

# Buku Ajar

## Ekspresi Gen: Dari Gen Hingga Protein

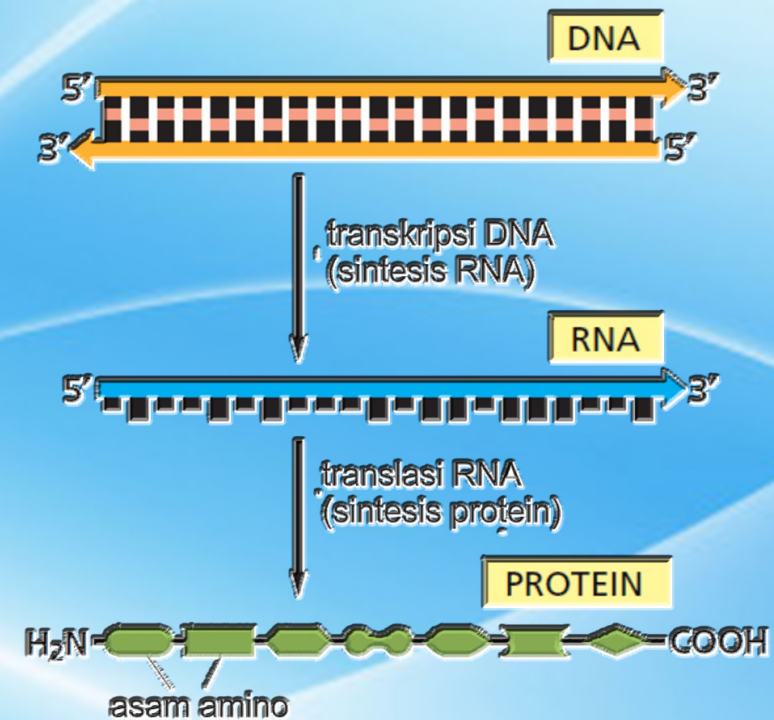
Buku ini menjelaskan berbagai mekanisme dan proses transkripsi dan translasi dari DNA hingga dihasilkan produk protein fungsional bagi aktivitas selular. Buku ini disusun dengan berbahasa Indonesia sehingga diharapkan bermanfaat bagi segenap civitas akademika di Indonesia.

Penulis merupakan para Dosen Bagian Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Buku ini disusun bersama guna menunjang pendidikan biologi sel bagi Mahasiswa Kedokteran di Indonesia.

Ekspresi Gen: Dari Gen Hingga Protein

# Buku Ajar

## Ekspresi Gen: Dari Gen Hingga Protein



Dr. Rachmat Hidayat, M.Sc  
Drs. Joko Marwoto, MS  
Dra. Lusia Hayati, M.Sc  
Dr. Eiske Maritska, MSc, Med

Dr. Triwanti, M.Kes  
Dr. Nyayu Fauziah Zen, M.Kes  
Septi Purnamasari, S.ST., M.Kes  
Rara Inggarsih, S.ST., M.Kes



**Buku Ajar**  
**Ekspresi Gen: Dari Gen Hingga Protein**

**dr. Rachmat Hidayat, M.Sc**  
**Drs. Joko Marwoto, MS**  
**Dra. Lusia Hayati, M.Sc**  
**Dr. Ziske Maritska, MSi, Med**  
**Dr. Triwani, M.Kes**  
**Dr. Nyayu Fauziah Zen, M.Kes**  
**Septi Purnamasari, S.ST., M.Kes**  
**Rara Inggarsih, S.ST., M.Kes**



**HM Publisher**

**Penerbit**

**CV Hanif Medisiana**

Jl. Sirna Raga no 99, 8 Ilir, Ilir Timur 3, Palembang, Sumatera Selatan,

HP 081949581088, Email: [hippocrates@medicalcoaching.page](mailto:hippocrates@medicalcoaching.page)

# Buku Ajar

## Ekspresi Gen: Dari Gen Hingga Protein

### Penulis

dr. Rachmat Hidayat, M.Sc  
Drs. Joko Marwoto, MS  
Dra. Lusia Hayati, M.Sc  
Dr. Ziske Maritska, MSi, Med  
Dr. Triwani, M.Kes  
Dr. Nyayu Fauziah Zen, M.Kes  
Septi Purnamasari, S.ST., M.Kes  
Rara Inggarsih, S.ST., M.Kes

**ISBN: 978-623-97681-1-9**

Hak Penerbit pada CV Hanif Medisiana Palembang  
Anggota IKAPI (No. 021/SMS/21)

### Editor

Erik Extriada

### Cover Desain

Juna Sendri

Cetakan Perdana, Juli 2021

16,24 x 25

X, 259 hlm

### Layout

Tim Produksi Hanif Medisiana

## **Sanksi Pelanggaran Pasal 113 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta**

### **Pasal 113**

Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).

Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).

Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

## **Kata Pengantar**

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah Subhanawata'ala yang telah memberikan limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Buku Ajar Ekspresi Gen : Dari Gen Hingga Protein. Penulis berharap penulisan buku ajar ini dapat membantu mahasiswa Fakultas Kedokteran dalam menyelesaikan studi sehingga mampu memahami konsep keilmuan dengan baik . Penulis berharap juga buku ini dapat bermanfaat bagi pembaca secara luas. Dalam penulisan buku ini, penulis menyadari bahwa materi buku ini masih jauh dari harapan dan kesempurnaan, namun penulis telah berusaha semaksimal mungkin untuk dapat menyelesaikan buku ini dengan sebaik-baiknya.

Palembang, Juli 2021

Penulis

# DAFTAR ISI

Halaman Halaman Judul.....	i
Kata Pengantar.....	iv
Daftar Isi .....	v
Bagaimana Sel Membaca Genom: Dari DNA Hingga Protein .....	1
Dari DNA KE RNA.....	9
Bagian-bagian dari Urutan DNA Ditranskripsi menjadi RNA ....	15
Transkripsi Menghasilkan RNA Komplementer untuk Satu Untai DNA .....	20
Sel Menghasilkan Beberapa Jenis RNA .....	26
Sinyal yang Dikodekan dalam DNA Memberi tahu RNA Polymerase Dimana untuk Mulai dan Berhenti.....	32
Sinyal Mulai dan Berhenti Transkripsi Heterogen dalam Urutan Nukleotida .....	39
Inisiasi Transkripsi pada Eucaryotes Membutuhkan Banyak Protein .....	45
RNA Polymerase II Membutuhkan Faktor Transkripsi Umum..	50
Polymerase II Juga Membutuhkan Aktivator, Mediator, dan Protein Pemodelifikasi Chromatin .....	59
Transkripsi Menghasilkan Ketegangan Superhelis dalam DNA .....	62

Perpanjangan Transkripsi pada Eukariota Sangat Erat dengan Pemrosesan RNA.....	68
RNA Capping adalah Modifikasi Pertama Pre-mRNA Eukariotik..	78
Penyambungan RNA Menghapus Urutan Intron dari Pra- mRNA yang Baru Ditranskripsi.....	79
Sinyal Urutan Nukleotida Dimana Penyambungan Terjadi .....	83
Penyambungan RNA Dilakukan oleh Spliceosome .....	86
Properti Lain dari Pre-mRNA dan Sintesisnya Membantu Menjelaskan Pilihan Situs Sambungan yang Tepat.....	95
Seperangkat Kedua snRNPs Mennyambung Sebagian Kecil dari Urutan Intron pada Hewan dan Tumbuhan .....	99
Splicing RNA Menunjukkan Plastisitas Luar Biasa.....	104
Penyambungan RNA Spliceosome Catalyzed Mungkin Berekolusi dari Mekanisme Penyambungan Sendiri.....	110
Enzim Pemrosesan RNA Menghasilkan Ujung 3' dari mRNA Eukariotik .....	116
mRNA Eukariotik yang Matang secara Selektif Diekspor dari Nukleus .....	123
Banyak RNA Nonkoding Juga Disintesis dan Diproses dalam Inti .....	130
Nucleolus adalah Pabrik Penghasil Ribosome .....	134
Inti Mengandung Berbagai Struktur Subnuklear.....	139

Ringkasan.....	145
Dari RNA ke Protein.....	147
Sekuens mRNA Disekodekan dalam Set Tiga Nukleotida .....	149
Molekul Trna Cocokkan Asam Amino dengan Codon dalam mRNA .....	150
tRNA Dimodifikasi secara Konvensional Sebelum Keluar dari Inti .....	156
Enzim Khusus Menyatukan Setiap Asam Amino dengan Molekul tRNA yang Sesuai .....	163
Editing tRNA Synthetases Mmemastikan Akurasi.....	168
Asam Amino Ditambahkan ke Ujung Terminal-C dari Rantai Polipeptida Tumbuh.....	172
Pesan RNA Diterjemahkan dalam Ribosom .....	174
Faktor Pperpanjangan Mendorong Terjemahan ke Depan dan Meningkatkan Akurasinya.....	182
Ribosome adalah Ribozyme.....	190
Urutan Nukleotida dalam Sinyal mRNA Di mana Mulai Sintesis Protein.....	198
Stop Codons Tanda Akhir Terjemahan .....	202
Protein Dibuat dari Polyribosomes.....	209
Ada Variasi Kecil dalam Kode Genetika Standar.....	213



