappeanhüdriidi ja segati koheselt ja korralikult, hoiti jääle. Seejärel lahjendati lahus vähemalt 3 korda deioniseeritud veega. NAc[³H]Val-tRNA sadestati ja pesti etanooliga, sade kuivatati ja lahustati deioniseeritud vees. NAc[³H]Val-tRNA kasutati polü(GUA)₄₅ sõltuval kotranslatsiooni-, dipeptiidi- ja translokatsioonikatsetes.

2.5. Ensüümide ekspressioonikonstruktid ja puhastamine

Kõikidel katsetes kasutatud aa-tRNA süntetaasidel ja translatsiooni elongatsioonifaktoritel oli afiinsuskromatograafiaks vajalik N- või C-terminaalne histidiinsaba. Järgnevalt on loetletud kõiki aastate jooksul kasutatud ekspressioonikonstrukte.

C-terminaalse histidiinsabaga ValRS geeni sisaldav plasmiid pET24A-VTA oli saadud Urmas Saarmalt (TÜ ZHI). Selleks oli *Thermus thermophilus*'e genoomselt DNAlt amplifitseeritud geen *vals* ning kloneeritud pET24A+(kan⁺) (*Novagen*) *NdeI* ja *NotI* saitide vahele. Saadud ensüümi kasutati tRNA₁^{Val} variantide A76 ja G76 ning tRNA^{tot} aminoatsüleerimiseks.

C-terminaalse histidiinsabaga ValRS ekspressioonikonstrukti pQE60/VRSThermus saadi amplifitseerides geeni *vals Thermus thermophiluse* genoomselt DNAlt ja kloneerides ekspressioonivektoris pQE60 (*Qiagen*) saitide *HindIII* ja *NcoI* vahele. Saadud ensüümi kasutati tRNA(GAC) aminoatsüleerimisel. N-terminaalse histidiinist sabaga AlaRS ekspressioonikonstrukti oli saadud Paul Schimmel'ilt (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA). See sisaldas *E.coli* AlaRS 461 aminoahappepikkust N-terminaalset osa kodeerivat *alaS* geenilõiku ja oli kloneeritud pQE70 (*Qiagen*) vektorisse.

N-terminaalse histidiinsabaga PheRS ekspressiooniplasmiidi konstrueeris meie laboris Tamara Aid. Selleks sai amplifitseeritud *E.coli* geenid *pheR* ja *pheS* ja kombineeritud ühte lugemisraami ekspressioonivektori pQE32 (*Qiagen*) *XmaI* ja *HindIII* saitide vahele.

C-terminaalse histidiinsabaga elongatsioonifaktorite G ja Ts ekspressiooniplasmiidid kloneeris Tamara Aid. Ekspressioonikonstrukti pQE60/EF-G saamiseks oli *E.coli* tüve MRE 600 genoomselt DNAlt amplifitseeritud geen *fusA* ja kloneeritud ekspressioonivektori pQE60 saitide *NcoI* ja *BamHI* vahele ning ekspressioonivektori pQE60/EF-Ts saamiseks oli sama *E.coli* tüve geen *tsf* kloneeritud vektori pQE60 *NcoI* ja *BglII* saitide vahele.

N-terminaalse histidiinsabaga EF-Tu ekspressioonikonstrukti pQE32/EF-Tu saamiseks amplifitseeriti *E.coli* MRE 600 tüvest geen *tuf* ja kloneeriti ekspressioonivektori pQE32 saitide *BamHI* ja *HindIII* vahele.

Thermus thermophilus'e EF-Tu(His)₆ valgu ekspressiooniplasmiid oli saadud kingituseks Alexander Mankinilt (University of Illinois, Chicago, USA), pKECA/EF-

Tu(His)₆ oli saadud kingituseks Dr. B. Kraalilt (Leiden University, Holland) ja pRSET/EF-G(His)₆ oli saadud kingituseks Dr. M. Rodninalt (University of Witten/Herdecke, Saksamaa). Plasmide on kirjeldatud varasemalt (*Boon et al. 1992; Rodnina ja Wintermeyer 1995*).

Qiageni ekspressioonivektoreid pQE kasvatati *E. coli* M15 tüves (*Qiagen*), mis sisaldas lisaks repressorplasmidi pREP4 (kan⁺). Kõiki ülejäänuid ekspressioonikonstrukte kasvatati *E. coli* tüves BL21(DE3) (*Novagen*). Rekombinantse valgu ekspressioon plasmiidilt nii M15(pREP4) kui BL21(DE3) tüvedes indutseeriti tihedusel 0,5 OD₆₀₀ 1mM IPTGga. Nelja tunni ekspressiooni järel puhastati valgud afiinsuskromatograafia meetodil Ni-NTA kolonniga, jälgides täpselt protokollit (*Preparation of cleared E. coli lysates under native conditions, QIAExpressionist, Qiagen*). Lõpetuseks dialüüsiiti ensüümid hoidmispuhvrise: 20 mM Tris·HCl (pH7.5), 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotetanool ja 50% glütserool. EF-Tu dialüüsipuhver sisaldas lisaks 20 μM GDP. Ensüüme hoiti -70 C juures.

2.6. S100 ensüümifraktsiooni eraldamine rakulüsaadist

PheRS rikastatud ensüümifraktsiooni saamiseks kasvatati *E. coli* M155/pREP konstrukti tüves ja ekspresseeriti nagu 2.5. alatükis kirjeldatud. S100 ensüümide fraktsiooni eraldamiseks kasutati külmutatud MRE 600 rakke. Rakumass suspendeeriti puhvril LLP (1g rakumassi kohta 3 ml puhvrit): 20 mM Tris HCl (pH 7.6), 22 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-ME, mis sisaldas ka 16% sahharoosi, 1mM PMSF, 20 U/ml DNAas I ja 3 mg/ml lüsotsüümi. Suspendeeritud rakud lüüsiiti gaasilise lämmastikuga (vt. täpsemalt 2.8. alatükis). Rakukestad tsentrifugeeriti põhja (Sorwall SS-34, 16000 rpm, 4°C). Supernatant kanti suhkrupadjale (50 mM Tris·HCl (pH 8), 500 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotetanool, 20 % sahharoos, 1 mM PMSF) ja tsentrifugeeriti (70Ti, 36000 rpm, 12 h, 4°C). Saadud ribosoomideta lüsaat kanti eelnevalt tasakaalustatud ja pestud (20 mM Tris·HCl (pH 8), 22 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotetanool) DEAE kolonnile ning elueeriti (20 mM Tris·HCl (pH 8), 0,3 KCl, 10 MgCl₂, 6 mM β-merkaptotetanool). Koguti visuaalselt eristuvad valgurikkad kollakad fraktsioonid. Temperatuuril 0°C pideval segamisel lisati süntetaaside fraktsioonile (NH₄)₂SO₄ kuni 80% küllastuskontsentratsioonist (561 g/l). Peale 30 minutulist segamist jääl tsentrifugeeriti lahus (SS-34, 6000 rpm, 4°C). Sade lahustati võimalikult väheses hulgas lüüsilahenduspuhvril (LLP) (60 mM KCl,

60 mM NH₄Cl, 10 mM Tris·HCl (pH 8), 12 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotoetanool) ja dialüüsiti vähemalt 3 korda 50 mahu sama puhvri vastu. Ensüümifraktsioonid villiti 100 µl kaupa, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti temperatuuril -70°C. Kõik kasutatud lahused ja rootorid olid jahutatud temperatuurini 4°C ning kõik etapid toimusid temperatuuridel 0°C või 4°C.

2.7. Ribosoomi subühikute eraldamine sahharoosigradiendis

Ribosoomi subühikute saamiseks lüüsi külmutatud *E.coli* tüve MRE 600 rakke alumiinaga hõõrudes 16% sahharoosi ja 20 U/ml DNAas I sisaldavas LLP puhvris (20 mM Tris HCl (pH 7.6), 22 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-ME). Rakkudele oli lisatud 3 mahtu lüüsipuhvrit. Kõik lüüsi etapid toimusid 4°C juures. Rakukestad tsentrifugeeriti põhja (Sorwall SS-34, 17500 rpm, 40 min, 4°C). Supernatant kanti suhkruadjale (20 % sahharoos, 50 mM Tris·HCl (pH 8), 500 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotoetanool) ja tsentrifugeeriti (70Ti, 36000 rpm, 12 h). Põhjafugeeritud ribosoomid suspendeeriti puhvris LLP (10 mM Tris·HCl (pH 8), 60 mM NH₄Cl, 60 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotoetanool) ja dialüüsiti 2 tundi 50 mahu puhvri 20 mM Tris·HCl (pH 7.6), 200 mM NH₄Cl, 1 mM MgCl₂, 6 mM β-merkaptotoetanool vastu. Subühikud kanti 10-30% sahharoosigradiendile (10-30% sahharoos dialüüsipuhvris) ja tsentrifugeeriti (SW-41, $\omega^2t=3,0 \times 10^{11}$, 4°C). Sahharoosigradiendis olev ribosoomide profiil detekteeriti lainepikkusel 260 nm. 50S ja 30S subühikuid sisaldavad fraktsioonid koguti ja ribosoomi subühikud tsentrifugeeriti põhja (Ti-45, 30000 rpm, 20 h, 4°C). Põhjafugeeritud ribosoomi subühikud lahustati LLP puhvris, villiti 50 µl kaupa laiali, külmutati vedelas lämmastikus ning hoiti temperatuuril -70°C. Ribosoomi subühikuid kasutati polü(GUA) sõltuvates translatsiooni- ja dipeptiidikatsetes katsetes.

2.8. Tight-coupled 70S ribosoomide eraldamine tsonaalsel tsentrifugeerimisel.

Tight-coupled 70 S ribosoomid eraldati varasemalt avaldatud protokoll järgi (Rodnina ja Wintermeyer 1995). Selleks sulatati külmutatud *E.coli* tüve MRE 600 rakud lüüsipuhvrise (20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 100 mM NH₄Cl, 10,5 mM Mg(OAc), 0,5 mM EDTA, 3 mM β-merkaptotoetanool). 1g rakkude kohta lisati 3 ml lüüsipuhvrit. Kõik järgnevad etapid toimusid jääl või temperatuuril 4°C. Sulanud rakumassile lisati

3 mg/ml lüsotsüümi ja 10 U/ml DNAas I. Seejärel segati 10 minutit, lisati veelkord 10 U/ml DNAas I ja peale järjekordset 15 minutist segamist lisati Brij 58 lõppkontsentratsioonini 0,5%. Rakke lüüsi 2 korda gaasilise lämmastikuga. Selleks hoiti rakumassi vähemalt 10 minutit gaasilises lämmastikus rõhul 2000 psi selleks, et lämmastik difundeeruks rakku. Rakud lõhuti kiire rõhualandamisega. Rakukestad fuugiti põhja (Sorwall SS-34, 16000 rpm, 40 min, 4°C). Selgitatud lüsaat kanti sahharoosipadjale (1,1 M sahharoos, 20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 500 mM NH₄Cl, 10,5 mM Mg(OAc), 0,5 mM EDTA, 3 mM β-merkaptotetanool) koguses 1 osa lüsaati ja 1 osa sahharoosipatja ning tsentrifugiti (Ti-45, 32000 rpm, 14 h, 4°C). Põhja tsentrifugeeritud ribosoomid võeti üles puhvril: 20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 500 mM NH₄Cl, 10,5 mM Mg(OAc), 0,5 mM EDTA, 7 mM β-merkaptotetanool, kanti uuesti sahharoosipadjale (1:1) ning tsentrifugiti (Ti-45, 31000 rpm, 20 h, 4°C). Seejärel ribosoomide pesti vähesel hulgal puhvril: 20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 60 mM NH₄Cl, 5,25 mM Mg(OAc), 0,25 mM EDTA, 3 mM β-merkaptotetanool ning lahustati samas puhvril. *Tight-coupled* 70S ribosoomid isoleeriti tsonaalse tsentrifugeerimisega 10-40% sahharoosigradiendis (Ti-14, 26000 rpm, 19 h, 4°C). Selleks pumbati Ti-14 rootoris (650 ml) gradiendiks 250ml 10% ja 250 ml 40% sahharoosilahust puhvril 20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 60 mM NH₄Cl, 5,25 mM Mg(OAc), 0,25 mM EDTA, 3 mM β-merkaptotetanool ning padjaks 100 ml 50% sahharoosilahust samas puhvril. Sahharoosigradiendile kanti peale 5% sahharoosisisaldusega ligikaudu 2000 U ribosoomide sisaldav lahust ning 50 ml puhvrit. Tsentrifugeerimise järel koguti gradient 8 ml fraktsioonidena. 70S ribosoomidele vastavad fraktsioonid detekteeriti lainepikkusel 260 nm, koguti ning tsentrifugiti (Sorwall T865, 50000 rpm, 24 h, 4°C). Põhja tsentrifugeeritud 70S ribosoomid suspendeeriti puhvril P12 (20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 160 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 6 mM 2-merkaptotetanool), villiti 50 µl kaupa reaktsioonitubidesse, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti temperatuuril 70°C. *Tight-coupled* 70S ribosoomide kasutati polü(GUU) ja polü(GUA) sõltuvates translatsioonikatsetes

2.9. Polü(GUA)₄₄ sõltuvad *in vitro* eksperimendid

Kõik *in vitro* eksperimendid tehti puhvril P12 (20 mM Tris·HCl (pH 7,5), 12 mM Mg₂Cl₂, 160 mM NH₄Cl, 5 mM β-merkaptotetanool). Nii translatsiooni-, dipeptiidi- kui

translokatsioonikatseteks segati kokku ribosoomisegu, mis sisaldas puhvris P12 70S ribosoomi (või ekvimolaarses koguses 30S ja 50S subühikuid) koos mRNAga polü(GUA)₄₄. Ribosoomisegu inkubeeriti 5 minutit temperatuuril 37°C.

Initsiatsioonikompleksi saamiseks lisati ribosoomisegule kas peptidüül-tRNA analoog NAcVal-tRNA (kotranslatsiooni- ja dipeptiidikatsed) või deatsüleeritud tRNA (translokatsioonikatsed) ja inkubeeriti jätkuvalt 5 minutit temperatuuril 37°C.

Translatsiooni elongatsiooniks või peptiidideme tekkeks inkubeeriti eelnevalt aminoatsüleeritud tRNA koos allpool näidatud elongatsioonifaktoritega ja GTPga 5 minutit temperatuuril 30°C. Reaktsioon alustati kahe preinkubeeritud segude (ribosoomi- ja elongatsioonisegu) segamisel. Valiini või seriini polümerisatsiooni vahendasid mRNA polü(GUA)₄₄ sõltuval translatsioonil tRNA^{tot} või tRNA₁^{Val} variandid A76 ja G76. 1 µg mRNA on võetud võrdseks 25 pmooliga.

2.9.1 polü(GUA)₄₄ sõltuvad translatsioonikatsed

polü(GUA)₄₄ sõltuvaks valiini polümerisatsiooniks sisaldas 15 µl ribosoomisegu 9 pmooli 70S ribosoomi (või subühikuid) ja 25 pmooli mRNA polü(GUA)₄₄. 10 µl-s elongatsioonisegus oli 0-40 pmooli [¹⁴C]Val-tRNA, 10 µg EF-Tu, 2 µg EF-G ja 5 nmooli GTP. Translatsioon initsieeriti kahe segu kokkusegamisel ning kestis 20 minutit 37°C juures. Translatsioonireaktsiooni peatati 1,5 ml 5 % TCAga. Proove kuumutati temperatuuril 95°C 20 minutit. Sade koguti vaakumfiltratsioonil klaasfiiberfiltrile (GF/A). Filtreid pesti vähemalt kaks korda 5% TCA- ja 1 korra 70° etanooliga ning kuivanud filtritele lisati stsintsillaator (OptiPhase "HiSafe" 3, *PerkinElmer/Wallac OY*). Loenduris WinSpectral (*Wallac*) mõõdeti radioaktiivne märges [¹⁴C] ja/või [³H] ning eriaktiivsuse järgi arvutati peptiidahelasse lülitunud aminohappe hulk.

Kotranslatsiooni katseteks sisaldas 15 µl ribosoomisegu 0-8 pmooli 70 S ribosoomi, 25 pmooli mRNA polü(GUA)₄₄ ja 1 pmool NAc[³H]Val-tRNA (või suühikuid sisaldav segu 20 pmooli NAc[³H]Val-tRNA). Elongatsioonisegu sisaldas 10 µl-s 0-40 pmooli [¹⁴C]Val-tRNA, 10 µg EF-Tu, 2 µg EF-G ja 5 nmooli GTP. Kotranslatsioon initsieeriti kahe preinkubeeritud segu segamisel ja kestis 20 minuti temperatuuril 37°C.

2.9.2. polü(GUA)₄₄ sõltuvad dipeptiidikatsed

Dipeptiidikatsete jaoks inkubeeriti 30 µl-s ribosoomisegus 5 pmooli 70 S ribosoomi (või 20 pmooli subühikuid) koos 25 pmooli polü(GUA)₄₄ ja 10 pmooli NAc^[3H]Val-tRNA. Elongatsioonisegu sisaldas 20 µl-s 0-8 pmooli [¹⁴C]Val-tRNA, 10 µg EF-Tu, 5 nmooli GTP, 50 nmooli PEP ja 10 U püruvaatkinaasi. Kahe segu segamisel alustatud dipeptiidireaktsioon kestis 10 minutit temperatuuril 37°C. Reaktsioon peatati NaOH lisamisega (lõppkontsentratsioon 0,6 M) ning peptidüül-tRNA hüdrolyüsiks inkubeeriti 20 minutit temperatuuril 37°C. Lisati dipeptiidi ekstraheerimiseks 200 µl 5N H₂SO₄ ja 1 ml etüülatsetaati. Pideval segamisel ekstraheeruvad NAc^[3H]Val ja dipeptiid NAc^[3H]Val-[¹⁴C]Val etüülatsetaadifaasi. Poolele mahule etüülatsetaadifaasist lisati stsintsillaator (OptiPhase “HiSafe” 3) ning peale segamist mõõdeti radiaktiivsus ja arvutati dipeptiidi hulk ¹⁴C märke järgi etüülatsetaadifaasis.

2.9.3. polü(GUA)₄₄ sõltuvad translokatsioonikatsed

Translokatsioonikatsete jaoks sisaldas ribosoomisegu 20 µl-s 5 pmooli *tight-coupled* 70S ribosoomi, 25 pmooli mRNA polü(GUA)₄₄ ja 20 pmooli deatsüleeritud tRNAd. Elongatsioonisegu, mis sisaldas 15 µl-s 10 pmooli NAc^[3H]Val-tRNA, 0-0,25 µg EF-G ja 50 pmooli GTP preinkubeeriti 20 minutit temperatuuril 37°C. Translokatsioon initseeriti kahe segu lisamisel ja kestis 10 minutit temperatuuril 37°C või 2 tundi temperatuuril 0°C. Seejärel jahutati lahus jääl ja inkubeeriti jääl 30 minutit koos 1 mM puromütsiiniga selleks, et kontrollida translokatsiooni toimumist. Reaktsioon puromütsiiniga lõpetati 10 µl 3M NaOH lisamisega hüdrolyüsiks ja inkubeeriti 15 minutit temperatuuril 37°C. pH neutraliseerimiseks lisati 150 µl K/PO₄⁻ puhvrit (pH 7,6) ja NAcVal-puromütsiini ekstraheerimiseks 1 ml etüülatsetaati. Poolele mahule etüülatsetaadist lisati stsintsillaatorit ja mõõdeti radioaktiivse märke järgi NAc^[3H]Val-puromütsiini hulk etüülatsetaadifaasis.

