Çizelge 7. Kodonun 3′ pozisyonu ve antikodonun 5′ pozisyonu (sallantılı) arasındaki baz eşleşmesinin kuralları

|  |
| --- |
| Antikodonun 5’ Pozisyonunda Bulunan Baz Kodonun 3’ Pozisyonundaki Eşleşen Baz |
|  C G A U U A ya da G G U ya da C I U, A ya da C |

 Farklı antikodonlara sahip ancak aynı amino aside bağlanma özelliğindeki tRNA molekülleri **izoakseptör** olarak adlandırılır. İzoakseptörlerde, baz dizisi kısmen ya da tamamen farklı antikodonlar bulunur. İzoakseptörleri kodlayan genler eşit düzeyde ifade edilmezler. Örneğin; alaninin GCC kodonunu tanıyan tRNA izoakseptörü, yine alaninin GCU kodonunu tanıyan tRNA izoakseptörüne oranla 1/10 oranında daha az ifade edilir. Sadece izoakseptörler değil, bu izoakseptörlerin interaksiyon verdiği kodonlar da gen yapısında eşit olarak yer almaz. Örneğin; *E.coli’*de ribozomal proteinleri kodlayan genlerde büyük bir sıklıkla sinonim kodonlar oluşur. Bu genlerde toplam 176 kodon alanini determine eder. Bunların 93’ ü GCU, 10’ u GCC, 45’ i GCA ve 28’ i GCG’ dir. Bazı izoakseptörlerin tanıdığı sinonim kodonların, yapısal genlerde diğerlerinden daha yoğun bulunmaları nedeni ile, aynı amino asit için farklı **kodon kullanımı** meydana gelir. Eğer gen nadir bir kodon içeriyor ise, buna paralel olarak tRNA molekülü de nadir olacaktır ve protein sentezi oranı önemli ölçüde düşecektir. Prokaryotlarda ribozomlar transkripsiyon kompleksi ile çok yakın ilişkilidir (arkasında yer alır). Protein sentezinin yavaşlaması, transkripsiyon kompleksinin ribozomdan uzaklaşmasına ve mRNA üzerinde bir rho bağlanma bölgesinin ortaya çıkmasına yol açar ve transkripsiyonun erken sonlanması söz konusu olur. Nadir kodonlar bu özellikleri ile gen ifadesinin regülasyonunda rol oynar.

 Daha önce, terminasyon kodonlarını –normalde- tRNA moleküllerinin tanımadığı söylenmiş idi. Ancak, bu kodonlar mutant tRNA molekülleri tarafından tanınabilir. Bu moleküllere supresör (baskılayıcı) tRNA molekülleri adı verilmektedir (anlamsız mutasyon etkisini bozduklarından dolayı bu adla anılırlar). Bir baskılayıcı tRNA molekülü, terminasyon kodonuna bağlanmasını sağlayan ve düzenlenebilen bir antikodon içerir. Genellikle az bulunan tRNA türlerini kodlayan genler mutasyona uğrayarak, baskılayıcı tRNA gen kodu oluşturulmaktadır. Baskılayıcı tRNA oluşumu ile sonuçlanan bir mutasyon, hücrenin anlamsız mutasyonlara karşı koymasını güçlendirmesi yanında, bazı normal terminasyon kodonlarının da (genlerin sonunda bulunan terminasyon kodonları) okunmasına yol açar. Normal stop kodonlarının amino asit dilinde okunması, translasyonun normal sonlanma sürecini ve protein primer yapısını bozduğundan; baskılayıcı (supresör) tRNA genlerini içeren hücrelerin yaşama şansı, bunları içermeyen hücrelerden daha az olur. Ayrıca, baskılayıcı mutasyon kendi kodonunu (normal kodonu) tanıyamayan mutant tRNA türlerinin oluşumuna yol açar. Eğer söz konusu tRNA türlerinin izoakseptörleri yok ise, bu mutasyon hücre için letal (öldürücü) olabilir.