Inhibitor dari Sintesis Protein Procaryotic Berguna sebagai Antibiotik.....	216
Keakuratan ..... dalam Penerjemahan Membutuhkan Pengeluaran Energi Gratis.....	222
Mekanisme Kontrol Kualitas Bertindak untuk Mencegah Penerjemahan mRNA yang Rusak.....	225
Beberapa Protein Mulai Melipat Sementara Masih Disintesis .....	230
Daerah Hidrofobik Terkena Memberikan Sinyal Kritis untuk Kontrol Kualitas Protein.....	236
Proteasome adalah Protase Terkompartemen dengan Situs Aktif yang Diasingkan .....	240
Sistem Konjungsi Ubiquitin yang Rumit Menandai Protein untuk Kehancuran .....	243
Banyak Protein Dikendalikan oleh Penghancuran Teratur .....	245
Protein yang Berlipat Tidak Normal Dapat Menyatu untuk Menyebabkan Penyakit Manusia yang Merusak.....	253
Ada Banyak Langkah dari DNA ke Protein.....	258
Ringkasan.....	255
Referensi.....	256
Pertanyaan.....	259

Hanya ketika struktur DNA ditemukan pada awal 1950-an barulah menjadi jelas bagaimana informasi herediter dalam sel dikodekan dalam urutan DNA nukleotida. Kemajuan sejak saat itu sangat mencengangkan. Dalam limapuluh tahun kami tahu urutan genom lengkap untuk banyak organisme, termasuk manusia. Karena itu, kami mengetahui informasi jumlah maksimum yang diperlukan untuk menghasilkan organisme yang kompleks seperti kami. Batas-batas pada informasi herediter yang diperlukan untuk kehidupan membatasi ciri-ciri biokimia dan struktural sel dan memperjelas bahwa biologi tidak rumit yang tak terhingga.

Dalam bab ini, kami menjelaskan bagaimana sel memecahkan kode dan menggunakan informasi dalam genomnya. Banyak yang telah dipelajari tentang bagaimana instruksi genetik yang ditulis dalam alfabet hanya dengan empat "huruf" - empat nukleotida berbeda dalam DNA - mengarahkan pembentukan bakteri, lalat buah, atau manusia. Namun demikian, kami masih memiliki banyak hal untuk mengetahui tentang bagaimana informasi yang disimpan dalam menghasilkan genom organisme bahkan

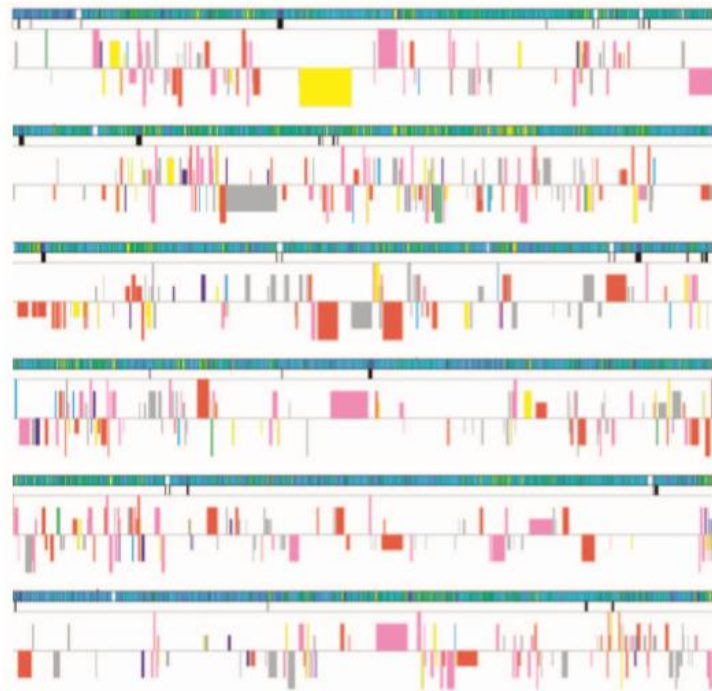
bakteri uniseluler paling sederhana dengan 500 gens, apalagi cara mengarahkan perkembangan manusia dengan sekitar 25.000 gen. Masih banyak ketidaktahuan; karena itu banyak tantangan menarik yang menunggu generasi ahli biologi sel berikutnya.