Katsetes kus uuriti translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti sisaldas ribosoomisegu 20 pmooli deatsüleeritud tRNA varianti A76 ja elongatsioonisegu 10 pmooli NAc^[3H]Val-tRNA varianti A76 või G76.

Translokatsiooni uurimiseks P-saidist E-saiti sisaldas ribosoomisegu 20 pmooli deatsüleeritud tRNA varianti A76 või G76 ning elongatsioonisegu 10 pmooli NAc[³H]Val-A76.

Selleks, et uurida translokatsiooni sõltuvust Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist korrati katset ka 15 mM ja 20 mM MgCl₂ kontsentratsiooniga puhvrites.

2.9.4. Val-tRNA, NAcVal-tRNA ja deatsüleeritud tRNA seondumine ribosoomidele

Mõõdeti [¹⁴C]Val-tRNA, NAc[³H]Val-tRNA ja ³²P-märkega deatsüleeritud tRNA seondumist ribosoomi A-, P- ja/või E-saiti. Selleks tõmmati vastavad ribosoomikompleksid vaakumfiltratsiooni abil nitrotselluloosfiltrile. Filtreid oli eelnevalt hoitud vähemalt 1 tund külmas P12 puhvris. Ribosoomikompleksidega filtreid pesti vähemalt 2 korda P12, kuivatati ja lisati stsintsillatorit. Kuna nitrotselluloosfiltrile seonduvad ribosoomid, siis ³H, ¹⁴C või ³²P märke järgi arvatati ribosoomiga seondunud Val-tRNA, NAcVal-tRNA ja deatsüleeritud tRNA.

2.10. polü(GUU)₄₈ sõltuvad *in vitro* eksperimendid

Kõik polü(GUU)₄₈ sõltuvad *in vitro* translatsioonikatsed on tehtud puhvris P10 (20 mM Tris·HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 160 NH₄Cl, 5 mM β-merkaptioetanool). Translatsiooniks seoti *tight-couple* 70S ribosoomid mRNAga polü(GUU)₄₈ ning aminohappe polümerisatsiooni vahendasid natiivne tRNA^{tot} või *in vitro* transkribeeritud GAC-antikoodoni ja G3:U70 aluspaariga multifunktsionaalsed tRNA₂^{Val}, tRNA₂^{Ala} või/ja tRNA^{Phe}. 1 μg mRNA on võetud võrdseks 25 pmooliga.

2.10.1 polü(GUU)₄₈ sõltuvad translatsioonikatsed

Polü(GUU) sõltuvateks translatsioonikatseteks sisaldas 15 μl ribosoomisegu 0-8 pmooli 70 S ribosoomi ning 7,5 pmooli mRNA polü(GUU)₄₈ ja inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 37°C. 20 μl elongatsioonisegu sisaldas 3,5 mM GTP, 25 pmooli-60 pmooli ³H või ¹⁴C märkega aminoatsüül-tRNA, 0,17 mg/ml EF-G, 0,12 mg/ml EF-Tu ja 6 μg/ml EF-Ts ja inkubeeriti 5 minutit temperatuuril 30°C. Translatsioonireaktsiooni alustati segude segamisel ja inkubeeriti 20 minutit temperatuuril 37 °C. Translatsioon peatamiseks lisati 1,5 ml 5% TCAs ja proove

kuumutati 20 minutit temperatuuril 95°. Sadenenud peptiide analüüsiti nagu seda on kirjeldatud alatükis 2.9.1.

Kotranslatsioonikatsetes sisaldas ribosoomisegu 0-2 pmooli 70 S ribosome ja 7,5 pmooli mRNA polü(GUU)₄₈ ja elongatsioonisegu 30 pmooli [³H]AA-tRNA ja 30 pmooli [¹⁴C]AA-tRNA.

Kotranslatsiooni kontrollkatsetes sisaldas ribosoomisegu 2 pmooli 70 S ribosome ja 7,5 pmooli mRNA polü(GUU)₄₈ ning elongatsioonisegu 30 pmooli [³H]Val-tRNA^{Ala} ja 30 pmooli [¹⁴C]Ala-tRNA^{Ala} (või 30 pmooli [³H]Val-tRNA^{Ala} ja 30 pmooli [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala}). Kotranslatsiooni sõltuvust Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist uuriti 9-16 mM MgCl₂ sisaldusega puhvrites. Kotranslatsiooni sõltuvust EF-Tu kontsentratsioonist uuriti 0-0,26 µg EF-Tu kontsentratsiooni juures. Kotranslatsiooni sõltuvuse uurimiseks ajast peatati reaktsioon erinevates ajapunktides võrdsele osale reaktsioonisegule 5% TCA lisamisega.

2.10.2. GTPaasireaktsioonid

GTP hüdrolüüsitase uurimiseks kasutati varem avaldatud protokolle
GTPaasireaktsioonideks segati kokku kolm segu:

A. 15 µl segu sisaldas P10 puhvris 20 pmooli [¹⁴C]Val-tRNA^{Ala} (või [³H]Phe tRNA^{Ala}), 45 µg/ml EF-Tu(GDP), 2,5 mM GTP;

B. 15 µl segu sisaldas P10 puhvris 20 pmooli [³H]Phe-tRNA^{Ala} (või [¹⁴C]Val-RNA^{Ala}, vastupidiselt segule A), 45 µg/ml EF-Tu(GDP), 179 µM [³H]GTP, 10 mM fosfoenoolpüruvaati, 1 µg püruvaatkinaasi;

C. 10 µl segu sisaldas P10 puhvris 0,6 pmooli ribosome 7,5 pmooli mRNA polü(GUU)₄₈, 0,34 mg/ml EF-G ja 3,5 mM GTP.

Segusid A, B inkubeeriti eraldi 5 minutit temperatuuril 37° C, selleks, et segus B vahetuks kompleks EF-Tu(GDP) EF-Tu([³H]GTP) vastu. Segud A ja B segati kokku ning lisati segu C. Vastavates ajapunktides pipeteeriti segust 5 µl, lisati samas koguses 20% HCOOH ja tsentrifuugiti 15 minutit. 2 µl lahust kanti PEI-tselluloos õhukese kihi kromatograafia plaadile. Proove voolutati suletud anumasse 1M HCOOH ja 0,8 M LiCl keskkonnas stardijoonest 10-12 cm kaugusele. Kuivatatud plaadil visualiseeriti lainepikkusel 380 nm GTP ja GDP kaugus stardijoonest ühele rajale pandud markeri järgi (markeriks oli segu 20 nmooli GTP/20 nmooli GDP). GTP ja GDP fraktsiooni

sisaldavad osad lõigati plaadist välja, lisati stsintillaatorit ning loendati nii GTP kui GDP hulk proovides ning arvutati GTP hüdrolüüsitas.

3. TULEMUSED

3.1. tRNA A76G asenduse funktsionaalne tähtsus ribosomaalsel translatsioonil

tRNA aktseptorheeliksi 3'-terminaalse nukleotiidi funktsionaalse tähtsuse uurimiseks ribosomaalses translatsioonis võrreldi *in vitro* transkribeeritud tRNA^{Val} variantide A76 ja G76 aktiivsust translatsiooni elongatsioonil, peptidüültransferaasireaktsioonis ja translokatsioonil *in vitro* katsetes..

3.1.1. Asenduse A76G mõju tRNA^{Val} aminoatsüleerimisele

tRNA asenduse A76G mõju uurimiseks ribosomaalsel translatsioonil on oluline lisada *in vitro* translatsioonikatsetesse eelnevalt aminoatsüleeritud ja puhastatud Val-tRNA^{Val}, selleks et välistada erinevast ensüümile seondumisest ja aminoatsüleerimisreaktsiooni kineetikast tulenevat konkurentsi.

Enamus aminoatsüül-tRNA süntetaase (AARS) tunneb ära ja aminoatsüleerib modifitseerimata alustega tRNAd (*Derrick ja Horowitz 1993; Giege et al 1998*). Aminoatsüleerimisel seostub tRNA aktseptorheeliksi 3'-otsas olev üheaheelaline CCA-järjestus AARS aktiivtsentrisse ning terminaalse nukleotiidi 2'(3')-OH külge lülitatakse estersidemega aminohape. Eelnevalt on teada, et asendus A76G takistab tRNA^{Val} korrektset seondumist *E.coli* ValRS`le (*Liu ja Horowitz 1994*). Käesolevas töös kasutati *in vitro* transkribeeritud *E.coli* tRNA^{Val} variantide A76 ja G76 aminoatsüleerimiseks *Thermus thermophiluse* ValRS. Meie laboris eelnevalt tehtud katsed on näidanud, et mõlemad tRNA variandid on selle ensüümi poolt hästi äratuntavad ja aminoatsüleeritavad (*Lillemäe 1999*). Aminoatsüleerimise reaktsiooni pandud deatsüleeritud tRNA hulgast aminoatsüleerus tRNA^{Val} variant A76 ligikaudu 80-85% ja variant G76 55-65% ulatuses (Lisa 1). Vaatamata mõningasele kõikumisele saagises oli kahe variandi suhe (G76/A76) ligilähedaselt 0,7. *E.coli* fraktsioneerimata tRNA^{tot} oli S100 ensüümifraktsiooniga aminoatsüleeritav nii valiini- kui seriiniga.

3.1.2. A76G asendusega Val-tRNA^{Val} aktiivsus polü(GUA)₄₄ sõltuval *in vitro* translatsioonil

Polü(GUA)₄₄ sõltuvat *in vitro* translatsioonisüsteemi katsetati *E.coli* MRE600 tüvest eraldatud ja valiiniga aminoatsüleeritud fraktsioneerimata tRNA^{tot} abil. Püüti

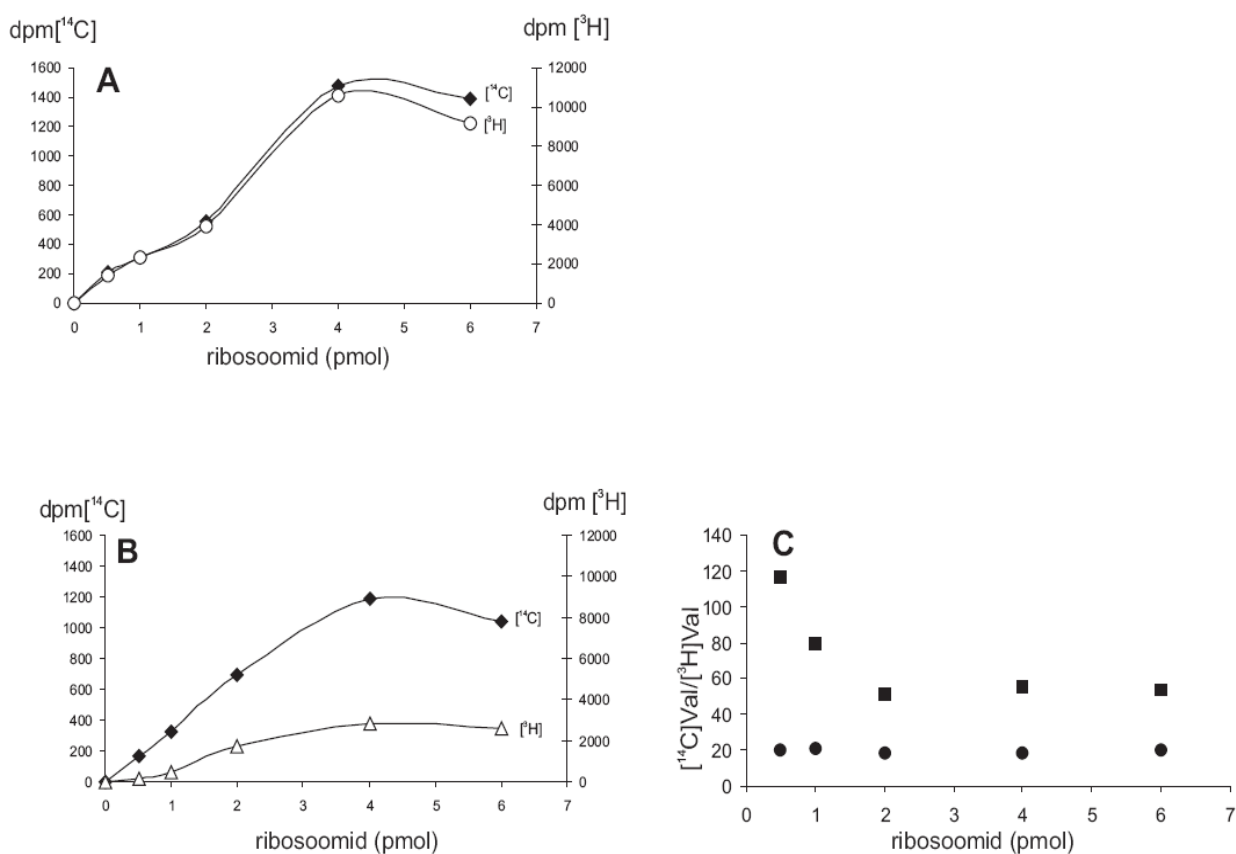
leida optimaalsed tingimused edasisteks katseteks. *In vitro* translatsioonikatsetes kasutatavate komponentide tiitrimise tulemusena leiti, et polü(Val) ahela süntees natiivse tRNA^{tot} vahendusel on optimaalne kui 4-5 pmooli 70S ribosoomide (või 10 pmooli 50S ja 30S ribosoomi subühikute) kohta on lisatud reaktsiooni 1 µg mRNA polü(GUA)₄₄, juhul kui koos Val-tRNA^{tot} on lisatud küllastuskoguses elongatsioonifaktoreid ja GTPd (andmed esitamata).

Järgnevalt püüti kindlaks teha polü(GUA)₄₄ sõltuva natiivse tRNA^{tot} vahendatud translatsiooni elongatsioonietapi stabiilsus. Selleks formeeriti initsiatsioonikompleks 70S·polü(GUA) ja doonorsubstraadist NAc^[3H]Val-tRNA^{tot} molaarses suhtes 10:1 ning tiitriti [¹⁴C]Val-tRNA^{tot}, elongatsioonifaktoreid ja GTPga. Leiti, et TCA`ga sadestatud polüpeptiidides NAc^[3H]Val-(¹⁴C)Val)_n (kus n>4) oli erinevate radioaktiivsete märgistega aminohapete molaarne suhe ligikaudu 1:15 (andmed esitamata). Kahe aminohappe suhe võib iseloomustada ligikaudselt polü(GUA)₄₄ sõltuval valiini polümerisatsioonil tekkivat polü(Val) ahela pikkust.

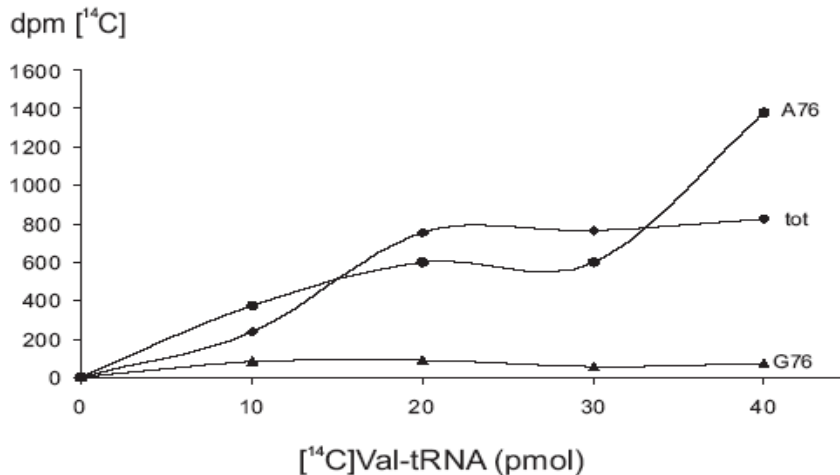
Kuna katsetes kasutatud aminohape valiin oli märgitud kahe erineva radioaktiivse isotoobiga (¹⁴C ja ³H), siis kontrolliti aminohappe lülitumist peptiidahelasse sõltuvalt radioaktiivsest märkest. Selleks lisati translatsioonikatsesse [³H]Val-tRNA^{tot} ja [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} molaarses suhtes 1:20 ja mõõdeti erineva radioaktiivse märkega valiini sisaldust peptiidahelas. **Joonisel 1A ja 1C** kujutatud katse tulemused kinnitavad, et erinevate märgiste suhe reaktsiooni segus ja polüpeptiidis on nii madalatel kui kõrgetel ribosoomi kontsentratsioonidel sarnane (1:20). Järelikult valiini lülitumine polüpeptiidahelasse ei sõltu radiaktiivsest märkest.

Eelkirjeldatud translatsioonikatsed näitasid, et natiivse tRNA^{tot} kaasabil toimus polü(Val) ahela süntees nii translatsioonil kui kotranslatsioonil. Selleks, et uurida tRNA^{Val} terminaalse nukleotiidi mõju translatsioonile, testiti ka *in vitro* transkribeeritud Val-tRNA^{Val} variandi A76 ja mutantse variandi G76 võimet vahendada polü(Val) ahela sünteesi. Selleks tiitriti 70S·polü(GUA) kompleksi [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} ja küllastuskoguses elongatsioonifaktoreid ja GTPga. *In vitro* transkribeeritud tRNA^{Val} variant A76 osales translatsioonil ja lülitas valiini peptiidahelasse, seevastu mutantset tRNA^{Val} varianti G76 sisaldavas translatsioonisegus produkti ei moodustunud (**joonis 2**). Vaatamata erinevate translatsioonikatsete saagise kõikumisele, on *in vitro* transkribeeritud tRNA^{Val} variandi A76 aktiivsus polüpeptiidi sünteesil ligikaudu kaks korda madalam kui tRNA^{tot} plümerisatsiooniaktiivsus ning tRNA variant G76 valiini polümerisatsioonil ei osale.

Eelkirjeldatud katse tulemustest lähtuvalt kontrolliti, kas Val-tRNA^{Val} mutantne variant G76 on võimeline osalema polüvaliini sünteesil, kui lisaks mutantsele Val-tRNA^{Val} on translatsiooniseigus ka metsiktüüpi Val-tRNA^{tot}. Tulemused näitasid, et kotranslatsiooni segust, kuhu oli lisatud [³H]Val-tRNA^{Val} variant G76 ja [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} molaarses suhtes 1:20, lülitus peptiidahelasse peamiselt [¹⁴C]Val (joonis 1B).



Joonis 1. Kahe erineva radioaktiivse märgisega valiini polü(GUA)₄₄ sõltuv lülitumine peptiidahelasse. 70S-polü(GUA)₄₄ kompleksile lisati koos EF-Tu, EF-G ja GTP'ga molaarses suhtes 1:20 kas (A) [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} (♦) ja [³H]Val-tRNA^{tot} (○) või (B) [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} (♦) ja [³H]Val-tRNA(G76) (Δ). Paneelil (C) on näidatud [¹⁴C]Val/[³H]Val suhe polüpeptiidis A paneelil kujutatud translatsioonis (●) ja B paneelil kujutatud translatsioonis (■). [³H]Val eriaktiivsus on 60000 dpm/pmol ja [¹⁴C]Val eriaktiivsus 500 dpm/pmol.