 UAG Stop kodonunun supressor (baskılayıcı) tRNA molekülleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır. UAG stop kodonu farklı baskılayıcı tRNA molekülleri tarafından tanınır ve bu kodonun bulunduğu bölgelerde tirozin ilavesi (insersiyon) yapılır. Tirozin insersiyonuna olanak sağlayan baskılayıcı molekül; normal tRNATyr antikodon bölgesindeki GUA tripletinin, bir mutasyon sonucu CUA’ya dönüşümü ile oluşmaktadır. Bu tirolil-tRNATyr UAG stop kodonunu kullanır ve bu stop kodonu bölgelerini, gelişen peptit zincirine tirozin olarak ilave eder. Böylece tirozil tRNATyr supresör molekülü protein sentezinin erken durmasını engeller. Baskılayıcı tRNA moleküllerinin keşfi, genetik kod için can alıcı bir bilgidir. DNA’daki anlamlı ya da anlamsız bilgi bu moleküllerin varlığında değişebilmektedir.

 tRNA’ nın antikodonu ile mRNA’da bulunan bir kodon interaksiyona girmeden önce, söz konusu kodonun spesifiye ettiği amino asit tRNA molekülünün 3′ ucuna kovalent bir şekilde bağlanır. Bu aminoasilasyon reaksiyonu sonucu aminoasil-tRNA molekülü meydana gelir. Oluşan bu aminoasil-tRNA bağı yüksek enerjili bir bağdır. Dolayısı ile aktive olan amino asit, gelişen polipeptit zincirine taşınır. Aminoasil-tRNA moleküllerine, yüklü tRNA molekülleri de denmektedir. Aminoasil-tRNA molekülünün tipi, ön isimle belirlenir. Örneğin; aminoasil tRNAAla, Alanil-tRNAAla olarak tanımlanır. Aminoasil sentetazlar, doğru tRNA türlerine aminoasitlerin bağlanmasını katalizledikleri için, genetik kodun translasyonunda kilit rol oynamaktadırlar. Protein yapısına giren 20 amino asit olduğundan, bir hücrede en az 20 adet aminoasil-tRNA sentetaz enzimi bulunmalıdır. Nadiren hücrelerde bu sayının üzerinde aminoasil sentetaz bulunur. Örneğin; serin için 6 kodon ve birkaç izoakseptör tRNASer molekülü tanımlanmıştır. Ancak bunların tümü ( tRNASer ) tek bir seril-tRNA sentetaz enzimi tarafından tanınmaktadır. Tüm aminoasil-tRNA sentetazlar , aynı genel reaksiyonu katalize etseler de, alt ünite ve moleküler ağırlık bakımından önemli farklılıklar göstermektedirler (Çizelge 8).

**Çizelge 8. Bazı aminoasil-tRNA sentetaz enzimlerinin yapısal özellikleri**

**Enzim Organizma Alt Ünite Kompozisyonu Amino asit sayısı**

Alanin *E. coli* α4 875

Aspartam Maya α2 557

Glisin *E. coli* α2, β2 303(α), 609(β)

Glutamin *E. coli* α 551

Glutamat *E. coli* α 471

Histidin *E. coli* α2 424

 Maya(Sitoplazma) Bilinmiyor 526

 Maya(Mitokondri) Bilinmiyor 546

İzolösin *E. coli* α 936

Metionin *E. coli* α2 677

 Maya(Sitoplazma) α2 751

Treonin *E. coli* α2 642

 Maya(Sitoplazma) Bilinmiyor 734

 Maya(Mitokondri) Bilinmiyor 462

Fenilalanin *E. coli* α2, β2 307(α), 795(β)

Triptofan *E. coli* α2 334

 *B. steorothermophilus* α2 327

 Maya(Mitokondri) α2 374

Tirosin *E. coli* α2 424

 *B. caldotenax* α2 419

 Aminoasil-tRNA sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyon aşağıda tanımlanmıştır:

 Amino asit + tRNA + ATP  Aminoasil-tRNA sentetaz Aminoasil-tRNA + AMP + PPi

 Amino asit; tRNA molekülüne, 3′ uç bölgedeki ribozun 2′ ya da 3′ OH gurubuyla, amino asidin karboksilat grubunun ester bağı yapması suretiyle bağlanır. Bu reaksiyon 2 ayrı aşamada meydana gelir. ilk aşamada aminoasil-tRNA sentetaz amino asit ile bir reaktif ara bileşik oluşturur. Daha sonra enzim, aktive olan amino asidi tRNA molekülüne bağlar.