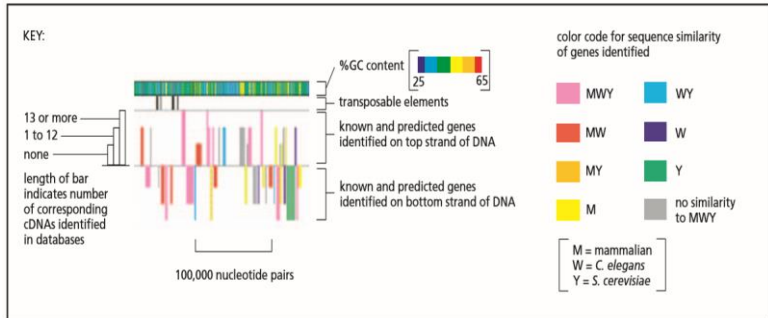
Masalah yang dihadapi bahwa sel-sel dalam genom pengkodean dapat dipahami dengan mempertimbangkan sebagian kecil dari genom lalat buah *Drosophila melanogaster* (**Gambar 1**). Sebagian besar informasi yang dikodekan-DNA hadir dalam hal ini dan genom lainnya menentukan urutan linier — urutan — asam amino untuk setiap protein yang dihasilkan organisme. Seperti dijelaskan dalam Bab 3, urutan asam amino pada gilirannya menentukan bagaimana setiap protein terlipat untuk memberikan molekul dengan bentuk dan kimia yang berbeda. Ketika sebuah sel membuat protein tertentu, ia harus memecahkan kode wilayah genom secara akurat. Informasi tambahan yang dikodekan dalam DNA genom menentukan kapan tepatnya dalam kehidupan suatu organisme dan di mana jenis sel masing-masing gen akan diekspresikan menjadi protein. Karena protein adalah unsur utama sel, penguraian genom menentukan tidak hanya

ukuran, bentuk, sifat biokimia, dan perilaku sel, tetapi juga ciri khas masing-masing spesies di Bumi.

Orang mungkin telah meramalkan bahwa informasi yang ada dalam genom akan diatur secara teratur, menyerupai kamus atau direktori telepon. Meskipun genom dari beberapa bakteri tampak terorganisasi dengan cukup baik, genom dari sebagian besar organisme multiseluler, seperti contoh *Drosophila*, secara mengejutkan tidak teratur. Bagian-bagian kecil dari pengkodean DNA (yaitu, DNA yang mengkode protein) diselingi dengan sejumlah besar DNA yang tampaknya tidak berarti. Beberapa bagian genom mengandung banyak gen dan yang lainnya kekurangan gen sama sekali. Protein yang bekerja erat satu sama lain di dalam sel sering memiliki gen yang terletak pada kromosom yang berbeda, dan gen yang berdekatan biasanya menyandikan protein yang tidak ada hubungannya dengan satu sama lain di dalam sel. Oleh karena itu, genom pengkodean ulang bukan masalah sederhana. Bahkan dengan bantuan komputer yang kuat, masih sulit bagi para peneliti untuk menentukan secara pasti awal dan akhir gen dalam sekuens DNA genom kompleks, apalagi untuk

memprediksi kapan masing-masing gen diekspresikan dalam kehidupan organisme. Meskipun urutan DNA genom manusia diketahui, mungkin diperlukan setidaknya satu dekade untuk mengidentifikasi setiap gen dan menentukan urutan asam amino yang tepat dari protein yang dihasilkannya. Namun sel-sel dalam tubuh kita melakukan ini ribuan kali per detik.