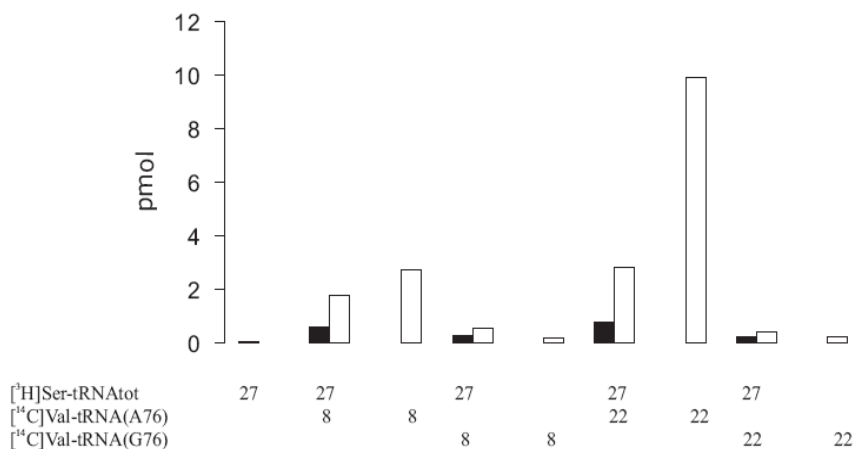
Joonis 2. tRNA^{tot} ja *in vitro* transkribeeritud tRNA^{Val} variantide A76 ning G76 poolt vahendatud polü(GUA) sõltuv valiini polümerisatsioon. 30S-50S-polü(GUA)₄₄ initsiatsioonikompleksile lisati koos EF-Tu, EF-G ja GTPga elongaator-tRNA: [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} (◆), [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} A76 (●) või [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} G76 (▲). [¹⁴C]Val eriaktiivsus 500 dpm/pmol.

Võrreldes **joonisel 1A ja 1B** kujutatud kotranslatsiooni katsete tulemusi, on näha, et [³H]Val-tRNA^{Val} variant G76 takistab ka [¹⁴C]-märkega valiini lülitumist polüpeptiidi. Võib-olla langeb natiivse tRNA^{tot} vahendatud valiini lülitumine umbes 25% võrra TCAga mittesadenevate lühikeste peptiidide (<(Val)₄) hulga suurenemise arvelt. **Joonisel 1C** on näha, et kotranslatsioonis lülitub peptiidahelasse ka tRNA^{Val} variandi G76 vahendatud [³H]valiin ning [¹⁴C]Val:[³H]Val molaarne suhe ribosoomi küllastuskontsentratsioonil on translatsioonisegus oleva 20:1 asemel tõusnud polüpeptiidis 60:1. Välistamaks võimalust, et variandi G76 aktiivsus kotranslatsioonil on näiline ja translatsiooni segus toimub tRNA transamiinimine, lisati kotranslatsioonisegusse erinevas koguses deatsüleeritud tRNA^{tot}. Kotranslatsiooni tulemused ei sõltunud lisatud deatsüleeritud tRNA^{tot} hulgast (andmed esitamata).

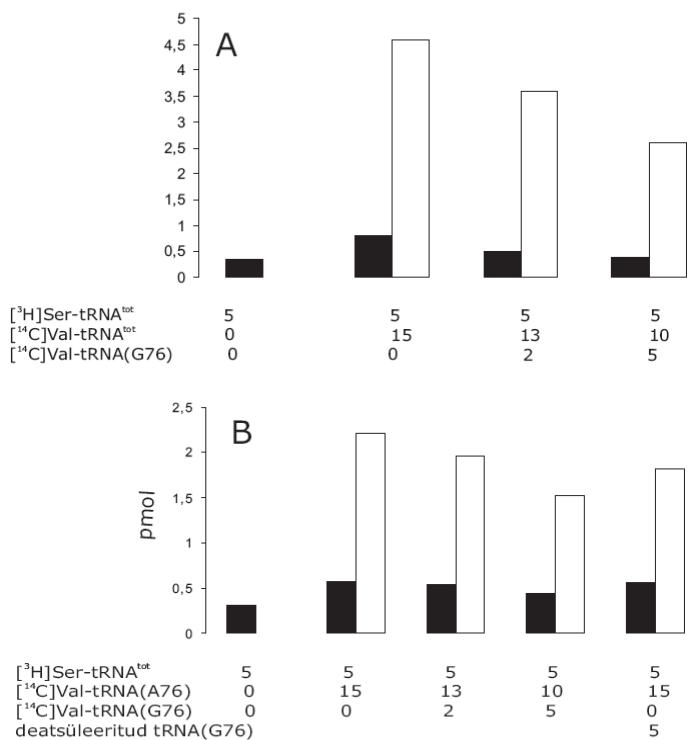
Korrektse 3'-CCA otsa puudumine mõjutab tRNA seondumist ribosoomile. Nõrgast tRNA seondumisest tingituna võib valiini koodon olla ribosoomi peptidüültransferaases tsentris ebastabiilselt fikseeritud ja takistada tRNA^{Val} variandi G76 vahendatud valiini polümerisatsiooni. Uuriti, kas tRNA asendus A76G võib põhjustada ribosoomi libisemist mRNA'l. mRNA polü(GUA)₄₄ annab võimaluse uurida –1 raaminihet, kuna üks kuuest seriini siduvast tRNAst - tRNA^{Ser} (G34-C35-U36) - tunneb ära koodoni AGU.

Raaminihke mõõtmiseks testiti eelnevalt seriini polümerisatsiooni taset polü(AGU) sõltuval translatsioonil. 70S-polü(AGU) kompleksile lisati [³H]Ser-

tRNA^{tot} koos elongatsioonifaktorite ja GTPga. Tulemuseks saadi, et tRNA^{tot} vahendusel lülitati seriin polüpeptiidahelasse väga vähese aktiivsusega (joonis 3 ja 4).



Joonis 3. Valiini ja seriini lülitumine polüpeptiidi kotranslatsioonil. Koodoni fikseerimiseks moodustati initsiatsioonikompleks 30S·50S-polü(GUA)₄₄ ja [¹⁴C]Val-tRNA variantidega A76 ja G76, millele lisati koos EF-Tu, EF-G ja GTP'ga [³H]Ser-tRNA^{tot}. Katsesse lisatud aa-tRNA hulk (pmol) on näidatud joonisel. Valiini lülitumine polüpeptiidi on tähistatud valge, seriini lülitumine musta tulbaga.



tulbaga.

Joonis 4. Valiini ja seriini lülitumine polüpeptiidi kotranslatsioonil. Koodoni fikseerimiseks moodustati initsiatsioonikompleks 70S-polü(GUA)₄₄ 5 pmooli (A) [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} või (B) [¹⁴C]Val-tRNA variandiga A76. Koos EF-Tu, EF-G ja GTP'ga lisati 5 pmooli [³H]Ser-tRNA^{tot} ja 10 pmooli [¹⁴C]Val-tRNA. Katsesse lisatud aa-tRNA hulk (pmol) on näidatud joonisel. Valiini lülitumine polüpeptiidi on tähistatud valge, seriini lülitumine musta tulbaga.

Kotranslatsioonil formeeriti valiini koodoni fikseerimiseks initsiatsioonikompleks 70S·polü(GUA)₄₄ ja [¹⁴C]Val-tRNA`ga ning lisati koos elongatsioonifaktorite ja GTPga joonistel 3 ja 4 näidatud kogustes ja kombinatsioonides [³H]Ser-tRNA^{tot}, [¹⁴C]Val-tRNA variandid A76 (või [¹⁴C]Val-tRNA^{tot}) ja G76. Selgus, et seriini lülitumine polüpeptiidi tõuseb vähemalt kaks korda kotranslatsioonil valiiniga.

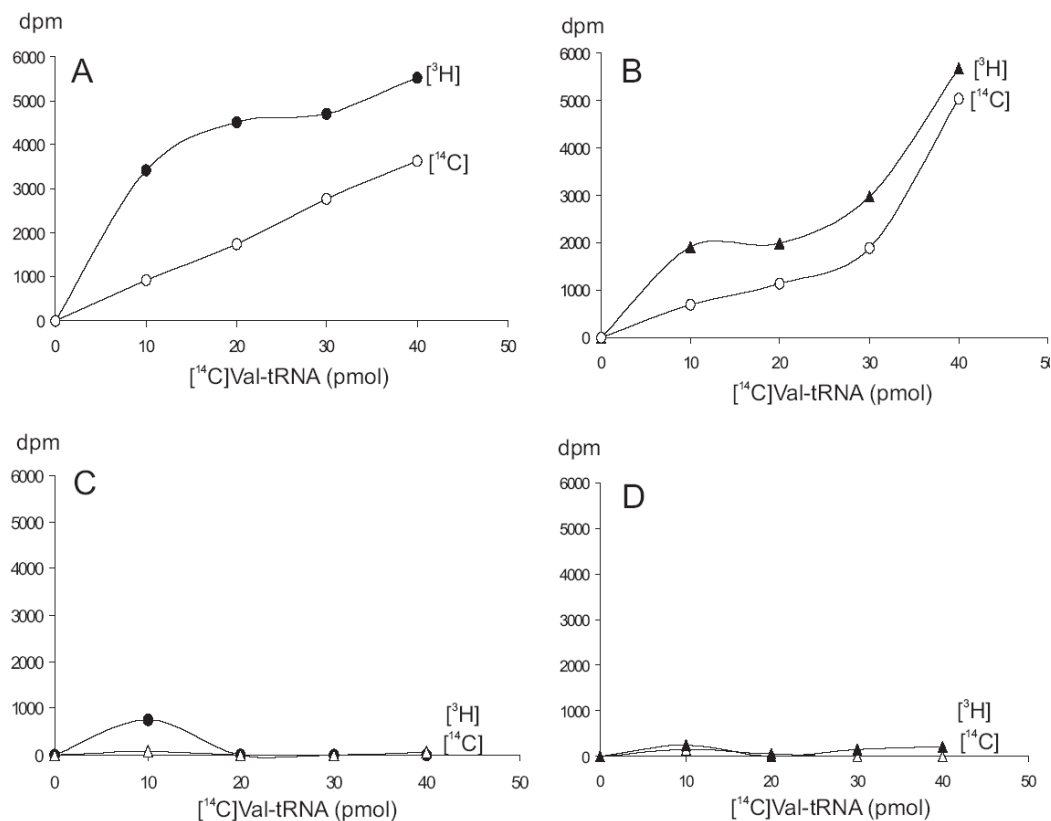
Joonisel 4 kujutatud katses säilis seriini ja valiini molaarne suhe reaktsioonisegus (1:3) ka polüpeptiidis kotranslatsioonil Val-tRNA^{Val} variandiga A76 (1:3,6).

Erinevalt seriini polümerisatsiooni paranemisest kotranslatsioonil, stimuleeris Ser-tRNA^{tot} lisamine vaid tRNA^{Val} variandi G76 vahendatud valiini lülitumist peptiidi (**joonis 3**). Seevastu tRNA^{Val} variandi G76 lisamine translatsioonisegusse takistas elongatsiooni ning vähendas nii seriini kui tRNA^{tot} ja tRNA^{Val} variandi A76 vahendatud valiini lülitumist polüpeptiidi (**joonis 4**). Samas deatsüül-tRNA variandi G76 lisamisel mingit mõju ei olnud (**joonis 4**). Toodud katsed ei kinnita, et just tRNA^{Val} mutatsioon A76G põhjustab raaminihke toimumist. Pigem aktiveerib seriini lülitumist peptiidi Val-tRNA lisamine.

3.1.3. A76G asendusega Val-tRNA^{Val} aktiivsus polü(GUA)₄₄ sõltuva translatsiooni initsiatsioonil ja elongatsioonil

Eelkirjeldatud katsed näitasid, et Val-tRNA^{Val} mutantne variant G76 üksi ei osale polü(Val) sünteesil. Samas soodustasid translatsioonisegusse lisatud Val-tRNA^{tot} või Ser-tRNA^{tot} Val-tRNA^{Val} variandi G76 vahendatud valiini lülitamist. Sellest tulenevalt kontrolliti, kas mutantne tRNA^{Val} variant G76 on aktiivne translatsiooni initsiatsioonil. Initsiatsiooni uurimiseks seoti 9 pmooli 30S·50S·polü(GUA)`ga 2 pmooli NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid A76 või G76. NAcVal-tRNA^{Val} seondub otse ribosoomi P-saiti ja osaleb peptiidideme moodustamisel ainult doonorsubstraadina. Seejärel tiitriti initsiatsioonikompleksi [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} variandiga A76 koos elongatsioonifaktorite- ja GTPga. NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid A76 ja G76 seonduvad polü(GUA)₄₄ juuresolekul ribosoomidega ligikaudu võrdsel määral (G76 seondus 84% võrrelduna A76) (tabel 2). Translatsiooni initsiatsioonil olid mõlemad NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid aktiivsed, kuid variant G76 oli märgatavalt vähemaktiivsem doonorsubstraat (**joonis 5A ja 5B**). Väärrib märkimist, et NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variant G76 takistas ka polü(Val)-ahela elongatsiooni (**joonis 5B**). Need

tulemused näitavad, et tRNA mutatsioon A76G põhjustab tRNA aktiivsuse vähenemise doonorsubstraadina.



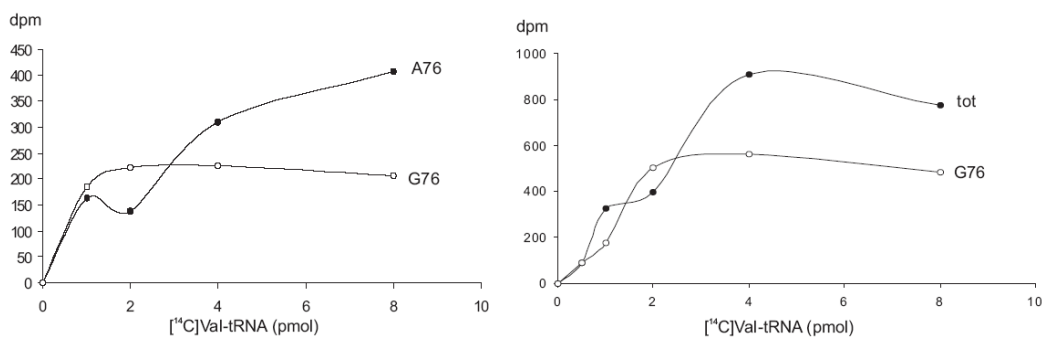
Joonis 5. Polü(GUA)₄₄ sõltuv valiini polümerisatsioon kotranslatsioonil. Initsiatsioonikompleks moodustati 30S-50S-polü(GUA)₄₄ ja P-saidi substraadiga [³H]NacVal-tRNA. Peptiidahela sünteesiks lisati koos elongatsioonifaktorite ja GTP'ga [¹⁴C]Val-tRNA. Mõõdetud on TCA-ga sadestatud peptiidi NAc[³H]Val-([¹⁴C]Val)_n (n>4). [³H]Val eriaktiivsus on 30000 dpm/pmol, [¹⁴C]Val eriaktiivsus 500 dpm/pmol
(A) NAc[³H]Val-tRNA(A76) (●) ja [¹⁴C]Val-tRNA(A76) (○);
(B) NAc[³H]Val-tRNA(G76) (▲) ja [¹⁴C]Val-tRNA(A76) (○);
(C) NAc[³H]Val-tRNA(A76) (●) ja [¹⁴C]Val-tRNA(G76) (Δ);
(D) NAc[³H]Val-tRNA(G76) (▲) ja [¹⁴C]Val-tRNA(G76) (Δ).

Uuriti ka Val-tRNA^{Val} variandi G76 aktiivsust translatsiooni elongatsioonil. Selleks formeeriti initsiatsioonikompleksid NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variantidega A76 või G76 ning tiitriti initsiatsioonikomplekse [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} variandiga G76. **Joonistel 5C ja 5D** kujutatud katseis on näha, et mutantne elongaator-tRNA on elongatsioonil inaktiivne.

3.1.4. A76G asendusega Val-tRNA^{Val} doonor- ja aktseptoraktiivsus peptidüültransferaasireaktsioonis

Eelnevad katsed näitasid, et Val-tRNA^{Val} mutantne variant G76 on täielikult inaktiivne translatsiooni elongatsioonil. Dipeptiidi katse annab võimaluse uurida A76G asendusega tRNA aktiivsust elongatsioonil toimivas peptidüültransferaasireaktsioonis nii doonori- kui aktseptorsubstraadina.

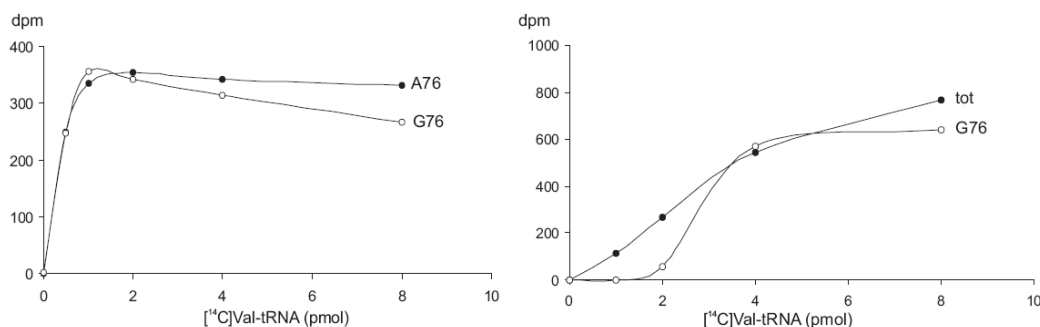
Val-tRNA^{Val} variant G76 doonoraktiivsuse testimiseks moodustati initsiatsioonikompleks lisades 20 pmooli 30S·50S·polü(GUA)₄₄ kompleksile NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid A76 või G76. Initsiatsioonikompleksi tiitriti EF-Tu·GTP'ga küllastatud aktseptorsubstraadiga [¹⁴C]Val-tRNA^{Val}. Leiti, et doonorid NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid A76 ja G76 käituvad madalal aktseptorsubstraadi kontsentratsioonil sarnaselt (joonis 6A). Aktseptorsubstraadi kontsentratsiooni tõustes on NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variant A76 doonorina aktiivsem ja NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandi G76 doonoraktiivsus langeb ligikaudu 25%. Sarnane doonoraktiivsuse langus esines ka aktseptorsubstraadiga [¹⁴C]Val-tRNA^{tot} (joonis 6B).



Joonis 6. *In vitro* transkribeeritud NAc[³H]Val-tRNA variantide A76 ja G76 doonoraktiivsus dipeptiidireaktsioonis. 30S·50S·polü(GUA)₄₄ kompleksiga on seotud doonorsubstraat NAc[³H]Val-tRNA ning koos EF-Tu ja GTPga lisatud aktseptorsubstraat [¹⁴C]Val-tRNA. Paneelil (A) on aktseptorsubstraadiks [¹⁴C]Val-tRNA(A76) ja paneelil (B) [¹⁴C]Val-tRNA^{tot}. Doonorsubstraadid NAc[³H]Val-tRNA(A76) (●) või NAc[³H]Val-tRNA(G76)(○). Reaktsioonikäigus tekkinud ja etüülatsetaati ekstraheeritud dipeptiidi [³H]NacVal-[¹⁴C]Val hulk mõõdeti [¹⁴C] märke järgi (500 dpm/pmol).

Uuriti ka tRNA mutatsiooni A76G mõju aktseptorsubstraadi aktiivsusele dipeptiidireaktsioonis. Selleks seoti 70S·polü(GUA)₄₄ P-saiti NAc[³H]Val-tRNA^{tot} või NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variant A76. Initsiatsioonikompleksi tiitriti võrdlevalt aktseptorsubstraadide [¹⁴C]Val-tRNA^{Val} variantidega A76 või G76 koos küllastuskoguses EF-Tu·GTP'ga. Joonistel 7A ära toodud tulemustest on näha, et

mõlemad [^{14}C]Val-tRNA^{Val} variandid käitusid aktseptorina dipeptiidisünteesil sarnaselt, seda sõltumata aktseptorsubstraadi kontsentratsioonist. Aktseptoraktiivsuses ei täheldatud kahe variandi vahel erinevusi ka katsetes kus dipeptiidi doonorina oli lisatud natiivne NAcVal-tRNA^{tot} (joonis 7B).