1. aşama: Amino asit + ATP Aminoasil-adenilat + PPi
2. aşama: Aminoasil-adenilat + tRNA Aminoasil-tRNA + AMP

 Spesifik bir amino asidin, spesifik bir tRNA molekülü tarafından tanınması translasyon için en kritik aşamalardan birisidir. Bir aminoasil-tRNA sentetaz enzimi, kendi amino asidini; yüküne, büyüklüğüne ve standart serbest enerjisine göre tanır. Amino asit seçimi ilk aşamada, elekriki yük ve hidrofobisite uyuşmazlığına göre yapılır. Örneğin; tirozin-tRNA sentetaz polar tirozini, polar olmayan fenilalaninden ayırır. Çünkü tirosil adenilat ile tirozil-tRNA sentetaz arasında oluşan kompleks ,özel hidrojen bağları ile stabilize edilir. Bu hidrojen bağları tirozil-tRNA ile fenilalanin arasında meydana gelmez. Aminoasil tRNA sentetaz enzimleri, amino asitleri büyüklüklerine göre de tanıyabilir. Örneğin; Alanil-tRNA sentetaz enzimi, alanini, molekül büyüklüğüne göre, valinden ayırır. Aynı elektriki yüke sahip olmalarına rağmen valin daha büyüktür ve bu nedenle Alanil-tRNA sentetaz enziminin aktif bölgesine bağlanamaz. İzolösin-tRNA sentetaz enziminin, valini, izolösinden ayırabilmesi için ise bir başka sorun bulunmaktadır. Her iki amino asit de polar değildir. Ancak izolösin valinden daha çok metilen grup içermektedir. Valin, izolösinden küçük olduğu için, enzim bağlanma bölgesi aktivitesi sterik olarak elimine edilemez. Diğer bir ifade ile, valin, izolösil tRNA sentetaz enzimi bağlanma bölgesine yerleşebilir. Ancak, izolösinin ilave metilen grupları, enzimin aktif bölgesinde valinden daha fazla van der Waals interaksiyonu meydana getirir. Sonuç olarak izolösinin, izolösin-RNA sentetaz enzimine bağlanmasının serbest standart enerjisi, valinin izolösil-tRNA sentetaz enzimine bağlanmasından daha yüksektir. İzolösil tRNA sentetaz enzimi varlığında yürütülen deneylerde, ortama eşit miktarda izolösin ve valin ilave edilmiş ve sonuçta izolösin adenilatın, valin adenilattan 100 kat daha yüksek oranda oluştuğu saptanmıştır.

 Amino asil tRNA sentetaz enzimleri; sadece amino asitlere değil, tRNA moleküllerine de spesifite (özgüllük) göstermektedir. tRNA moleküllerinin yapısal özellikleri, aminoasil-tRNA sentetazların bu molekülleri tanımasında rol oynadığı belirlenmiştir. Aminoasil-tRNA sentetazların spesifitelerini, tRNA molekülü ve enzim üzerinde bulunan tamamlayıcı yüzeyler arasında meydana gelen interaksiyonlar belirler. Özellikle “L” formundaki tRNA moleküllerinin iç kısmında yer alan; akseptör, D ve antikodon sap bölgeleri, tRNA moleküllerinin spesifik aminoasil tRNA sentetazlara bağlanmasını yönetir. Bir başka olası görüş, antikodon halkasının aminoasil tRNA sentetazlar için tanıma bölgesi olduğudur. Zira bu bölge hangi amino asidin proteine ilave edileceğini determine etmektedir. Bazı spesifik tanıma elementleri, tRNAAla molekülü ile yürütülen deneyler sonucu tanımlanmıştır. Lösil-tRNA sentetaz vasıtasıyla asillendirilen bir tRNA molekülü, antikodon bölgesinde yer almayan 12 nukleotidin değiştirilmesi ile, alanil-tRNA sentetaz tarafından tanınan bir moleküle dönüştürülmüştür. Daha sonra *E. coli* tRNAAla molekülünün, alanil-tRNA sentetaz enzimi tarafından tanınmasının G3-U70 arasındaki baz eşleşmesine bağlı olduğu saptanmıştır. G3-U70 baz eşleşmesinin kaldırılması, akseptör sapında konformasyon değişimine neden olmuş ve alanil-tRNA sentetaz enziminin bu molekülü tanıması engellenmiştir. Bu baz eşleşmesi diğer birçok tRNA molekülünde saptanmıştır.