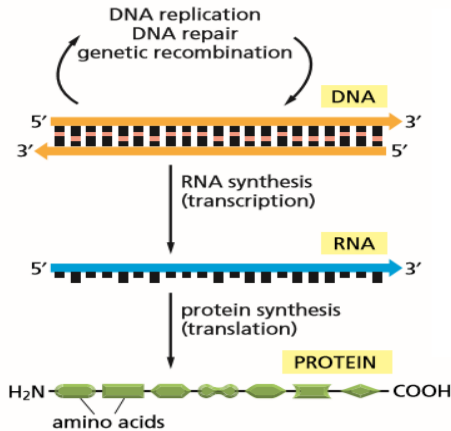




**Gambar 1 (halaman sebelah) Penggambaran skematis dari sebagian kromosom 2 dari genom lalat buah *Drosophila melanogaster*.** Angka ini mewakili sekitar 3% dari total genom *Drosophila*, disusun sebagai enam segmen yang berdekatan. Sebagaimana dirangkum dalam kunci, representasi simbolis adalah: garis-garis hitam dengan berbagai ketebalan: lokasi elemen transposable, dengan bar yang lebih tebal menunjukkan kelompok elemen; kotak berwarna: gen (baik yang diketahui maupun yang diprediksi) dikodekan pada satu untai DNA (kotak di atas garis tengah) dan gen dikodekan pada untai lainnya (kotak di bawah garis tengah). Panjang setiap kotak gen mencakup eksornya (DNA pengkode protein) dan intronnya (DNA nonkode) (lihat Gambar 4-15); tingginya sebanding dengan jumlah cDNA diketahui yang cocok dengan gen. (Seperti dijelaskan dalam Bab 8, cDNA adalah salinan DNA dari molekul mRNA, dan koleksi besar urutan nukleotida cDNA telah disimpan dalam berbagai basis data, semakin banyak kecocokan, semakin tinggi keyakinan bahwa gen yang diprediksi ditranskripsi menjadi RNA dengan demikian merupakan gen asli.). Warna dari masing-masing kotak gen menunjukkan apakah gen yang berkaitan erat diketahui terjadi pada organisme lain. Misalnya, **MWY** berarti gen tersebut memiliki kerabat dekat pada mamalia, dalam cacing *nematoda Caenorhabditis elegans*, dan dalam ragi *Saccharomyces cerevisiae*. **MW** menunjukkan gen memiliki kerabat dekat pada mamalia dan cacing tetapi tidak dalam ragi. *Bilah berwarna pelangi* menunjukkan persen

pasangan basis G – C; di banyak genom yang berbeda, persentase ini menunjukkan variasi regional yang mencolok, yang asal dan signifikansinya tidak pasti. (Dari M.D. Adams et al., Sains 287: 2185–2195, 2000. Dengan izin dari AAAS.)

DNA dalam genom tidak mengarahkan sintesis protein itu sendiri, tetapi sebaliknya menggunakan RNA sebagai perantara. Ketika sel membutuhkan protein tertentu, urutan nukleotida dari bagian yang sesuai dari molekul DNA yang sangat panjang dalam kromosom pertama kali disalin ke dalam RNA (proses yang disebut *transkripsi*). Ini adalah salinan RNA segmen DNA yang digunakan secara langsung sebagai contoh untuk mengarahkan sintesis protein (suatu proses yang disebut *translasi*). Aliran informasi genetik dalam sel karena itu dari DNA ke RNA ke protein (**Gambar 2**). Semua sel, dari bakteri hingga manusia, mengekspresikan informasi genetiknya dengan cara ini — sebuah prinsip yang sangat mendasar sehingga disebut *dogma sentral* pada biologi molekuler.



**Gambar 2 Jalur dari DNA ke protein.** Aliran informasi genetik dari DNA ke RNA (**transkripsi**) dan dari RNA ke **protein** (**translasi**) terjadi di semua sel hidup.

Meskipun universalitas dogma pusat, ada variasi penting dalam cara informasi mengalir dari DNA ke protein. Yang terutama di antaranya adalah transkrip RNA dalam sel eukariotik tunduk pada serangkaian langkah pemrosesan di dalam nukleus, termasuk *penyambungan RNA*, sebelum diizinkan keluar dari nukleus dan diterjemahkan menjadi protein. Langkah-langkah pemrosesan ini dapat secara kritis mengubah "makna" dari molekul RNA dan karena itu sangat penting untuk memahami bagaimana sel eukariotik membaca genomnya. Akhirnya, meskipun kami fokus pada produksi protein yang dikodekan oleh genom dalam bab ini, kami melihat bahwa bagi banyak gen, RNA adalah produk akhir. Seperti protein, banyak dari RNA ini terlipat menjadi