Joonis 7. *In vitro* transkribeeritud [^{14}C]Val-tRNA variantide A76 ja G76 aktseptoraktiivsus dipeptiidireaktsioonis. 30S-50S ·polü(GUA)₄₄ kompleksiga on seotud doonorsubstraat NAc[^3H]Val-tRNA ning koos EF-Tu ja GTPga lisatud aktseptorsubstraat [^{14}C]Val-tRNA. Paneelil (A) on doonorsubstraadiks NAc[^3H]Val-tRNA(A76) ja paneelil (B) NAc[^3H]Val-tRNA^{tot}. Doonorsubstraadid on NAc[^3H]Val-tRNA(A76) (●) või NAc[^3H]Val-tRNA(G76)(○). Reaktsioonikäigus tekkinud ja etüülatsetaati ekstraheeritud dipeptiidi [^3H]NacVal-[^{14}C]Val hulk mõõdeti [^{14}C] märke järgi (500 dpm/pmol).

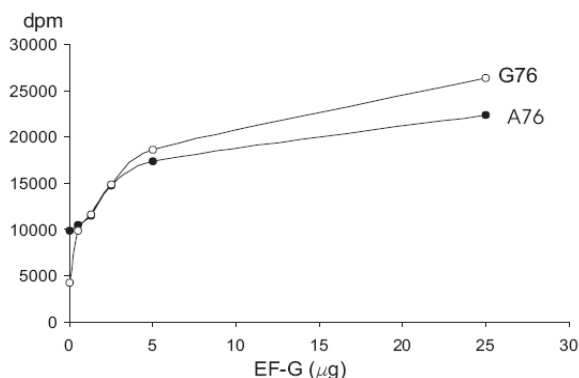
3.1.5. A76G asendusega deatsüleeritud tRNA^{Val} liikumine ribosoomi P-saidist E-saiti

Dipeptiidi katsed näitasid, et tRNA terminaalne asendus A76G ei mõjuta oluliselt tRNA^{Val} doonor- ega aktseptoraktiivsust peptidüültransferaasireaktsioonis. Edasi uuriti kuivõrd avaldab tRNA A76G asendus mõju tRNA´de translokatsioonile ribosoomis.

Deatsüleeritud tRNA seondub ribosoomi E-saiti ühtlasi aktseptorheeliksi 3´-terminaalse CCA-järjestuse vahendusel. Mutatsioon A76G võib inhibeerida peptidüül-tRNA analoogi liikumist ribosoomi P-saidist E-saiti. Deatsüleeritud tRNA^{Val} translokatsiooni uurimiseks seoti 5 pmooli 70S-polü(GUA)₄₄ kompleksiga küllastuskoguses deatsüleeritud tRNA variandid A76 või G76 ribosoomi E- ja P-saidi täitmiseks. Seejärel lisati 10 pmooli NAc[^3H]Val-tRNA^{Val} varianti A76 koos EF-G´ga. Kui ribosoomi P-sait on hõivatud seondub NAc[^3H]Val-tRNA^{Val} A-saiti. EF-G sõltuvat translokatsiooni kontrolliti puromütsiiniga. Puromütsiin seondub ribosoomi A-saiti ja reageerib ribosoomi P-saiti translokeerunud NAc[^3H]Val-tRNA^{Val} ga. Deatsüleeritud tRNA metsiktüüpi variandi A76 ja mutantse variandi G76

translokatsiooni ribosoomi P-saidist E-saiti jälgiti tõusvas EF-G kontsentratsioonis etüülatsetaadi fraktsiooni ekstraheeritud $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val}$ -puromütsiini hulga järgi.

Deatsüleeritud tRNA^{Val} variantide A76 ja G76 seondumine ribosoomi P- ja E-saiti oli erinev (Lisa 2.). Deatsüleeritud tRNA^{Val} variant G76 seondus ribosoomi E- ja P-saiti vaid 60% ulatuses võrreldes variandiga A76. A-saidi substraadi, $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA}^{\text{Val}}$ variandi A76 lisamisel initsiatsioonikompleksile, toimus mõningane deatsüleeritud tRNA irdumine ribosoomilt, suhe kahe variandi vahel jäi aga samaks. Mõlema deatsüleeritud tRNA variantidega okupeeritud ribosoomid seovad A-saidi substraati peaaegu võrdselt (suhe $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA(A76)}(\text{tRNA(G76)})/\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA(A76)}(\text{tRNA(A76)})$ on 0,9. Translokatsioonijärgselt on mutantset deatsüleeritud tRNA varianti seotud ribosoomiga (arvatavalt vaid E-saidiga) 86% võrreldes variandiga A76 ja samal ajal neis ribosoomides P-saidis $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA}^{\text{Val}}$ A76 suhe 1,1 (Lisa 2). Translokatsiooni produkti $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val}$ -puromütsiini mõõtmine erinevatel EF-G kontsentratsioonidel näitas, et mutantne deatsüleeritud tRNA^{Val} variant G76 ei takista ribosoomi translokatsiooni (joonis 8).



Joonis 8. *In vitro* transkribeeritud deatsüleeritud tRNA variantide A76 ja G76 EF-G sõltuv translokatsioon ribosoomi P-saidist E-saiti. 70S-polü(GUA)₄₄ küllastati deatsüleeritud tRNA variantidega A76 (●) või G76 (○) ja lisati koos EF-G ja GTPga $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA(A76)}$. Mõõdeti 1mM puromütsiini lisamisel ja neutraalses etüülatsetaadis ekstraheeritud $^3\text{H}]\text{NacVal-Puro}$. Translokatsioon toimus temperatuuril 37°C 10 minutit.

3.1.6. A76G asendusega $\text{NACVal-tRNA}^{\text{Val}}$ liikumine ribosoomi A-saidist P-saiti

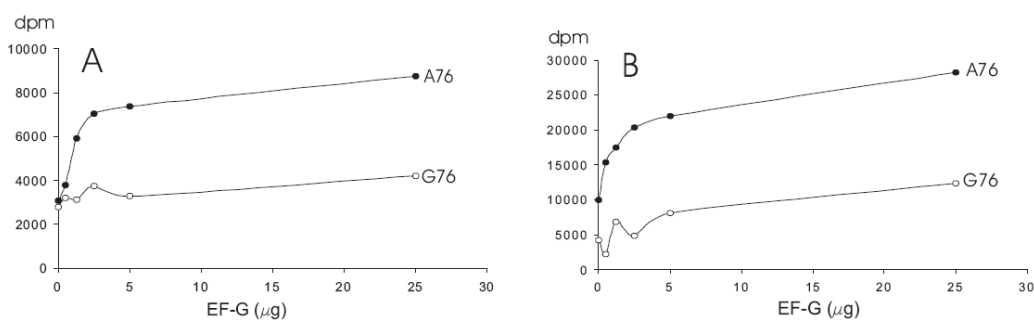
Selleks, et uurida kas mutatsioon takistab translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti formeeriti initsiatsioonikompleks 5 pmooli 70S-polü(GUA)₄₄ ja küllastuskontsentratsioonis deatsüleeritud tRNA variandiga A76. Initsiatsioonikompleksi A-saiti seoti 10 pmooli $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Val-tRNA}^{\text{Val}}$ variant A76 või G76 koos EF-G`ga. Translokatsiooni kontrolliks lisatud puromütsiin, mis reageerib P-

saidis oleva NAc[³H]Val-tRNA variantide A76 või G76, NAc[³H]Val-puromütsiini taset mõõdeti erinevatel EF-G kontsentratsioonidel.

Kuna translokatsiooni toimumise kontrollitaks on vajalik puromütsiinireaktsioon, siis kontrolliti eelnevalt P-saiti seotud NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variantide A76 ja G76 võimet reageerida ribosoomi A-saiti seonduva puromütsiiniga. Võib öelda, et tRNA^{Val} terminaalne mutatsioon tõstab reaktsiooni K_m, aga ei takista reaktsiooni puromütsiiniga. 1 mM puromütsiini kontsentratsiooni juures reageerivad mõlemad variandid puromütsiiniga samal tasemel (andmed esitamata).

NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandid A76 ja G76 seonduvad deatsüleeritud tRNAga küllastatud 70S-polü(GUA) A-saiti peaegu võrdselt. Suhe kahe A-saiti seonduvad NAc[³H]Val-tRNA^{Val} variandi vahel on sõltub A-saidi substraadi kontsentratsioonist - mida väiksem on A-saidi substraadi kontsentratsioon seda väiksem on erinevus kahe variandi seonduvuses (**Lisa 3A**). NAc[³H]Val-tRNA^{Val} seondumine ribosoomi A-saiti sõltub Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist. Kõige parem on seondumine 12-15 mM Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonil (**Lisa 3B**).

EF- G sõltuva translokatsiooni tulemused on ära toodud **joonistel 9A ja 9B**. tRNA mutatsioon A76G mõjutas NAc[³H]Val-tRNA^{Val} EF-G sõltuvat translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti. 37°C juures oli mutantse NAc[³H]Val-tRNA^{Val} translokatsioonitase oluliselt langenud, 0°C juures ei toinud EF-G sõltuvat translokatsiooni üldse.



Joonis 9. *In vitro* transkribeeritud NAc[³H]Val-tRNA variantide A76 ja G76 EF-G sõltuv translokatsioon ribosoomi A-saidist P-saiti. 70S polü(GUA)₄₄ küllastati deatsüleeritud tRNA variandiga A76 ja lisati koos EF-G ja GTPga NAc[³H]Val-tRNA(A76) (●) või NAc[³H]Val-tRNA(G76) (○). Mõõdeti 1mM puromütsiini lisamisel EF-G kontsentratsiooni tõstes tekkinud ja neutraalses etüülatsetaadis ekstraheeritud [³H]NacVal-Puro. Translokatsioon toimus temperatuuril (A) 0°C 2 tundi; (B) 37°C 10 minutit

3.2. Aminohappe osa multifunktsionaalsete aa-tRNA selektsioonil

Käesoleva töö teises osas uurisime aminohappe osa aa-tRNA selektsioonil *in vitro* ribosomaalse translatsiooni käigus. Katsetes kasutati *in vitro* transkribeeritud *E.coli* tRNA^{Val}, *E.coli* tRNA^{Ala} ja pärmi tRNA^{Phe}, mis kõik sisaldasid G34-A35-C36 antikoodoni ja G3:U71 aluspaari aktseptorheeliks. Tänu muutustele olid kõik need tRNAd ära tuntavad kolme erineva AARS poolt (ValRS, AlaRS, PheRS) ja seetõttu aminoatsüleeritavad kolme aminoahappega. Nende tRNAd multispetsiifilisus annab võimaluse uurida aminoatsüüljäägi mõju translatsiooniprotsessile. Selleks, et süsteem oleks kontrollitav aminoatsüleeriti kõigepealt tRNAd ja seejärel lisati translatsioonisegusse puhastatud aa-tRNAd.

3.2.1. Multifunktsionaalsete tRNAd aminoatsüleerimine

Esimeseks ülesandeks oli aminoatsüleerida kõik multifunktsionaalsed tRNAd kolme erineva radioaktiivselt märgitud aminohappega. Eelnevalt oli teada, et tRNA transkripti aktiveerimine vesilahuse kuumutamise ja [Mg²⁺] lisamise abil muudab modifitseerimata tRNA puhastatud AARS'I jaoks paremaks substraadiks (Aid 2003).

ValRS on klass I monomeerne ensüüm, mille tähtsateks identsuselementideks on antikoodoni alused A35 ja C36 (Fukai, 2003). On näidatud, et ValRS aktsepteerib edukalt substraadina tRNAsid, mille antikoodonis on A35 ja C36 - tRNA^{Ala} (antikoodon UAC), pärmi tRNA^{Phe} ja tRNA^{Val} (antikoodonitega GAC) (Liu et al 1997). Vaatamata sellele, et G3:U70 paar on üheks ValRS antideterminandiks ja ei võimalda korralikku interaktsiooni tRNA aktseptorheeliksi ja ValRS vahel (Liu et al 1997), aminoatsüleeris puhastatud *T. thermophiluse* ValRS valiiniga edukalt kõiki kolme tRNA'd. Val-tRNA^{Val} ja Val-tRNA^{Phe} kuni 70% ja Val-tRNA^{Ala} kuni 60 % ulatuses (Lisa 1.).

AlaRS on homotetrameerne (α_4) II klassi süntetaas, mille C-terminaalse deletsiooniga 461 aminohappeline N-terminaalne fragment ei võimalda ensüümi subühikute polümerisatsiooni kuid on võimeline tundma ära AlaRS peamist identsuselementi G3:U70 (Lovato et al 2004). Seejuures ei ole oluline mitte niivõrd konkreetne aluspaar vaid 'wobble' paarist tekkinud aktseptorheeliksi tertsiarne struktuur (Murgola et al 1984; Lovato et al 2004). Näidatud on, et adenülaadi moodustumisel tekkiv pürofosfaat (PP_i) inhibeerib AlaRS aminoatsüleerimise reaktsiooni (Wolfson ja Uhlenbeck 2002). Lisades reaktsiooni PP_i taseme alandamiseks pürofosfataasi aminoatsüleeris puhastatud *E.coli* AlaRS kõiki kolme

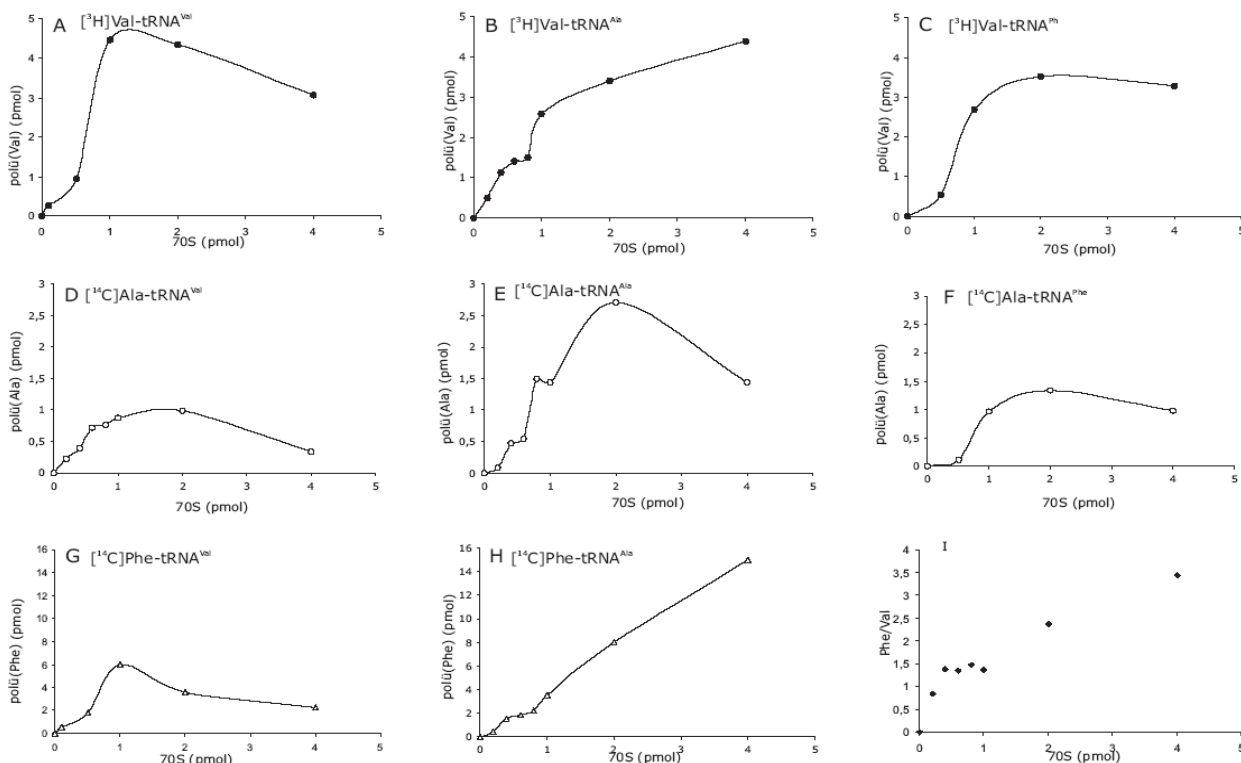
tRNAd piisavalt efektiivselt – tRNA^{Val} ja tRNA^{Ala} kuni 65% ja tRNA^{Phe} kuni 70% ulatuses (Lisa 1).

E. coli PheRS on heterotetrameerne ($\alpha_2\beta_2$) II klassi ensüüm, millele tähtsateks identselementideks on A73, G3:C70 aluspaar aktseptorheeliksis, mitmed modifitseeritud alused (näiteks D20) ning G34 ja A35 antikoodonis. (Giege *et al* 1998). Kõik *in vitro* transkribeeritud tRNAd olid puhastatud *E. coli* PheRS poolt aminoatsüleeritavad, aga piiratud ulatuses. On näidatud, et PheRS on tundlik tRNA^{Phe} tertsiaarse struktuuri suhtes, mis modifitseerimata aluste esinemisel on erinev (Giege *et al* 1998). Vaatamata tRNA tertsiaarse struktuuri stabiliseerimiseks lisatud 40 mM Mg²⁺-ioonide sisaldusele aminoatsüleerimise puhvril, lülitis fenüülalaniin *E. coli*st pärit tRNA^{Ala} ja tRNA^{Val} külge vaid 15 % ulatuses ja pärmi tRNA^{Phe} külge vaid <5% ulatuses (Aid 2003). Põhjusel, et puhastatud süntetaasiga aminoatsüleerimine oli väga materjalikulukas, seoti translatsioonikatseteks vajaminev fenüülalaniin tRNAdele *E. coli* lüsaadist eraldatud osaliselt puhastatud PheRS'ga. Saadi Phe-tRNA^{Val} 35% ja Phe-tRNA^{Ala} 40% ulatuses (Lisa 1).

3.2.2. Aminoatsüleeritud multifunktsionaalsed tRNAd polü(GUU)₄₈ sõltuvas translatsioonis

Alustuseks selgitati välja optimaalseks tingimused mRNA(GUU)₄₈ sõltuvas translatsiooniks. Selleks sünteesiti polü(GUU)₄₈ suunatult Val-tRNA^{tot} vahendusel polü(Val) ahel. Optimaalseks polü(GUU)₄₈ sõltuvas translatsiooniks on 2 pmooli ribosoomide kohta mõistlik lisada translatsiooni 0,2-0,3 µg mRNA polü(GUU)₄₈, juhul kui aa-tRNA, elongatsioonifaktoreid ja GTP on küllastuskoguses (andmed esitamata).

Selgitanud välja sobivad translatsioonitingimused natiivse Val-tRNA^{tot} kaasabil, vaadeldi kuidas osalevad polü(GUU)₄₈ sõltuval valiini,alaniini ja fenüülalaniini polümerisatsioonil modifitseerimata, *in vitro* transkribeeritud multifunktsionaalsed aa-tRNAd. Selleks lisati 70S·polü(GUU) kompleksile **joonisel 10** näidatud aa-tRNAd koos küllastuskoguses elongatsioonifaktorite- ja GTPga. Tulemused näitasid, et kõik kolm tRNAd (tRNA^{Val}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Phe}) osalevad translatsioonis ja igaüks neist oli võimeline vahendada kolme aminohappe (Val, Ala, Phe) lülitumist peptiidi (**joonis 10 A-G**). Tegemata jäi tRNA^{Phe} vahendatud polü(Phe) süntees, kuna käesolevas töös ei õnnestunud sünteesida piisaval hulgal Phe-tRNA^{Phe}.