 Aminoasilasyon yapıldıktan sonra, tRNA molekülü, amino asidi proteindeki lokasyonuna yerleştirmek için hazır hale gelir. Bu reaksiyon, aminoasilasyondan sonra gerçekleştirilen bir tRNA molekülü modifikasyonu deneyi ile ispatlanmıştır. Sisteinil-tRNACys molekülünde; hidrojen gazı içindeki bir nikel katalist yardımı ile (in-vitro koşullarda) sisteinil-tRNACys aktif bölgesinin SH grubu uzaklaştırılmış ve yerine bir H atomu bağlanmıştır. Oluşan aminoasil tRNA molekülü, alanil-tRNACys molekülüdür. Bu molekül in-vitro protein sentezine dahil edildiğinde; sisteini spesifiye edilen bölgelere alaninin yerleştirildiği görülmüştür. Bu deney; belirli tRNA molekülünün taşıdığı antikodonun, mRNA kodonunu tanıdığını ancak söz konusu tRNA’ya hangi amino asidin bağlanacağını yönetmediğini göstermektedir.

 Daha önce söylendiği gibi, izolösil tRNA sentetaz ortamına eşit miktarda izolösin ve valin ilave edildiğinde izolösil-adenilat oluşumu, vanil-adenilattan 100 kat daha fazladır. Bu gözlem doğrultusunda, izolösil-tRNA sentetazın; her 100 izolösin için, yanlışlıkla bir valini polipeptit zincirine ilave edeceğini söylemek olasıdır. Ancak bu hata, hücre içi (in-vivo) koşullarda 1000 bazda bir oluşur. Bu düşük hata oranı, aminoasil-adenilat formasyonundan sonra da izolösil tRNA sentetaz enziminin iki amino asidi ayırdığına işaret etmektedir. İzolösil-tRNA sentetaz, valil-adenilat oluşturabiliyor ise de; valil-adenilat, tRNAIle ve izolösil-tRNA sentetaz ile reaksiyona sokulduğunda valil-tRNAIle formu oluşmaz. Bunun yerine valil-adenilat (valil-AMP, adenilat=AMP), valin ve AMP’ye hidrolize edilir. Buradan hareketle; aminoasil grubunun, aminoasil adenilattan tRNA molekülüne transferi aşamasında, izolösil-tRNA sentetazın kontrol aktivitesi gösterdiğini söylemek olasıdır. Tüm aminoasil sentetazlar kontrol aktivitesi göstermez. Örneğin; tirosil-tRNA sentetaz enziminin bu aktivitesi yoktur.

 Mitokondriler, bulundukları hücreden –belirli oranda- farklı bir genetik koda sahiptirler. Burada kısıtlı sayıda üretilen proteinler için kendine has tRNA molekülleri bulunur ve yalnız mitokondriyel mRNA’yı tanırlar. Mitokondriyel aminoasil tRNA sentetazlar, yalnız mitokondriyel tRNA moleküllerinde amino asillendirme aktivitesi gösterirler. Çekirdek genomu tarafından determine edilen bu moleküller, translasyondan sonra mitokondrilere aktarılırlar. Mitokondriyel tRNA sentetazlar da çekirdek tRNA sentetazlar ile aynı genler tarafından kodlanmakta, ancak söz konusu enzimler farklı bir işleme mekanizması ile üretilmektedir.