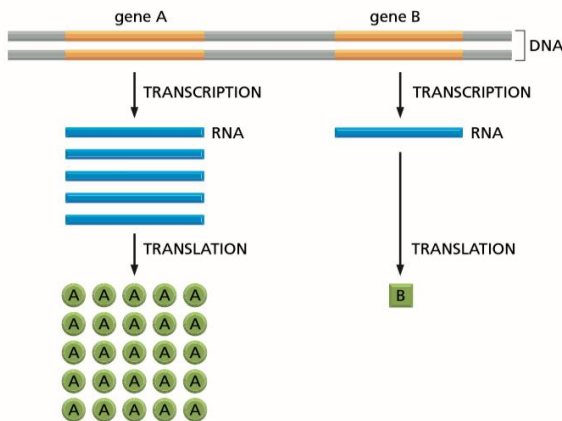
struktur tiga dimensi yang tepat yang memiliki peran struktural, katalitik, dan pengatur dalam sel.

Kita memulai bab ini dengan langkah pertama dalam mendekode genom: proses transkripsi di mana molekul RNA dihasilkan dari DNA suatu gen. Kami kemudian mengikuti nasib molekul RNA ini melalui sel, menyelesaikan ketika molekul protein terlipat dengan benar telah terbentuk. Pada akhir bab ini, kami mempertimbangkan bagaimana skema penyimpanan informasi yang cukup rumit saat ini, transkripsi, dan terjemahan mungkin muncul dari sistem yang lebih sederhana pada tahap awal evolusi sel.

## DARI DNA KE RNA

Transkripsi dan terjemahan adalah cara sel membaca, atau mengekspresikan, instruksi genetik dalam gen mereka. Karena banyak salinan RNA identik dapat dibuat dari gen yang sama, dan setiap molekul RNA dapat mengarahkan sintesis banyak molekul protein yang identik, Sel-sel dapat mensintesis sejumlah besar protein dengan cepat bila diperlukan. Tetapi setiap gen juga dapat ditranskripsi dan diterjemahkan dengan efisiensi yang berbeda,

memungkinkan sel untuk membuat sejumlah besar protein dan sejumlah kecil lainnya (**Gambar 3**). Selain itu, seperti yang kita lihat pada bab berikutnya, sel dapat mengubah (atau mengatur) ekspresi masing-masing gen sesuai dengan kebutuhan saat ini — paling umum dengan mengendalikan produksi RNA-nya.



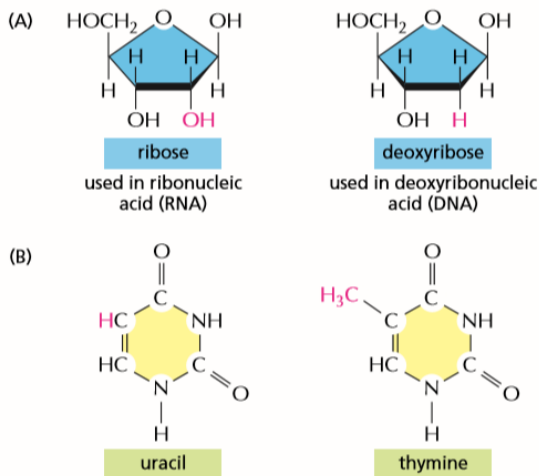
**Gambar 3** Layar dapat diekspresikan dengan efisiensi berbeda. Dalam contoh ini, gen A ditranskripsi dan diterjemahkan jauh lebih efisien daripada gen B. Hal Ini memungkinkan jumlah protein A dalam sel menjadi lebih besar daripada protein B.

## Bagian-bagian dari Urutan DNA Ditranskripsi menjadi RNA

Langkah pertama sel dalam membaca bagian yang diperlukan dari instruksi genetiknya adalah menyalin bagian tertentu dari urutan nukleotida DNA-nya suatu gen ke dalam urutan nukleotida RNA. Informasi dalam RNA, meskipun disalin ke dalam bentuk kimia lain, pada dasarnya masih ditulis dalam bahasa yang sama seperti pada DNA — bahasa dari urutan nukleotida. Oleh Karena itu nama nya **transkripsi**.