Joonis 10 Polü(GUU)₄₈ sõltuv in vitro translatsioon multifunktsionaalsete aminoatsüleeritud tRNAdega. (A)-(H) 70S.polü(GUU)₄₈ kompleksile lisati küllastuskoguses elongatsioonifaktoreid ja GTP'd koos märgitud aa-tRNA' dega. (I) on võrreldud 814c9Phe ja [3H]Val suhet polüpeptiidis joonise paneelil (B) ja (H) kujutatud translatsioonil.

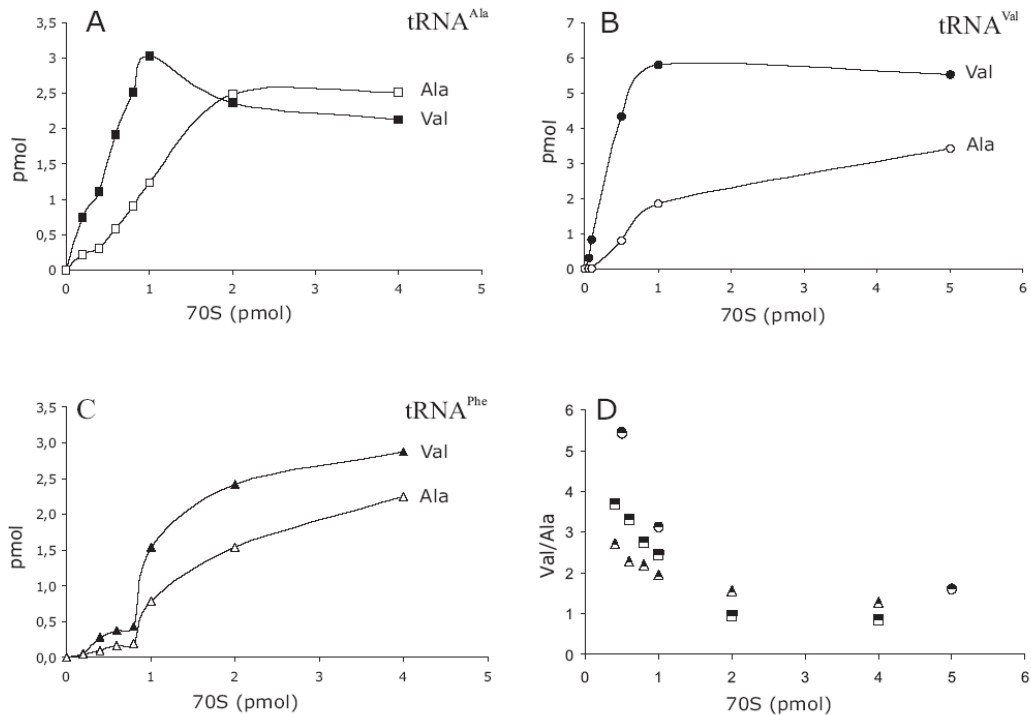
Joonisel 10 on näha, et aminohappe polümerisatsioonitase ei sõltu aminohapet kandvast tRNAst vaid pigem tRNAga seotud aminohappest. Kognaatse aminohaptega laetud tRNAd - Val-tRNA^{Val} ja Ala-tRNA^{Ala} – paistavad olema ribosoomile paremad substraadid kui mittekognaatse aminohaptega laetud tRNAd (**joonised 10A ja 10E**). Optimaalsetes tingimustes lülitub valiin peptiidahelasse kõikide tRNAde vahendusel umbes 16% (4 pmooli 28 pmoolist) (**joonised 10A-C**) jaalaniini 4-6% (1-1,5 pmooli 60 pmoolist) (**joonised 10D-F**) reaktsiooni pandud aminohappe hulgast. Fenüülalaniini polümerisatsioon on võrreldes teiste aminohapetega kõrge nii tRNA^{Val} kui tRNA^{Ala} vahendatud translatsioonil. Polü(Phe) ahelasse lülitub 28% reaktsioonisegus olevast fenüülalaniinist (**joonised 10G-H**).

3.2.3. Kahe aminohappe vaheline konkurents polü(GUU)₄₈ sõltuvas kotranslatsioonil

Eelnevad katsed näitasid, et kõik aminoatsüleeritud multifunktsionaalsed tRNAd oli aktiivsed polü(GUU)₄₈ sõltuval translatsioonil. Kotranslatsiooni katses,

kuhu oli lisatud võrdses hulgas kahe erineva aminohappega laetud aa-tRNA, uuriti nende aminohapete vahelist konkurentsi polüpeptiidi lülitamisel.

Selleks lisati suboptimaalsele kogusele (0-0,8 pmooli) 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile kahe erineva aminohappega laetud aa-tRNA segu (molaarses suhtes 1:1) koos küllastuskoguses elongatsioonifaktorite ja GTPga. **Joonisel 11A** kujutatud kotranslatsioonikatsesse on lisatud 25 pmooli [¹⁴C]Ala-tRNA^{Val} ja 25 pmooli [³H]Val-tRNA^{Val}.

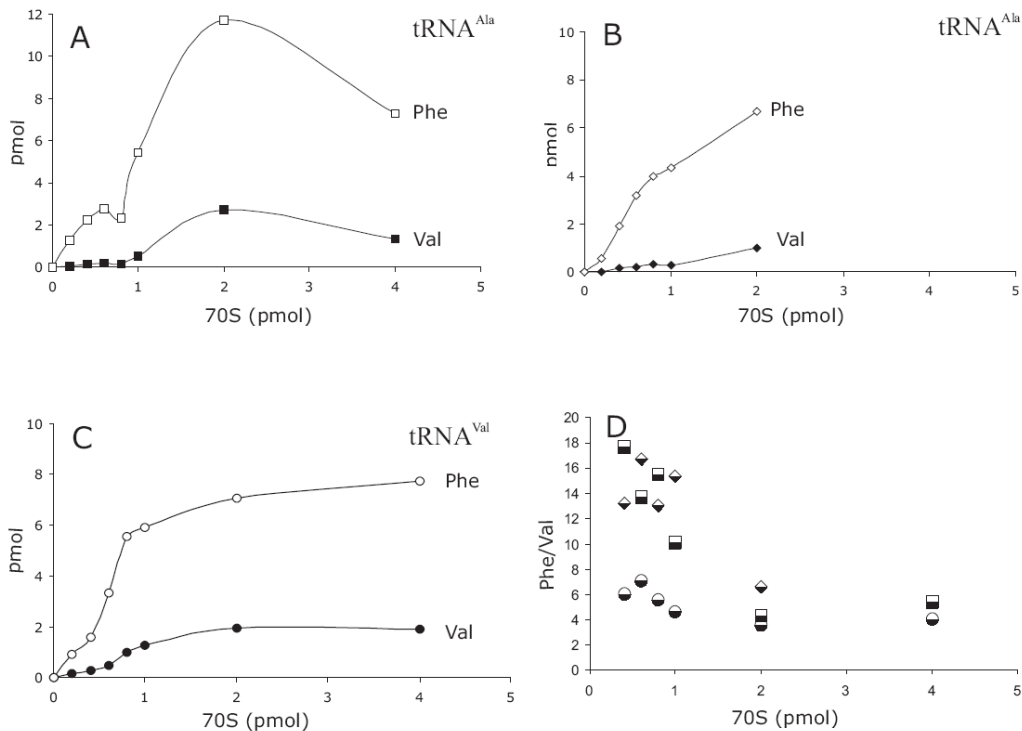


Joonis 11. Polü(GUU)₄₈ sõltuv valiini jaalaniini kopolümeerisatsioon. 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud küllastuskontsentratsioonil elongatsioonifaktoreid ja võrdses suhtes: (A) [³H]Val-tRNA^{Ala} (■) ja [¹⁴C]Ala-tRNA^{Ala} (□); (B) [³H]Val-tRNA^{Val} (●) ja [¹⁴C]Ala-tRNA^{Val} (○); (C) [³H]Val-tRNA^{Phe} (▲) ja [¹⁴C]Ala-tRNA^{Phe} (Δ). [³H]Val eriaktiivsus on 700 dpm/pmol, [¹⁴C]Ala 350 dpm/pmol. (D) [³H]Val ja [¹⁴C]Ala suhe polüpeptiidis kui aminohappe kandjaks on tRNA^{Ala} (□), tRNA^{Val} (○) tRNA^{Phe} (Δ)

Tulemused näitavad, et ribosoomide madalatel kontsentratsioonidel e konkurentsi tingimustes lülituvad polüpeptiidi nii tRNA^{Ala} vahendatudalaniin kui valiin, kuid valiini seondumine peptiidi on eelistatud. Val/Ala suhe polüpeptiidis langeb ribosoomi kontsentratsiooni kasvades (**joonis 11D**), seegaalaniini lülitumine ribosoomi kontsentratsiooni kasvades suureneb. Katseid tehti võrdlevalt ka tRNA^{Val} ja tRNA^{Phe}ga (**joonised 11B ja 11C vastavalt**). Sõltumata aminohappe kandjast (tRNAst) lülituvad valiin jaalaniin peptiidi sarnaselt. Kõigil juhtudel on Val/Ala suhe peptiidis on madalal ribosoomi kontsentratsioonil valiini kasuks ja ribosoomi kontsentratsiooni tõustesalaniini lülitumine paraneb. Kõrgetel ribosoomikontsentratsioonidel on

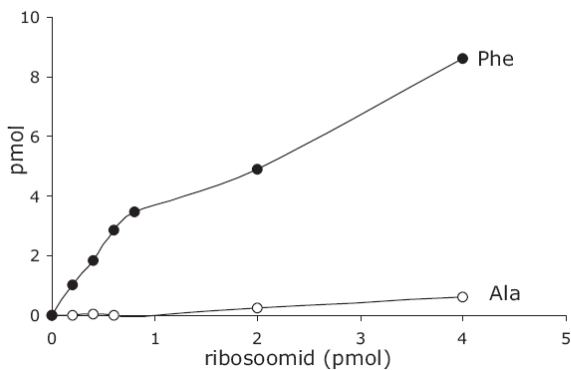
tRNA^{Ala} vahendatudalaniini lülitumine peptiidahelasse isegi parem kui valiini lülitumine (joonis 11A). Kokkuvõtvalt saab öelda, et võrreldes polü(Val) ja polü(Ala) sünteesiga (joonis 10), takistab kotranslatsioon valiini lülitumist ja soodustabalaniini lülitumist polüpeptiidi.

Kotranslatsioonil, kuhu lisati 28 pmooli [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ja 28 pmooli [³H]Val-tRNA^{Ala}, oli suboptimaalsetel ribosoomi kontsentratsioonidel valiini lülitumine polü(PheVal)-ahelasse takistatud (joonis 12A). Mida väiksem on aminoatsüül-tRNA konkurents ribosoomidele, seda paremini lülitub valiin polüpeptiidi. Joonisel 12D on näidatud, et Phe/Val suhe peptiidis langeb ribosoomide kontsentratsiooni kasvades. Ribosoomide küllastuskontsentratsioonil lülitub polü(PheVal)-peptiidi 7% reaktsioonisegus olevast valiinist ja 30% fenüülalaniinist, seega fenüülalaniini polümerisatsiooni kotranslatsioon ei mõjuta. Küll aga on võrreldes polü(Val) translatsiooniga, kotranslatsioonil pärsitud valiini lülitumine peptiidi (joonised 10 ja 12). Sarnased kotranslatsiooni katsed tehti ka tRNA^{Val} ga (joonis 12C). Phe lülitus madalatel ribosoomikontsentratsioonidel eelistatult, seega konkureerib Phe-tRNA Val-tRNA välja mõlemal juhul. Käesolevas töös on Phe-tRNA^{Val} ja Phe-tRNA^{Ala} aminoatsüleerimiseks kasutatud PheRS suhtes rikastatud ensüümifraktsiooni ja Val-tRNA on aminoatsüleeritud puhastatud ValRS`ga. Kontrolliti, kas erinevad aminohappe ligeerimise tingimused võivad mõjutada kotranslatsiooni tulemusi. Joonisel 12B on näha, et [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ja [³H]Val-tRNA^{Ala} kotranslatsioonis erinevad aminoatsüleerimise tingimused kotranslatsiooni tulemust ei mõjutanud.



Joonis 12. Polü(GUU)₄₈ sõltuv fenüülalaniini ja valiini kopolümeerisatsioon. 70S·polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud küllastuskontsentratsioonil elongatsioonifaktoreid ja võrdses suhtes: (A) [³H]Val-tRNA^{Ala} (■) ja [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} (□); (B) [³H]Val-tRNA^{Ala} (◆) ja puhastatud PheRS' ga aminoatsüleeritud [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} (◇); (C) [³H]Val-tRNA^{Val} (●) ja [¹⁴C]Phe-tRNA^{Val} (○). [³H]Val eriaktiivsus on 700 dpm/pmol, [¹⁴C]Phe 1000 dpm/pmol. (D) [³H]Val ja [¹⁴C]Phe suhe polüpeptiidis kui aminohappe kandjaks on tRNA^{Ala} (□, ◇) või tRNA^{Val} (●, ○).

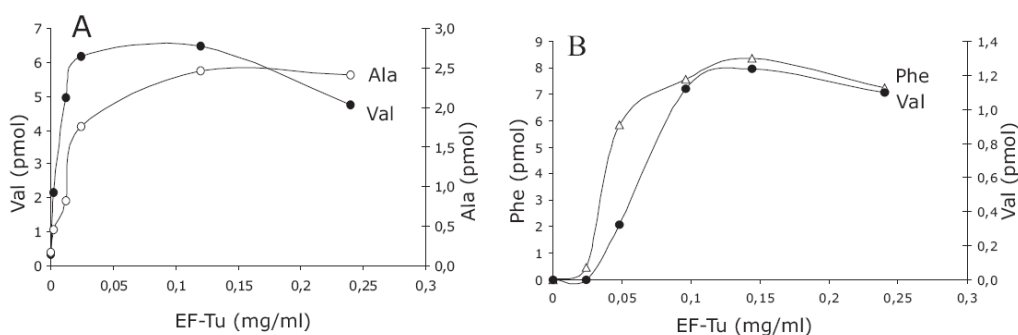
Sarnaselt eelpool kirjeldatud kotranslatsioonil, kuhu lisati 28 pmooli [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ja 28 pmooli [³H]Ala-tRNA^{Ala}, Ala lülitumine peptiidi takistatud (joonis 13). Alaniini ei lülitunud peptiidi ka konkurentsi nõrgenedes ribosoomi A-saiti. Seega on alaniin väga nõrk konkurent fenüülalaniinile. Viimane lülitus kotranslatsioonil peptiidi sama hästi kui üksi transleerides (joonis 13 ja 10).



Joonis 13. Polü(GUU)₄₈ sõltuv fenüülalaniini ja alaniini kopolümeerisatsioon. 70S·polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud küllastuskontsentratsioonil elongatsioonifaktoreid ja võrdses suhtes [³H]Ala-tRNA^{Ala} (●) ja [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} (○). [¹⁴C]Phe eriaktiivsus on 1000 dpm/pmol, [³H]Ala 2000 dpm/pmol.

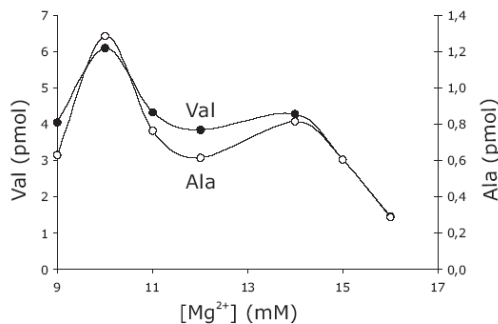
Käesolevate kotranslatsiooni katsete järgi ei olene aminohapete vaheline konkurents aminohappe kandjast e tRNAst, vaid aminohappejärgist. Translatsiooni ning kotranslatsiooni katsete kokkevõtteks saab öelda, et fenüülalaniin on ribosoomidele parim substraat, järgneb valiin ja nõrgim substraat onalaniin.

Kontrolliti kas ühe aminohappe eelistamist kopolümerisatsioonil võib mõjutada vastava aa-tRNA seundumine EF-Tu`ga. Optimaalses koguses 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile lisati peptiidi elongatsiooniks võrdses koguses [¹⁴C]Phe-tRNA^{Val} (või [¹⁴C]Ala-tRNA^{Val}) ja [³H]Val-tRNA^{Val} koos EF-Ts, EF-G ja GTPga ning tiitriti EF-Tu`ga. Katsetest nähtub, et madalatel EF-Tu kontsentratsioonidel lülitub peptiidahelasse eelistatult fenüülalaniin valiini ja valiinalaniini ees, kotranslatsioonikatsetes kasutatud EF-Tu küllastuskontsentratsioon (0,12 mg/ml) aga konkurentsi kahe aminohappe vahel ei mõjuta (joonis 14).



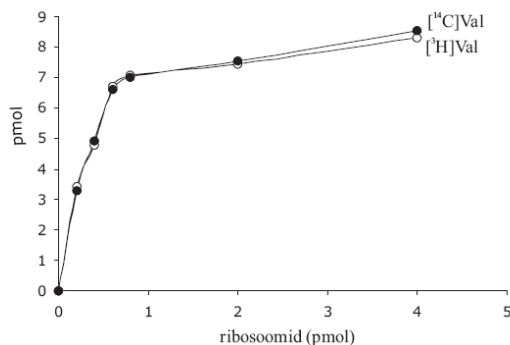
Joonis 14. EF-Tu kontsentratsioonist sõltuv polü(GUU)₄₈ sõltuv translatsioon. Küllastuskontsentratsioonil 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud elongatsioonifaktoreid, GTP ning (A) [³H]Val-tRNA^{Ala} ja [¹⁴C]Ala-tRNA^{Ala}; (B) [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ja [³H]Val-tRNA^{Ala}.

Ternaarse kompleksi esialgne seundumine ribosoomi A-saiti on sõltuv Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist. Selleks, et kontrollida kas selektsioon kahe aa-tRNA vahel toimub ternaarse kompleksi seundumisel, muudeti kotranslatsioonil Mg²⁺ ionide kontsentratsiooni. Joonisel 15 kujutatud kontrollkatse, kus on näha, et [¹⁴C]Ala-tRNA^{Val} ja [³H]Val-tRNA^{Val} kotranslatsioonil ei muutu Val/Ala suhe polüpeptiidis oluliselt Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonil vahemikus 9-16 mM.

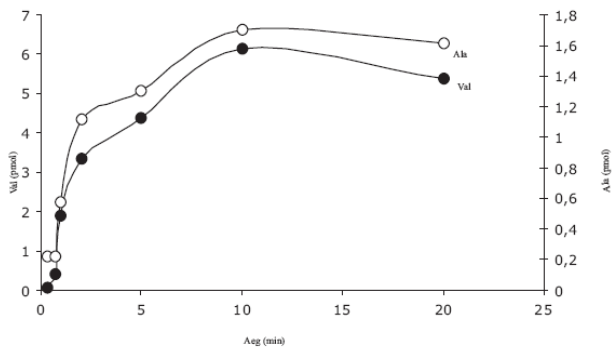


Joonis 15. Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist sõltuv polü(GUU)₄₈ juhitud translatsioon. Translatsioonisegus on 70S-polü(GUU)₄₈, elongatsioonifaktoreid, GTP ning võrdses koguses [³H]Val-tRNA^{Val} ja [¹⁴C]Phe-tRNA^{Val}

Konkurentsi toimumise kontrolliks, tehti ka [¹⁴C]Ala-tRNA^{Val} ja [³H]Val-tRNA^{Val} kotranslatsioonikatsed, kus on näha, Val/Ala suhe tekkinud polüpeptiidis ei sõltu radioaktiivsest märgisest (joonis 16) ega ajast (joonis 17). Viimane on kinnituseks, et aminohapped lülituvad samasse peptiidahelasse.