Seperti DNA, RNA adalah polimer linier yang terbuat dari empat jenis subunit nukleotida yang berbeda yang dihubungkan bersama oleh ikatan fosfodiester (**Gambar 4**). Ini berbeda dari DNA secara kimiawi dalam dua hal: (1) nukleotida dalam RNA adalah ribonukleotida yaitu mengandung gula ribosa (oleh karena itu disebut asam ribonukleat) daripada deoksiribosa; (2) meskipun, seperti DNA, RNA mengandung basa adenine (A), guanine (G), dan cytosine (C), mengandung urasil basa (U) bukan timin (T) dalam DNA. Karena U, seperti T, dapat membuat

pasangan basa dengan hidrogenbonding dengan A (**Gambar 5**), sifat pasangan basa komplementer yang dijelaskan untuk DNA dalam Bab 4 dan 5 berlaku juga untuk RNA (dalam RNA, pasangan G dengan C, dan pasangan A dengan U). Kami juga menemukan jenis pasangan basa lain dalam RNA: misalnya, G terkadang berpasangan dengan U.

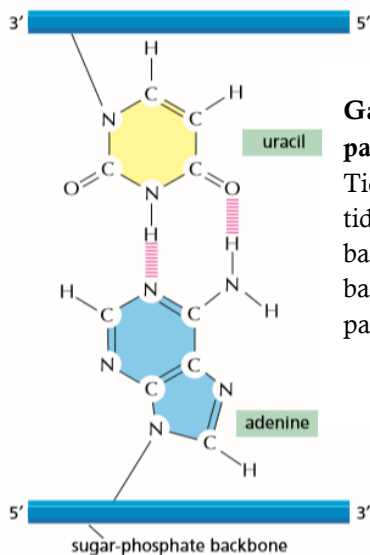


**Gambar 4. Struktur kimia RNA.** (A) RNA mengandung gula ribosa, yang berbeda dari deoksiribosa, gula yang digunakan dalam DNA, dengan adanya gugus  $-OH$  tambahan. (B) RNA mengandung urasil basa, yang berbeda dari timin, basa setara dalam DNA, dengan tidak adanya gugus  $-CH_3$ .

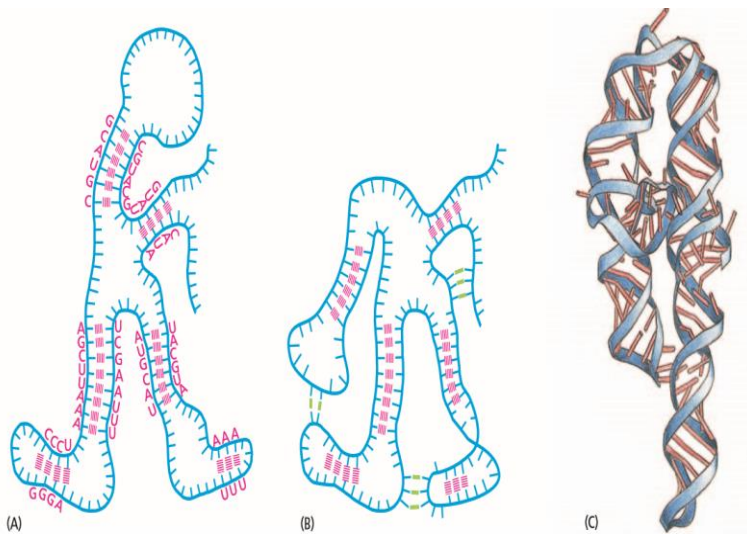
1 RNA

berbeda secara dramatis dalam struktur keseluruhan.

Sedangkan DNA selalu terjadi dalam sel sebagai heliks beruntai ganda, RNA adalah untaian tunggal. Oleh karena itu rantai RNA dapat dilipat menjadi bentuk tertentu, sama seperti rantai polipeptida terlipat untuk membentuk bentuk akhir protein (**Gambar-6**). Seperti yang kita lihat nanti dalam bab ini, kemampuan untuk melipat ke dalam bentuk tiga dimensi yang kompleks memungkinkan beberapa molekul RNA memiliki fungsi struktural dan katalitik yang tepat.



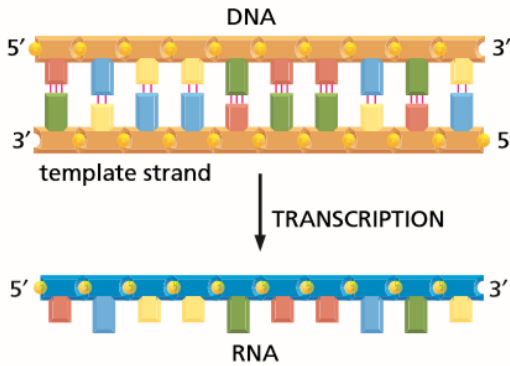
**Gambar 5. Urasil membentuk pasangan basa dengan adenin.** Tidak adanya gugus metil di U tidak berpengaruh pada pasangan basa; dengan demikian, pasangan basa U – A sangat mirip dengan pasangan basa T – A