Joonis 16. Ribosoomi hulgast sõltuv kahe radioaktiivse märgie võrdlev lülitumine polüpeptiidi kotranslatsioonil. 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud elongatsioonifaktoreid, GTP ning võrdses koguses [³H]Val-tRNA^{Ala} ja [¹⁴C]Val-tRNA^{Ala}.



Joonis 17. Polü(GUU)₄₈ sõltuv kotranslatsiooni sõltuvus ajast. Küllastuskontsentratsioonil 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile on lisatud elongatsioonifaktoreid, GTP ning võrdses koguses [³H]Val-tRNA^{Ala} ja [¹⁴C]Ala-tRNA^{Ala}

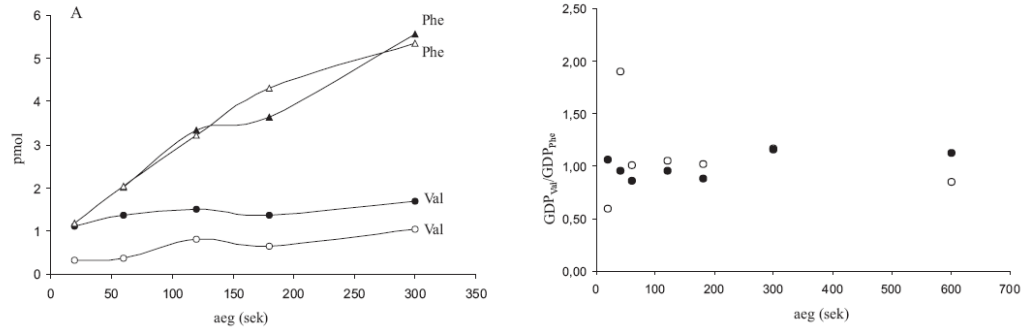
3.2.4. GTPaasi reaktsioon

Kotranslatsioonikatsed käesolevas töös näitasid, et kaks aminohapet konkureerivad koha eest peptiidahelas. Aminoatsüül-tRNA seondub ribosoomi A-saiti kolmikkompleksis EF-Tu ja GTPga. Mittekognaatse aa-tRNA diskrimineerimine ternaarse kompleksi esialgsel seandumisel ribosoomile sõltub Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonist. Lähikognaatse aa-tRNA diskrimineerimine toimub peale EF-Tu·GTP hüdrolüüsi aa-tRNA seandumisel ribosoomi A-saiti. Kuna eelnevad kontrollkatsed näitasid, et Val ja Ala suhe polüpeptiidis ei sõltu Mg^{2+} -ioonide sisaldusest, siis võiks aminohappe jäägil olla tähtsus *proofreadingus*.

GTP hüdrolüüsitaseme määramiseks translatsioonikatses inkubeeriti EF-Tu(GDP) kompleksi nukleotiidi vahetuseks koos [3H]GTP-, fosfoenoolpüruvaadi- ja püruvaatkinaasiga. EF-Tu([3H]GTP) seoti 20 pmooli [3H]Val-tRNA^{Ala} (või [^{14}C]Phe-tRNA^{Ala}) ning segule lisati suboptimaalses koguses 70S·polü(GUU) koos küllastuskoguses EF-G ja GTP'ga. Kotranslatsioonikatseteks lisati võrdses koguses (20 pmooli) [^{14}C]Phe-tRNA^{Ala} (või [3H]Phe-tRNA^{Ala}) koos EF-Tu ja märkimata GTP'ga. Mõõdeti ajas muutuvat GTP hüdrolüüsi taset. Radioaktiivse märkega [3H]GDP ja [3H]GTP fraktsioonid lahutati õhukese kihiga kromatograafia meetodil PEI-tselluloosil.

GTP hüdrolüüsitaset iseloomustati polü(Val) sünteesi käigus tekkinud [3H]GDP hulga ja polü(Phe) sünteesil tekkinud [3H]GDP hulga võrdlemisel. Polü(ValPhe) kopeptiidi nii valiini kui fenüülalaniini lülitamiseks kulunud GTP hulk arvestati kotranslatsioonide võrdlemisel: võrreldi Val-tRNA^{Ala}·EF-Tu·[3H]GTP kompleksi sisaldavas kotranslatsioonis ja Phe-tRNA^{Ala}·EF-Tu·[3H]GTP kompleksiga kotranslatsioonil tekkinud [3H]GDP hulka.

Joonisel 18B on translatsioonikatsete tulemused, kus selgub, et nii polü(Val) kui polü(Phe)-ahela sünteesil toimub EF-Tu'ga seotud GTP hüdrolüüs samaväärsel tasemel ($[^3H]GDP_{Val}/[^3H]GDP_{Phe} = 0,8-1,0$). Kotranslatsioonil tõuseb polü(ValPhe) ahelasse valiini lülitamiseks kasutatav GTP hulk tõuseb ($[^3H]GDP_{Val}/[^3H]GDP_{Phe} = 1,0-1,2$). **Joonisel 18 A** toodud katsetest paistab, et samal ajal langeb kotranslatsioonil 2-4 korda valiini lülitumine polüpeptiid-ahelasse võrreldes polü(Val) sünteesiga. Seega võib öelda, et seleksioon kahe aminohappe vahel toimub tõenäoliselt peale GTP hüdrolüüsi, eeldatavalt *proofreadingu* käigus.



Joonis 18. (A) Valiini ja fenüülalaniini lülitumine polüpeptiidi polü(GUU)₄₈ sõltuval translatsioonil ja kotranslatsioonil. Suboptimaalses koguses 70S-polü(GUU)₄₈ kompleksile EF-G ja GTP'ga lisati koos EF-Tu·GTP'ga [³H]Val-tRNA^{Ala} (●) või [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} (▲). Kotranslatsioonireaktsiooni lisati võrdses koguses [³H]Val-tRNA^{Ala} (○) ja [¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} (Δ).

(B) GTP hüdrolüüsitamise võrdlus translatsioonil ja kotranslatsioonil. Translatsioonil polü(Val) ahela sünteesil tekkinud GDP hulka võrdlus polü(Phe) ahela sünteesil tekkinu GDP hulgaga (●).

Kahel eraldi kotranslatsiooni (EF-Tu·(³H)GTP)·³H]Val-tRNA^{Ala} ja EF-Tu·(GTP)·¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ning EF-Tu·(³H)GTP)·¹⁴C]Phe-tRNA^{Ala} ja EF-Tu·(GTP)·³H]Val-tRNA^{Ala}) tekkinud GDP hulga võrdlus (○).

4. ARUTELU

4.1. tRNA^{Val} A76G asenduse funktsionaalne tähtsus ribosomaalsel translatsioonil

Käesolevas töös esimeses osas me analüüsisime tRNA universaalselt konserveerunud 3'-otsa viimase nukleotiidi (A76) funktsionaalset tähtsus ribosomaalsel *in vitro* translatsioonil.

Katsetes kasutati sünteetilisi - *in vitro* transkribeeritud modifitseerimata alustega tRNA^{Val} (antikoodoniga A34-A35-C36). Modifitseerimata alustega tRNAd olid *Thermus thermophilus*'e ValRS poolt äratuntavad ja aminoatsüleeritavad, mis on kooskõlas ka varem avaldatud andmetega (*Liu ja Horowitz 1994*). Arvatavasti võimaldas *Thermus thermophilus*'e ValRS jaoks vajalik kõrge optimaalne aminoatsüleerimise temperatuur (56°C) ületada mutantse tRNA^{Val} seondumisbarjääri ja aminoatsüleerida tRNA variant G76 70% ulatuses võrreldes A76 variandiga.

Varem on näidatud, et tRNA^{Val} 3'-CCA asendused mõjutavad doonoraktiivsust peptidüültransferaasireaktsioonis (*Tamura 1994*) ja polüpeptiidi polümerisatsioonil (*Liu ja Horowitz 1994*). Pürimidiinaluste asendused A76C ja A76U vaatamata heale aminoatsüleerimisele aminohappe polümerisatsioonil ei osale (*Liu ja Horowitz 1994; Tamura 1994*). Translatsiooniaktiivsuse vähenemise üheks põhjuseks on peetud mutantse aa-tRNA ja EF-Tu vahelise afiinsuse vähenemist (*Liu et al 1998*).

Käesolevas töös mõõtsime valiini polümerisatsiooni taset ribosomaalsel translatsioonil, kus reaktsioonisegus olid 70S ribosoomid, polü(GUA)₄₄ mRNA ja puhastatud aa-tRNA'd koos küllastuskoguses elongatsioonifaktoritega. Val-tRNA^{Val} variant G76 oli inaktiivne polü(GUA) sõltuval valiini polümerisatsioonil kui ta oli ainus katsesse lisatud substraat (**joonis 2**). Järelikult mõjutab tRNA 3'-otsa mutatsioon ribosomaalset *in vitro* translatsiooni. Mõningane Val-tRNA^{Val} variandi G76 vahendatud valiini lülitamine peptiidi toimus vaid translatsioonil koos natiivse Val-tRNA^{tot} (**joonis 1B**) ja Ser-tRNA^{tot} ga (**joonised 3 ja 4**). Samal ajal takistab Val-tRNA^{Val} variandi G76 lisamine translatsioonisegusse Val-tRNA^{tot} ja Val-tRNA^{Val} vahendatud polü(Val)-ahela sünteesi ning deatsüül-tRNA variant G76 mõju ei avalda (**joonis 4**). tRNA'le iseloomulike modifikatsioonide puudumine mõjutas ka tRNA variandi A76 *in vitro* translatsiooni aktiivsust. *In vitro* transkribeeritud Val-tRNA^{Val} variant A76 polümeriseeris valiini ligikaudu poole kehvemini kui natiivne Val-tRNA^{tot}

(**joonis 2**). Vaatamata Val-tRNA^{Val} variandi G76 inaktiivsusele peptiidahela elongatsioonil, oli otse ribosoomi P-saiti seotud NAcVal-tRNA^{Val} variant G76 võimeline osalema translatsioonil initsiaatorina (**joonis 5B**).

Peptiidahela elongatsioonil toimivas peptidüültransferaasireaktsioonis osalevad tRNA'd nii peptidüüljäägi aktseptori- kui doonorina. Ribosoomi substraatide aktseptor- ja doonoraktiivsuse uurimine dipeptiidi katses näitas, et mutatsioon A76G Val-tRNA^{Val} aktseptoraktiivsust ei mõjutanud (**joonised 7A ja 7B**). Seevastu oli alanenud peptidüül-tRNA analoogi NAcVal-tRNA^{Val} variandi G76 doonoraktiivsus võrreldes nii natiivse Val-tRNA^{tot} ga kui *in vitro* transkribeeritud Val-tRNA^{Val} variandiga A76 (**joonised 6A ja 6B**).

Doonoraktiivsuse langus võib olla seotud mutantse peptidüül-tRNA analoogi ebakorrekse või ebastabiilse seondumisega ribosoomi P-saiti. Meie töös mutatsioon A76G Val-tRNA^{Val} seondumist 70S ribosoomi A-saiti ei mõjutanud (**Lisa 2**). NAcVal-tRNA^{Val} variandi G76 seondumine ribosoomi P-saiti oli aga võrreldes variandiga A76 vähenenud 20%. Dipeptiidi katses testitud NAcVal-tRNA^{Val} variandi G76 doonoraktiivsuse langus võis olla seotud mutantse substraadi vähenenud seondumisega ribosoomi P-saiti.

Mutantse tRNA doonoraktiivsuse langus dipeptiidikatses ei olnud piisav, et seletada inaktiivsust polüpeptiidi sünteesil. EF-G sõltuvate translokatsioonikatsete tulemused näitasid, et tRNA A76G asendus ei takista mutantse deatsüleeritud tRNA^{Val} lahkumist ribosoomi P-saidist (**joonis 8**), kuid inhibeerib oluliselt NAcVal-tRNA^{Val} EF-G sõltuvat liikumist ribosoomi A-saidist P-saiti (**joonised 9A ja 9B**).

Deatsüleeritud tRNA seondumine ribosoomi E-saiti on 3'-CCA otsast sõltuv. Ribosoomi E-saidis olev deatsüleeritud tRNA terminaalne A76 interakteerub 23S rRNA A2394 (*Bocchetta et al 2001*), A2394' ga seotud valguga L33 (*Wower et al 2000*) ning A2422 (*Schmeing et al 2003*). Seni on teada, et deatsüleeritud tRNA^{Phe} terminaalse A76 deleteerimine või modifitseerimine (sh A76G) vähendab tRNA seondumist E-saiti üle 100 korra ja 2'- või 3'-OH asendused ligi 40 korda (*Lill et al 1989*). Käesolevas töös ei saa me hinnata deatsüleeritud tRNA^{Val} seondumist E-saiti ja ei tea kas mutantne deatsüleeritud tRNA translokeerub ribosoomi E-saiti või irdub ribosoomilt terminaalse mutatsiooni tõttu destabiliseeritud E-saiti seondumise tõttu. **Joonisel 8** toodud translokatsioonikatse tulemustest näeme, et mutantne deatsüleeritud tRNA lahku EF-G sõltuval translokatsioonil ribosoomi P-saidist ja ei takista

NACVal-tRNA seondumist ribosoomi A-saiti ega viimase EF-G sõltuvat translokatsiooni ja reaktsiooni puromütsiiniga.

Terminaalise mutatsiooniga peptidüül-tRNA analoogi NACVal-tRNA liikumine ribosoomi A-saidist P-saiti oli temperatuuril 0°C täielikult inhibeeritud ja temperatuuril 37°C oluliselt pärsitud (joonised 9A ja 9B). Teadaolevalt fikseeritakse ribosoomi A-ja P-saidis olev tRNA 3'-CCA suure subühiku 23S rRNA alustega. Ribosoomi P-saidi substraadi C74 aluspaardub 23S rRNA G2252 (*Samaha et al 1995*) ja A76 vesiniksidemega A2450 ning stäkkub A2451`ga (*Nissen et al 2000*). Ribosoomi A-saidi substraadi C75 aluspaardub 23S rRNA alusega G2553 (*Kim ja Green 1999*). Kuna ribosoomi 50S subühiku P-saidil on peptidüüljäägi suhtes suurem afiinsus kui A-saidil, peaks toimuma NACVal-tRNA^{Val} seondumine või spontaanne liikumine ribosoomi A/P saiti (*Moazed ja Noller 1989b; Blanchard ja Puglisi 2001*). Kuna EF-G substraadiks on aga pretranslokatsiooniline hübriidsaitidega ribosoom (*Semenkov et al 2000*), siis on võimalik, et translokatsiooni võis inhibeerida A76G asendusega NACVal-tRNA^{Val} võimetus liikuda 50S subühikus P-saiti. Sellele vaatamata reageerisid nii mutantne kui intaktne NACVal-tRNA^{Val} EF-G sõltumatul translokatsioonil puromütsiiniga peaaegu võrdsel tasemel (joonis 9A), mis võib olla tingitud osalisest seondumisest P/P saiti või seondumisest nn "puromütsiinireaktiivsesse" A/P* saiti (*Sharma et al 2004*).

Translokatsiooni võivad takistada mutantse tRNA põhjustatud ebasobivad interaktsioonid, mis ei võimalda translokatsiooniks vajalikke konformatsioonimuut. *Haloarcula marismortui* kristallstruktuur näitas, et ribosoomi 50S subühiku 23S rRNA alused A2602 ja U2585 positsioneeruvad A-saidi ja P-saidi tRNA 3'-CCA otste vahele (*Nissen et al 2000*). U2585 on vaid vesiniksideme kaugusel terminaalise A76 2-hüdroksüülgrupist (*Schmeing et al 2002?*), kuid arvatakse, et seostub aminohappega ja suunab selle liikumist (*Agmon et al 2004*). A2602 on peptidüültransferaasi nukleotiid, mis liigub kõige rohkem substraatide seondumistel ja võtab aktiivselt osa substraadi 3'-CCA liigutamisel ribosoomi A-saidist P-saiti (*Bashan et al 2003; Agmon et al 2004*). Mesofiilse eubakteri *Deinococcus radiodurans* kristallstruktuur tRNA aktseptorheeliksi- ja 3'-CCA-otsaga näitasid, et tRNA liikumisel peptidüültransferaasi- ja translokatsioonikäigus ribosoomi A-saidist P-saiti, liigub 3'-CCA ots ühtlasi spiraalselt ümber fosfodiesterideme (*Bashan et al 2003*). Ribosoomi A-ja P-saidi substraatide 3'-CCA otste vahel olev A2602 assisteerib arvatavasti spiraalset liikumist nii peptidüültransferaasi käigus kui liikumisel A-saidist P-saiti (*Bashan et al 2003*).

Translokeeruva tRNA terminaalne A76 puutub liikudes kokku mitmete ribosoomi aktiivtsentri alustega. Bashan jt tRNA kahesuunalise ja spiraalse liikumise mudeli järgi võiks tRNA mutatsioonide põhjustatud seondumisgeomeetria muutus liikumist takistada. Tulemuseks võib olla peptiidsideme moodustumine kuid mitte translokatsioon. Seda, et tRNA translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti takistavad A76 modifikatsioonid on näidatud ka varasemalt. Mõningatel andmetel translokatsiooni ei toimu kui A-saidi tRNA A76 2'-hüdrosüülgrupp on deoksüleeritud (*Wagner ja Sprinzl, 1980; Feinberg ja Joseph 2001*). Samas on näidatud ka, et 2'-H ei muuda tRNA seondumist ribosoomi A-saiti ega takista translokatsiooni (*Weinger et al 2004*).

On näidatud, et mutatsioonid tRNA 3'CCA otsas võivad põhjustada raaminihet. Näiteks *E.coli* tRNA₁^{Val} mutatsioonid C74G ja C74A nii E- kui P-saidi substraadil põhjustavad -1 raaminihet (*O'Connor et al 1993*). Raaminihke sagedus sõltub ka antikoodoni modifitseeritusest (*Yarian et al 2002*). Kontrolliti kas A76G asenduse tõttu 23S rRNA ja tRNA vaheliste interaktsioonide muutumine võib põhjustada koodon-antikoodonkompleksis paardumishäireid ja vale koodoni lugemist ribosoomi A-saidis. **Joonistel 3 ja 4** toodud tulemustest selgub, et nii Val-tRNA^{Val} variant A76 kui G76 stimuleerivad seriini lülitumist p(GUA) suunatud translatsioonisüsteemis. Kui Ser-tRNA^{tot} on ainus substraat, siis seriini polümerisatsioonitase on väga madal. Võimalik seletus siin on, et Ser-tRNA ei ole võimeline sünteesi alustama. On võimalik, et Val-tRNA toimib kotranslatsioonil initsiaatorina, kusjuures toimub suure sagedusega raaminihe, mis võimaldab ribosoomidel polüseriini sünteesida.

Kokkuvõtvalt, A76G mutatsiooniga aa-tRNA ei osale elongatsioonil kuna 3'-CCG takistab NAcVal-tRNA stabiilset seondumist ribosoomi P-saiti ja seeläbi P-saidi substraadi doonoraktiivsust peptidüültransferaasireaktsioonis. Eelkõige takistab aga tRNA A76G asendus peptidüül-tRNA EF-G sõltuvat translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti kas ebasobivate interaktsioonide tõttu peptidüültransferaasitsentris või EF-G võimetuse tõttu tunda ära pretranslokatsioonilist ribosoomi.

4.2 Aminohappe osa multifunktsionaalsete aa-tRNA selektsioonil

Käesoleva töö teises osas me uurisime aminohappejäägi mõju ribosomaalse translatsiooni käigus toimival aa-tRNA selektsioonil. *In vitro* transkribeeritud *E.coli*

tRNA^{Val}, *E. coli* tRNA^{Ala} ja pärmi tRNA^{Phe} sisaldavad G3:U70 aluspaari tRNA aktseptorheeliksis ja valiini koodonitele GUC ja GUU vastavat antikoodonit G34-A35-C36. Tänu sarnasele antikoodonile aktsepteerib ribosoom neid tRNAsid kui kognaatseid mRNA polü(GUU)₄₈ sõltuval translatsioonil. Kahe erineva aminohappega laetud aa-tRNAga kotranslatsioon võimaldab uurida võimalikku aminohappejäagi osa aa-tRNA selektsioonil ja peptiidsideme tekkel.

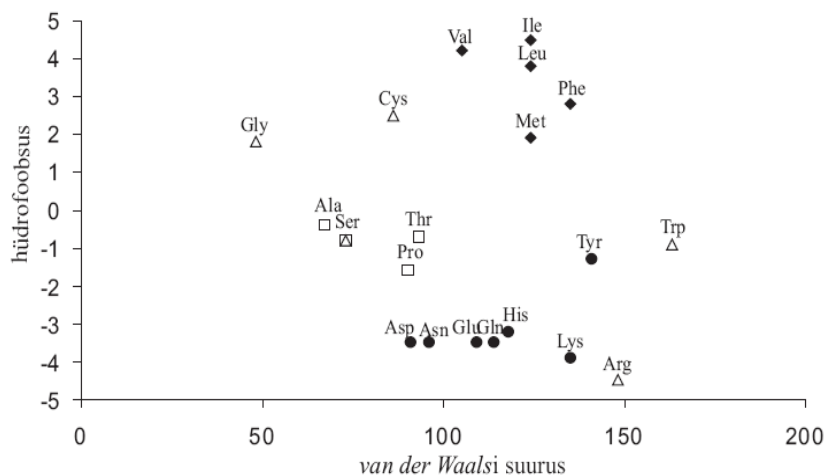
Renatureeritud *in vitro* transkribeeritud tRNAd aminoatsüleeriti vastavate puhastatud aminoatsüül-tRNA süntetaasidega. Kõik eelnevalt aminoatsüleeritud aa-tRNAd osalesid polü(GUU) sõltuval aminohappe polümerisatsioonil (joonis 10). Peptiidi lülitatud aminohappe hulk ei sõltunud niivõrd aminohapet kandvast tRNAST kui võrd aminohappejäagist (joonis 10 vertikaalsed tulbad vs horisontaalsed read). Kahe aminohappe vahelise konkurentsi uurimuseks aa-tRNA selektsioonil, lisati translatsioonisegusse võrdses koguses kahe erineva aminohappega aminoatsüleeritud aa-tRNA ning vaadeldi aminohapete lülitumist peptidahelasse ribosoomide suboptimaalse koguse juures. Kotranslatsiooni tulemused näitasid, et ribosoom eelistab substraadina üht aminohapet teisele – Phe>Val>Ala (joonised 11-13). Kahe aminohappe kotranslatsioonil oli madalal ribosoomi kontsentratsioonil e konkurentsi tingimustes eelistatud fenüülalaniini lülitumine polüpeptiidi valiini jaalaniini ees (joonised 12 ja 13) ja valiini lülituminealaniini ees (joonis 11). Fenüülalaniini pärssis valiini lülitumist polüpeptiidi ka ribosoomi küllastuskontsentratsioonil, valiinialaniini lülitumist mitte .

Ribosoomi aa-tRNA selektiivsus (Phe>Val>Ala) läheb kokku seni uuritud A-saiti substraatide aktiivsusega peptidüültransferaasis. Eelnevalt on näidatud, et aromaatsete aminohapete derivaadid - A-Tyr ja A-Phe - on peptidüültransferaasis kõige tugevamad aktseptorsubstraadid. Järgnevad A-Ser, A-Leu, A-Met, A-Glu, A-Pro, A-Val ja aktseptoraktiivsus puudub A-Gly ja A-Trp (*Chladek ja Sprinzl 1985; Krayevsky ja Kukhanova 1979*).

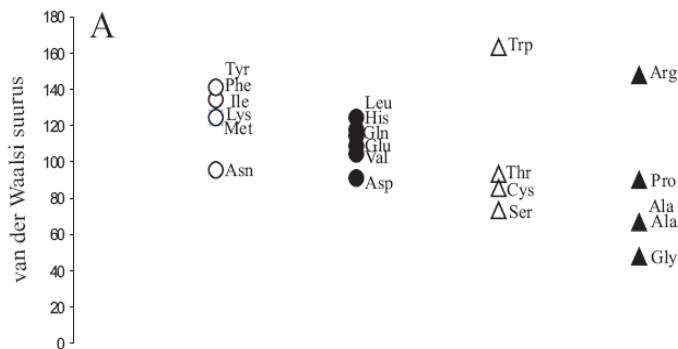
Suuruse ja reaktiivsuse poolest erinevad aminohapped selekteerib ribosoom koodon-antikoodon paardumise järgi. Käesoleva töö tulemus, et Phe lülitub polüpeptiidi eelistatult võrreldes Val ja Ala'ga ja Val eelistatult võrreldes Ala'ga, korreleerub G ja C sisaldusega vastava aminohappe koodonis. Seega ühe aminohappe eelistamine toimub aa-tRNA A-saiti seondumise või peptiidsideme tekke tasemel. Arvestades seost aminohappe aktseptoraktiivsuse ja termodünaamiliselt stabiilsemate G-C paaride arvu vahel koodon-antikoodon dupleksis pakkusid Remme jt (*Remme ja*

Villems 1985) välja hüpoteesi, mille järgi korreleeruvad koodoni koostis ja aminohapejäägi reaktiivsus nii, et aa-tRNA dissotsiooni ja peptidültransferaase reaktsiooni kiiruste suhe on jääv. G-C paaride stabiilsuse tõttu viibivad vähem reaktiivsemad aminohapped pikemat aega kohas kus saab tekkida peptiidside. Hiljuti avaldatud uurimus aa-tRNA seondumisest ribosoomi A- ja P-saiti kinnitab, et vaatamata aminohapete reaktiivsuse ja suuruse erinevusele, seonduvad aminoatsüül-tRNA'd mõlemasse ribosoomi saiti ühetaoliselt (Fahlmann ja Uhlenbeck 2004; Fahlmann et al 2004)

Aminohappe omadusi ja vastava koodoni vahelist korrellatsiooni uurides on leitud seos aminohappe koodoni ning aminohappe hüdrofoobsuse ja suuruse vahel. Märkimisväärselt tugev seos on koodoni kahe esimese (eriti keskmise) aluspaari ja aminohappe hüdrofoobsuse vahel. Kõige hüdrofiilsemate aminohapete koodoni teises positsioonis on eelistatult A ja hüdrofoobsematel U nukleotiid (Lehmann 2000) (joonis 19). Keskmiselt hüdrofoobsetel aminohapetel on kas G või C. Korrellatsioon koodoni teise positsiooni ja aminohappe hüdrofoobsuse vahel seostub hästi seaduspäraga, et *E.coli* enamikel aa-tRNA süntetaasidel (va AlaRS ja SerRS) on identsuselemendiks antikoodonis keskmises, 35. positsioonis, olev alus (Giege et al 1998) ja aminohappe hüdrofoobsus on oluline füüsikaline omadus, mis mõjutab AARS selektsiooni (Fukai et al 2000).



Joonis 19 Seos aminohappe hüdrofoobsuse ja van der Waalsi suuruse ning aminohappele vastava koodoni keskmises positsioonis oleva aluse vahel. Joonisel on märgitud koodoni keskmises positsioonis olev N-alus: (●)-A; (◆)-U; (□)-C; (Δ)-G.



Joonis 20. Seos aminohappe van der Waalsi suuruse ning G-C paaride arvuga koodon-antikoodon heeleksis. Aminohapetele vastavad koodonid on tähistatud järgmiselt: ○puudub G/C koodoni 1. ja 2. positsioonis; ●- G/C on koodoni 1. positsioonis; △-G/C on koodoni 2. positsioonis; ▲- G/C on 1. ja 2. positsioonis.

Käesoleva töö tulemustega haakub märkimisväärselt **joonisel 20** näidatud korrellatsioon aminohappe suurust iseloomustava *van der Waalsi* suuruse ja G-C aluste vahel koodoni kahes esimeses positsioonis. Välja arvatud mõned erandid – Arg, Trp ja Asn - on tugev seos just koodoni G-C sageduse ja aminohappe suuruse, mitte aga aminohappe füüsikalise-keemiliste omaduste (polaarsuse-, hüdrofoobsuse- jm) vahel. Nõrga aktseptoraktiivsusega ja G-C rikka koodoniga aminohapped on väikesed (Ala, Pro, Gly, Val) (*Chladek ja Sprinzl 1985; Krayevsky ja Kukhanova 197; Remme ja Villems 1985*) ja lühikese biosünteesirajaga e evolutsiooniliselt vanemad (Ala, Gly, Ser, Asp, Glu) (*Klipcan 2004*). Kõrgema aktseptoraktiivsusega Phe, Lys ja Tyr on samas ühed suuremad aminohapped. Ribosoomi peptidüültransferaasitsentris (PTC) on hüdrofoobne tasku, mis stabiliseerib aromaatsete külghelatega aminohapete (Phe, Tyr, Trp) sidumist. Väiksemad aminohapped moodustavad PTC` s vähem kontakte, kuid G-C paarid on stabiilsemad kui A-U paarid seepärast suurem arv G-C paare koodon-antikoodon dupleksis stabiliseerib aminohappe madalamat reaktiivsust ribosoomi A-saidis.

Seni on väidetud, et ühe või teise misatsüleeritud tRNA madalam aktiivsus peptidüültransferaasis võib olla seotud muutusega seondumisel ternaarse kompleksiga (*LaRiviere et al 2001; Wagner 1980; Liu et al 1998*). Vaatamata suurtele erinevustele tRNA- ja aminoatsüüljääkide struktuuris, seonduvad kognaatsed aa-tRNA EF-Tule sarnaselt (*LaRiviere et al 2001*). EF-Tu seondub aa-tRNA aktseptorheeliksi 2´- hüdroksüüli- ja fosfaatidega ning T-heelikslinguga (*Nissen et al 1999*). EF-Tu seondumist tRNA^{Ala}, tRNA^{Val} kui tRNA^{Phe} ga ei mõjuta antikoodoni muutmine ega G3:U70 paar aktseptorheeliksis (*LaRiviere et al 2001*). EF-Tu seob kõige tugevamalt

tRNAsid, millele kognaatsed aminohapped on pisikesed - tRNA^{Ala}>tRNA^{Val}~tRNA^{Phe}>tRNA^{Gln}. Nõrgem tRNA seandumine kompenseeritakse tugevama aminohappe seandumisega. Käesoleva töö katsetes moodustunud ternaarse kompleksi dissotsiatsioonikonstandid viimatimainitud eksperimentide järgi on: Ala-tRNA^{Phe}>Ala-tRNA^{Val}>Val-tRNA^{Val}~Phe-tRNA^{Phe}>Phe-tRNA^{Val}~Val-tRNA^{Phe}>Ala-tRNA^{Ala}>Val-tRNA^{Ala}>Phe-tRNA^{Ala} (LaRiviere et al 2001). Meie katsed näitasid, et EF-Tu seob misatsüleeritud aa-tRNAsid selektiivselt ja konkurentsitingimustes (mitte piisaval EF-Tu kontsentratsioonil) seonduvad EF-Tu·GTP-ga eelistatult Phe-tRNA^{Val}>Val-tRNA^{Val}>Ala-tRNA^{Val} (joonis 14). EF-Tu ülehulga juures kahe misatsüleeritud aa-tRNA vahel konkurentsi pole. Meie tulemustes on samuti näha, et vaatamata väga suurele K_d erinevusele Ala-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP ja Val-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP vahel, lülitub kotranslatsioonil suboptimaalsetes tingimustesalaniin polüpeptiidi arvestataval tasemel (joonis 11) ja võimaliku kehvema seandumise tõttu ternaarse kompleksiga polealaniini lülitumine polüpeptiidi diskrimineeritud. Seega arvestades kotranslatsiooni lisatud EF-Tu kontsentratsiooni ei mõjuta labiilsema ternaarse kompleksi moodustumine kotranslatsiooni tulemusi meie katsesüsteemis.

Aa-tRNA seondub ribosoomile kolmikkompleksis EF-Tu ja GTPga ja dissotsieerub kui ei ole sobivust koodoni ja antikoodoni vahel (*aa-tRNA initsiaalne selektsioon*). Kognaatse või lähikognaatse antikoodoni seandumisel kompleks stabiliseeritakse, muutused 30S subühikus indutseerivad EF-Tu konformatsiooni muutuse ja GTP hüdrolyüsi. EF-Tu'lt vabanenud aa-tRNA 3'-ots saab liikuda peptidüültransferaasi tsentrisse. Kognaatse ja lähikognaatse aa-tRNA vahel toimub selektsioon (*proofreading*) peale GTP hüdrolyüsi ja enne akommodatsiooni ning peptiidsideme teket. Lähikognaatne aa-tRNA dissotsieerub ebastabiilsema koodon-antikoodon kompleksi tõttu tõenäolisemalt enne peptiidsideme teket. Tuginedes töös esitatud andmetele väidame, et peale koodon-antikoodon paardumisel põhineva kaheosalise, GTP hüdrolyüsiga eristatava aa-tRNA selektsiooni, on *proofreading* oluline osa ka aminohappel. On näidatud, et ternaarse kompleksi seandumine ja initsiaalne selektsiooni sõltub Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist, *proofreading* mitte (Pape et al; 1999). Meie katsetingimustes valiini jaalaniini vaheline konkureerimine ei sõltunud Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist (joonis 15) ja tõenäoliselt toimub ühe aa-tRNA diskrimineerimine peale GTP hüdrolyüsi. Valiini lülitamisel polü(Val) ja polü(ValPhe) peptiidi hüdrolyüsiti nii ühel kui teisel juhul ligikaudu sama palju GTP kui fenüülalaniini lülitamiseks polü(Phe) ja polü(ValPhe) (joonis 18). Vaatamata

ternaarse kompleksi seondumisele ja GTP hüdroolüüsile on valiini hulk polü(Val)-ahelas kaks korda kõrgem kui polü(ValPhe)-ahelas (Phe hulk mõlemal juhul sama) ja see annab tunnistust selektsiooni toimumisest peale GTP hüdroolüüsi *proofreadingus*.

Ribosoomi peptidüültransferaasse tsentri aminohappejäägi tasku peab aktsepteerima 20 või rohkem erineva reaktiivsuse- ja suurusega aminohappeid. Võimalik, aa-tRNA seondumisel toimub koodoni ja aminohappejäägi vahelise korrelatsiooni kontroll kognaatse ja misatsüleeritud aa-tRNA vahel ribosoomi A-saiti seondumisel *proofreadingu* käigus. Selline protsess võimaldaks vähendada vigu translatsioonil, kui kogemata misatsüleeritud aa-tRNA seondub EF-Tuga ja ternaarse kompleksi koosseisus ribosoomi A-saiti.

KOKKUVÕTE

tRNA terminaalne CCA järjestus interakteerub translatsioonikäigus ribosoomi 23S rRNA`ga. Käesolevas töös me uurisime tRNA viimase nukleotiidi tähtsust *in vitro* translatsioonil. Selleks võrdlesime *in vitro* transkribeeritud ja eelnevalt aminoatsüleeritud tRNA^{Val} ja terminaalse A76G asendusega tRNA^{Val} aktiivsust translatsiooni elongatsiooni etappidel. A76G asendusega Val-tRNA^{Val} oli inaktiivne polü(GUA) sõltuval polüpeptiidi sünteesil, kui mutantne tRNA oli ainus substraat. A76G asendusega tRNA^{Val} lülitas mõningal määral valiini polüpeptiidahelasse vaid koos metsik-tüüpi tRNAga. A76G asendusega tRNA^{Val} oli peptidültransferaasi reaktsioonis aktiivne nii aktseptori- kui doonorsustraadina. Võrreldes metsik-tüüpi tRNA`ga oli doonoraktiivsus kergelt langenud. Täielikult oli aga inhibeeritud ribosoomi A-saiti seotud NAcVal-tRNA^{Val} EF-G sõltuv translokatsioon ribosoomi A-saidist P-saiti.

Käesolevas töös uurisime samuti kui suurt osa mängib aminohape osa aminoatsüül-tRNA selektsioonil. Kolme erineva aminohappega (Phe, Val ja Ala) laetud multispetsiifilisi tRNAsid võrreldi paarikaupa *in vitro* translatsioonil. Kõik multispetsiifilised tRNAd oli aktiivsed polü(GUU) sõltuval translatsioonil. Sama tüüpi tRNA`le seotud kahe aminohappe polü(GUU) sõltuv võrdlev polümerisatsioon näitas, et kotranslatsioonil, ribosoomi limiteeriva kontsentratsiooni juures, lülitub üks aminohape polüpeptiidi eelistatult. Parimaks substraadiks ribosoomile on Phe, keskmiseks Val ning kõige nõrgemaks Ala. Aminohappe eelistus korreleerub G/C paaride arvuga koodon-antikoodon dupleksis st nõrgem aminohappe seondumine kompenseeritakse tugeva koodon-antikoodon interaktsiooniga. Kuna valiini lülitamine polüpeptiidi võrreldes fenüülalaniiniga, kulutab 2-3 korda rohkem GTP, siis arvatavasti toimub nõrgema aminohappega aa-tRNA diskrimineerimine peale EF-Tu-GTP hüdrolyüsi e kineetilise *proofreadingu* käigus.

SUMMARY

Universally conserved 3'-terminal CCA sequence of tRNA interacts with ribosomal 23S rRNA during translation. Functional importance of the interaction between last nucleotide of tRNA with ribosome was studied during translation *in vitro*. We have analyzed a mutant tRNA^{Val} where the 3'-terminal A is substituted by G. tRNA^{Val} variants were transcribed and aminoacylated *in vitro*. Translation of cognate codon as well as individual steps of elongation were analyzed. Val-tRNA variant G76 did not support polypeptide synthesis on poly(GUA) as a message. However, in a co-translation system where only a small fraction of Val-tRNA was mutant, the G76 variant of Val-tRNA^{Val} was able to incorporate the valine into peptides, albeit at a reduced level. Mutant tRNA was active both as a acceptor and a donor substrate of ribosomal peptidyltransferase. The donor activity of the peptidyl transfer reaction was found to be slightly reduced as compared to the wild-type tRNA. EF-G dependent translocation of peptidyl-tRNA from the ribosomal A-site to the P site did not occur when NAcVal-tRNA variant G76 was bound to the ribosomal A site.

In this paper we also have studied whether the nature of amino acid side chain plays a role during aa-tRNA selection on ribosomes. Importance of amino acid residue during ribosomal translation *in vitro* was studied by using three mutant tRNAs with triple amino acid specificity. Triple-specific tRNAs were charged by Ala, Phe, and Val. Competitive incorporation of two amino acids on the same tRNA species into peptides was determined. All aa-tRNAs were found to be active in ribosomal translation. The analysis of pair wise competition of aa-tRNAs during poly(GUU) translation have demonstrated - at limiting ribosome concentration, one amino acid was preferentially polymerized. These experiments demonstrated that Phe- is the best, Val- is intermediate, and Ala-tRNA is the weakest substrate for the ribosome. Comparison of the translational properties of amino acids and the G/C content of their native codons suggests that in the universal genetic code the “weak” amino acids are balanced by the G/C content of the corresponding codon-anticodon interaction. This suggests that the allocation of amino acids to the codons in the genetic code has a ribosomal rationale. The number of GTPs hydrolyzed on EF-Tu per peptide bond formation was higher with Val-tRNA as compared to Phe-tRNA. Thus, amino acid side chain affects aa-tRNA selection in proofreading step.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agmon, I., Amit, M., Auerbach, T., Bashan, A., Baram, D., Bartels, H., Berisio, R., Greenberg, I., Harms, J., Hansen, H.A.S., Kessler, M., Pyetan, E., Schuelzen, F., Sittner, A., Yonath, A., Zarivach, R.** (2004). Ribosomal cristallography: a flexible nucleotide anchoring tRNA translocation, facilitates peptide-bond formation, chirality discrimination and antibiotics synergism. *FEBS Letters* 567: 20-26.
- Agrawal, R., K., Spahn, C., M., T., Penczek, P., Grassucci, R., A., Nierhaus, K., H., Frank, J.** (2000) Visualization of tRNA movements on the Echerichia coli 70S ribosome during the elongation cycle. *The Journal of Cell Biology* 150: 447-459.
- Aid, T.** (2003) Aminohappe roll aminoatsüül-tRNA selektsioonil ribosoomil. *Bakalaureusetöö*, 54 lk.
- Arnes, J.G., Moras, D.** (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *TIBS*, 22: 211-216.
- Ashara H., Uhlenbeck, O. C.** (2002) The tRNA specificity of Thermus thermophilus EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3499-3504.
- 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.
- Bashan A., Agmon I., Zarivach R., Schluenzen F., Harms, J., Berisio, R., Bartels, H., Francesci, F., Auerbach, T., Hansen, H. A. S., Kossoy, E., Kessler, M., Yonath, A.** (2003) Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation and nascent chain progression. *Molecular Cell*, 11: 91-102.
- Boccheta, M., Xiong, L., Mankin, A.** (1998) 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3525-3530
- Boccheta, M., Xiong, L., Shah, S., Mankin, A. S.** (2001) Interaction between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal E site. *RNA* 7, 54-63.
- Boon, K., Vijgenboom, E., Madsen, L.V., Talens, A., Kraal, B., Bosch, L.** (1992) Isolation and functional analysis of histidine-tagged elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* 210, 177-83.
- Blanchard S., C., Puglisi J., D.** (2001) Solution structure of the A loop of 23S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3720-3725.

- Blanchard, S.C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L. Jr, Puglisi J.D., Chu S.** (2004) tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12893-12898.
- Cate, H. J., Yusupov, M. M., Yusupova G. Z., Earnest, T. N., Noller, H.F.** (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285: 2095-2104.
- Chladek, S., Sprinzl, M.** (1985) The 3'-end of tRNA and its role in protein biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24: 371-391.
- Clemons, W. M., May, J. L.C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., Ramakrishnan, V.** (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400: 833-840.
- Dabrowski, M., Spahn C. M., Schafer, M. A., Patzke, S., Nierhaus, K. H.** (1998) Protection patterns of tRNAs do not change during translocation. *J. of Biol. Chem.*, 273: 32793-32800.
- Dale, T., Sanderson, L. E., Uhlenbeck, O. C.** (2004) The affinity of elongation factor Tu for aminoacyl-tRNA is modulated by the esterified amino acid. *Biochemistry* 43, 6159-6166.
- Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J. J., Studier, F. W.** (1985). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2035-2039.
- Derrick, W., B., Horowitz, J.** (1993) Probing structural differences between native and *in vitro* transcribed *E. coli* valine transfer RNA: evidence for stable base modification-dependent conformers. *Nucleic Acid Research* 21: 4948-4953.
- Dorner, S., Polacek, N., Schulmeister, U., Panuschka, C., Barta.** (2002) Molecular aspects of ribosomal peptidyl transferase. *Biochemical Society Transaction*, 30, 6: 1131-1136.
- Fahlman, R. P., Dale, T., Uhlenbeck, O. C.** (2004) Uniform binding of aminoacylated transfer RNAs to the ribosomal A and P sites. *Mol. Cell* 16, 799-805.
- Fahlman, R. P., Uhlenbeck O. C.** (2004) Contribution of esterified amino acid to the binding of aminoacylated tRNAs to the ribosomal P- and A-sites. *Biochemistry* 43, 7575-7843.
- Feinberg, J. S., Joseph, S** (2001) Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11120-11125.

- Frank, J., Agrawal, R. K.** (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406: 318-322.
- Fukai, S., Nureiki, O., Sekine, S.-I., Shimada, A., Vassylyev, D. G., Yokoyama, S.** (2003) Mechanism of molecular interactions for tRNA^{Val} recognition by Valyl-tRNA synthetase. *RNA* 9: 100-111.
- Fukai, S., Nureiki, O., Sekine, S.-I., Shimada, A., Tao, J., Vassylyev, D. G., Yokoyama, S.** (2000) Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-Isoleucine and L-Threonine by the complex of tRNA^{Val} and valyl-tRNA synthetase. *Cell*, 1003: 793-803.
- Giege, R., Sissler, M., Florenz, C.** (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acid Research* 26, 2: 5017-5035.
- Gromadski K., B, Rodnina M., V.** (2004) Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome. *Mol. Cell*, 13: 191-200.
- Geigenmüller, U., Hausner, T.-P., Nierhaus K., N.** (1986) Analysis of the puromycin reaction. *Eur. J. Biochem.*, 161: 715-721.
- Gnirke, A., Geigenmüller, U., Rheinberger, H.-J., Nierhaus, K. H.** (1989) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. *J. of Biol. Chem.*, 264: 7291-7301.
- Haenni, A.L., Chapeville, F.** (1966) The behaviour of acetylphenylalanyl soluble ribonucleic acid in polyphenylalanine synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 114, 135-48.
- Kim, D., F., Green, R.** (1999) Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Molecular Cell*, 4: 859-864.
- Kisselev L., L., Buckingham, R. H.** (2000). Translational termination comes of age. *TIBS*: 561-566.
- Klipcan L., Safro, M.** (2004). Amino acid biogenesis, evolution of the genetic code and aminoacyl-tRNA synthetase. *J. Theor. Biol*, 7, 228: 389-396.
- Krayevsky, A., A., Kukhanova, M., K.** (1979) The peptidyltransferase center of ribosomes. *Progress in Nucleic Acid research and Molecular Biology*, 23: 1-51.
- LaRiviere, F. J., Wolfson, A. D., Uhlenbeck, O. C.** Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor EF-Tu by thermodynamic compensation. *Science* 294, 165-168 (2001).
- Lehmann, J.** (2000) Physico-chemical constraints connected with the coding properties of genetic system. *J. Theor. Biol* 202: 129-144.

- Lessard, J. L., Pestka, S.** (1972) Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. XXII Binding of aminoacyl-oligonucleotides to ribosomes. *J. Biol. Chem.* 247, 6901-6908.
- Lill, R., Robertson, J. M., Wintermeyer, W.** (1989) Binding of the 3' terminus of tRNA to 23S rRNA in the ribosomal exit site actively promotes translocation. *EMBO J.* 8, 3933-3938.
- Lillemäe, E.** (2000) tRNA 3' terminaalse nukleotiidi tähtsus valgu biosünteesil. *Diplomitöö*, 43 lk.
- Liu, M., Chu, W.-C., Liu, J., C.-H., Horowitz, J.** (1997) Role of acceptor stem conformation in tRNA^{Val} recognition by its cognate synthetase. *Nucleic Acid Research* 25: 4883-4890.
- Liu, M., Horowitz, J.** (1993) *In vitro* transcription of transfer RNAs with 3' end modification. *BioTechniques* 15, 264-266
- Liu, M., Horowitz, J.** (1994) Functional transfer RNAs with modifications in the 3'-CCA end: differential effects on aminoacylation and polypeptide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10389-10393.
- Liu, J., Liu, M., Horowitz, J.** (1998) Recognition of the universally conserved 3'-CCA end of tRNA by elongation factor EF-Tu. *RNA* 4, 639-646
- Lovato M. A., Swairjo, M. A., Schimmel, P.** (2004) Positional recognition of a tRNA determinant dependent on a peptide insertion. *Molecular Cell* 13: 843-851.
- Maiväli, Ü.** (2004) Studies on the structure-function relationship of the bacterial ribosome. *Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis*, 97: 130 lk.
- Moazed, D., Noller, H. F.** (1989a) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 57, 585-597.
- Moazed, D., Noller, H., F.** (1989b) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, 342: 142-147.
- Moazed, D., Noller, H., F.** (1991) Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA. *PNAS*, 88: 3725-3728. .
- Moore, P. B., Steitz T, A.** (2003). After the ribosome structures: How does peptidyl transferase work? *RNA* 9:155-159.
- Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L., Strobel, S. A.** (2000) A single adenosine with a neutral pK_a in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289: 947-950.
- Nierhaus, K., H., Spahn, C., Burkhardt, N., Dabrowski, M., Diedrich, G., Einfeldt, E., Kamp, D., Marquez, V., Patzke, S., Schäfer, M., A., Stelzl, U., Blaha, G.,**

- Willumeit, R., Stuhmann, H., B.** (2000) Ribosomal elongation cycle. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. Chapter 26: 319-335. (nierhausi mudel)
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P., B. Steitz, T., A.** (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289: 920-930.
- Noller, H., F., Cate, J., Dallas, A., Culver, G., Earnest, T., N., Green, R., Holmberg, L., Joseph, S., Lanchester, L., Lieberman, K., Merryman, C., Newcomb, L., Samaha, R., von Ahnsen, U., Yusupov, M., Yusupova, G., Wilson, K.** (2000) Studies on the structure and function of ribosomes by combined use of chemical probing and X-ray cristallography. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. Chapter 13: 129-150. (hübriidsaidid)
- O'Connor, M., Willis, N., M., Bossi, L., Gesteland, R., F., Atkins, J., F.** (1993) Functional tRNAs with altered 3' ends. *EMBO Journal* 12: 2559-2566.
- Ogle, J., M., Brodersen, D., E., Clemons, W., M. Jr., Tarry, M., J., Carter, A., P., Ramakrishnan, V.** (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. 292: 897-902.
- Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V.** (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of the E.coli ribosome. *EMBO J*, 17, 24: 7490-7497.
- Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M.** (1999) Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J*. 18, 3800-3807
- Polacek N., Patzke, S., Nierhaus, K., H., Barta, A.** (2000) Periodic conformational changes in tRNA: monitoring the dynamic of translating ribosomes. *Molecular Cell*, 5: 159-171.
- Polacek N., Gomez, M.J., Koichi, I., Xiong, L., Nakamura, Y., Mankin, A.** (2003). The critical role of universally conserved A2602 of 25S rRNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell*, 11: 103-112
- de Poupiana, L. R., Schimmel P.** (2001) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *TRENDS in Biochemical Science* 25, 10: 591-596.
- Porse, Bo., T., Thi-Ngoc, H., P., Garrett, R., A.** (1996) The donor substrate site within the peptidyl transferase loop of 23S rRNA and its putative interactions with the CCA-end of blocked aminoacyl-tRNA^{Phe}. *J. Mol. Biol* 264: 472-483.

- Remme, J., Villems, R.** On the physico-chemical rationale of the genetic code. *FEBS Lett.* 189, 159-162 (1985).
- Rodnina, M., V., Pape, T., Savelsbergh, A., Mohr, D., Matassova, N., B., Wintermeyer, W.** (2000) Mechanisms of partial reactions of the elongation cycle catalyzed by elongation factors Tu and G. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. Chapter 25: 301-317. (aa-tRNA seondumine ja translokatsioon)
- Rodnina, M., V., Wintermeyer, W.** (1995) GTP consumption of elongation factor Tu during translation heteropolymeric mRNAs. *PNAS*, 92: 1945-1949. (ribosoomide eraldamine, zonal)
- Rodnina, M., V., Wintermeyer, W.** (2001) Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26: 124-130.
- Rodnina, M V., Wintermeyer, W** (2001). Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: Kinetic and structural mechanisms. *Ann. Rev. Biochem*, 70: 415-435.
- Ruusala, T., Ehrenberg, M., Kurland, C.G.** Is there proofreading during polypeptide synthesis. *EMBO J.* 1, 741-745 (1982).
- Samaha, R. R., Green, R., Noller, H. F.** (1995) A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature* 377, 309-314.
- Schmeing, T. M., Moore, P., B., Steitz, T. A.** (2003) Structures of deacylated tRNA mimics bound to the E-site of large ribosomal subunit. *RNA* 9: 1345-1352.
- Schuelzen, F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi., Yonath, A.** (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102: 615-623.
- Semenkov, Y. P., Rodnina, M., V., Wintermeyer, W.** (1996) The “allosteric three-site model” of elongation cannot be confirmed in a well-defined ribosome system from *E. coli*. *PNAS* 93: 12183-12188.
- Semenkov, Y. P., Rodnina, M., V., Wintermeyer, W.** (2000) Energetic contribution of tRNA hybrid state formation to translocation catalysis on the ribosome. *Nature Structural Biology* 7: 1027-1031.
- Sharma D., Southworth, D.R., Green, R.** (2004) EF-G independent reactivity of the pre-translocation-state ribosome complex with the aminoacyl tRNA substrate muromycin supports an intermediate (hybrid) state of tRNA binding. *RNA*, 10, 1: 102-113.

- Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.-J. Zemlin, F., Wintermeyer, W., Heel, M.** (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and EF-Tu in the codon-recognition complex. *Nature Structural Biology* 9, 11: 849-855
- Tamura, K.** (1994) The role of the CCA sequence of tRNA in the peptidyl transfer reaction. *FEBS Letter* 353: 173-176.
- Tardif, K.D., Liu, M., Vitseva O., Hou, Y.-M., Horowitz, J.** (2001) Misacylation and editing by E.coli valyl-tRNA synthetase: evidence for two tRNA binding sites. *Biochemistry*, 40: 8118-8125.
- Tezuka, M., Chladek, S.** (1990) Effect of nucleotide substitutions on the peptidyltransferase activity of 2'(3')-O-(aminoacyl) oligonucleotides. *Biochemistry* 29, 667-670.
- Thompson, R.C., Stone, P. J.** Proofreading of the codon-anticodon interaction on ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 198-202 (1977).
- Thompson J., Kim D, F., O`Connor M., Lieberman, K. R., Bayfield, M.A., Gregory, S.T., Green, R., Noller, H.F., Dahlberg, A.F.**(2001) Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 98,16: 9002-9007.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S. M., Sengupta, J., Nielsen, R. C., Nissen, P., Harvey, S. C., Ehrenberg, M., Frank, J.** (2003). Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct Biol.* 10: 899-906.
- Wagner T., Sprinzl, M.** (1980). The complex formation between E. coli aminoacyl-tRNA, EF-Tu and GTP. The effect of side chain of the amino acid linked to tRNA. *Eur. J. Biochem*, 108: 213-221.
- Watanabe S.** (1972) Interaction of siomycin with the acceptor site of Escherichia coli ribosomes. *J Mol Biol.* 67, 443-547
- Weinger, J. S., Parnell, K. M., Dorner, S., Green, R., Strobel, S. A.** (2004) Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11: 1101-1106.
- Wolfson A., D., Uhlenbeck, O. C.** (2002) Modulation of tRNA^{Ala} identity by inorganic pyrophosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5965-5970.

Wower, J., Kirillov, S. V., Wower, I. K., Guven, S., Hixon, S. S. Zimmermann, R.A.
(2000) Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome. *J. Biol. Chem.* 275,
37887-37894.

**Yarian C., Townsendi H., Czestkovski W., Sochacka, E., Malkiewicz, J., Guenther
R., Miskiewicz, A., Agris, P.** (2002) Accurate translation of the genetic code
depends on tRNA modified nucleosides. *J of Biol. Chem.*277, 19: 16391-16395.

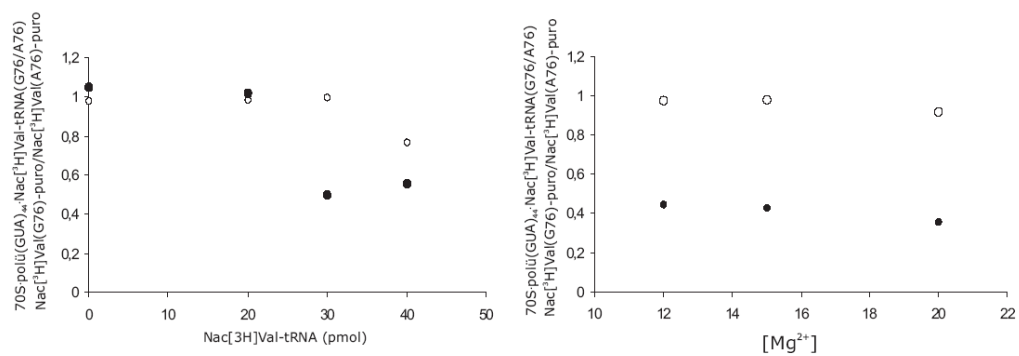
LISA

Lisa 1. *In vitro* transkribeeritud tRNAde aminoatsüleerimise tulemused (%).
E.coli tRNA₁^{Val}(AAC) variandi A76 ja mutantse variandi G76 aminoatsüleerimine valiiniga.
E.coli tRNA₂^{Val}(GAC) ja tRNA₂^{Ala}(GAC) ning pämi tRNA^{Phe}(GAC) aminoatsüleerimine valiini,alaniini ja fenüülalaniiniga. Aminoatsüleerimiseks on tasutatud puhastatud ensüüme:
T. thermophilus ValRS, *E. coli* AlaRS, *E. coli* PheRS ja PheRS rikastatud S100 ensüümi fraktsiooni.

	Val/ValRS	Ala/AlaRS	Phe/PheRS	Phe/S100(PheRS)
tRNA ₁ ^{Val} (A76)	85			
tRNA ₁ ^{Val} (G76)	65			
tRNA ₂ ^{Val}	70	65	15	35
tRNA ₂ ^{Ala}	60	65	15	40
tRNA ^{Phe}	70	70		55

Lisal 2. Mutantsete substraatide seondumine ribosoomi erinevatesse saitidesse. Mutantseid (G76) ribosoomikomplekse on võrreldud metsiktüüpi (A76) tRNA-ribosoom kompleksidega

RIBOSOOMIGA SEOTUD SUBSTRAADID	RIBOSOOMI SAIT	G76/A76
1. NAc[3H]Val-tRNA(G76)/NAc[3H]Val-tRNA(A76)	P	0,8-0,86
2. NAc[3H]Val-tRNA(G76)/NAc[3H]Val-tRNA(A76) [14C]Val-tRNA(A76)	P A	1,0-1,3 0,83-0,86
3. [32P]tRNA(G76)/[32P]tRNA(A76)	E & P	0,6
4. [32P]tRNA(G76)/[32P]tRNA(A76) NAc[3H]Val-tRNA(A76)	E & P A	0,6 0,9
5. [32P]tRNA(G76)/[32P]tRNA(A76) NAc[3H]Val-tRNA(A76) + EF-G	E P	0,9 1,13



Lisa 3. NacVal-tRNA variantide A76 ja G76 võrdlev seondumine ribosoomi A-saiti ja EF-G sõltuv translokatsioon A-saidist P-saiti. Paneelil (A) on Nac-Val-tRNA kontsentratsioonist sõltuv Nac-[³H]Val-tRNA variantide G76 ja A76 võrdlev seondumine 70S-polü(GUA)₄₄ A-saiti (○) ja Nac-[³H]Val(G76)-puro Nac-[³H]Val(A76)-puro suhe peale EF-G sõltuvat translokatsiooni A-saidist P-saiti temperatuuril 37° C 10 minutit (●). (B) Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonist sõltuv Nac-[³H]Val-tRNA variantide A76 ja G76 seondumine 70S-polü(GUA)₄₄ A-saiti (○); Nac-[³H]Val(G76)-puro ja Nac-[³H]Val(A76)-puro suhe peale EF-G sõltuvat translokatsiooni A-saidist P-saiti temperatuuril 37° C 10 minutit (●).