**Gambar 6 RNA dapat dilipat ke dalam struktur tertentu.** RNA sebagian besar beruntai tunggal, tetapi sering mengandung bentangan pendek nukleotida yang dapat membentuk pasangan basa konvensional dengan urutan pelengkap yang ditemukan di tempat lain pada molekul yang sama. Interaksi-interaksi ini, bersama dengan interaksi pasangan-basa “non-konvensional” tambahan, memungkinkan molekul RNA melipat menjadi struktur tiga dimensi yang ditentukan oleh urutan nukleotida-nya. **<AATC>** (A) Diagram struktur RNA terlipat yang hanya memperlihatkan interaksi pasangan-basis konvensional. (B) Struktur dengan interaksi pasangan-basis konvensional (*merah*) dan non-konvensional (*hijau*). (C) Struktur RNA yang sebenarnya, bagian dari intron grup I (lihat Gambar 36). Setiap interaksi basa-pasangan konvensional ditandai dengan "anak tangga" dalam heliks ganda. Basis dalam konfigurasi lain ditunjukkan oleh anak tangga yang rusak.

## Transkripsi Menghasilkan RNA Komplementer untuk Satu Untai DNA

RNA dalam sel dibuat dari transkripsi DNA, suatu proses yang memiliki kesamaan tertentu dengan proses replikasi DNA yang dibahas pada Bab 5. Transkripsi dimulai dengan pembukaan dan pelepasan sebagian kecil dari heliks ganda DNA untuk mengekspos basis pada setiap untaian DNA. Salah satu dari dua untaian heliks ganda DNA kemudian bertindak sebagai contoh untuk sintesis molekul RNA. Seperti dalam replikasi DNA, urutan nukleotida rantai RNA ditentukan oleh pasangan basa komplementer antara nukleotida yang masuk dan cetakan DNA. Ketika kecocokan yang baik dibuat, ribonukleotida yang masuk secara kovalen terkait dengan rantai RNA yang tumbuh dalam reaksi yang dikatalisis secara enzimatik. Rantai RNA yang dihasilkan oleh transkripsi — *transkrip* — karena itu memanjang satu nukleotida pada suatu waktu, dan ia memiliki urutan nukleotida yang persis komplementer dengan untaian DNA yang digunakan sebagai contoh **(Gambar 7)**.

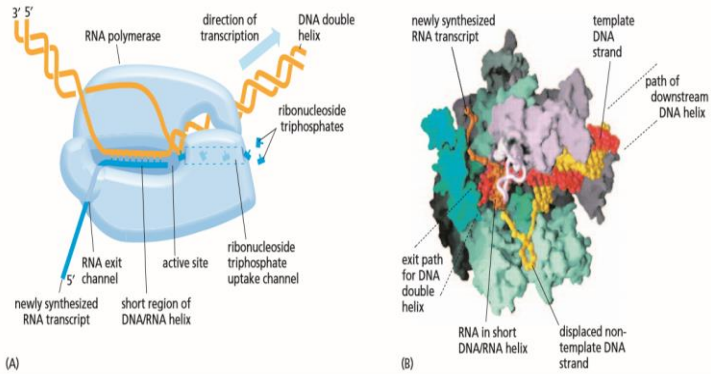


**Gambar 7. Transkripsi DNA** menghasilkan molekul RNA untai tunggal yang saling melengkapi dengan satu untai DNA

Transkripsi, bagaimanapun, berbeda dari replikasi DNA dalam beberapa cara penting. Tidak seperti untai DNA yang baru terbentuk, untai RNA tidak tetap terhidrogenasi dengan untai cetakan DNA. Sebaliknya, tepat di belakang wilayah dimana tempat ribonukleotida ditambahkan, rantai RNA dipindahkan dan DNA heliks kembali terbentuk. Dengan demikian, molekul RNA yang dihasilkan oleh transkripsi dilepaskan dari cetakan DNA sebagai untai tunggal. Selain itu, karena mereka disalin hanya dari wilayah DNA yang terbatas, Molekul RNA jauh lebih pendek daripada molekul DNA. Molekul DNA dalam kromosom manusia bisa mencapai 250 juta pasang nukleotida; sebaliknya, kebanyakan RNA tidak lebih dari beberapa ribu nukleotida, dan banyak yang lebih pendek



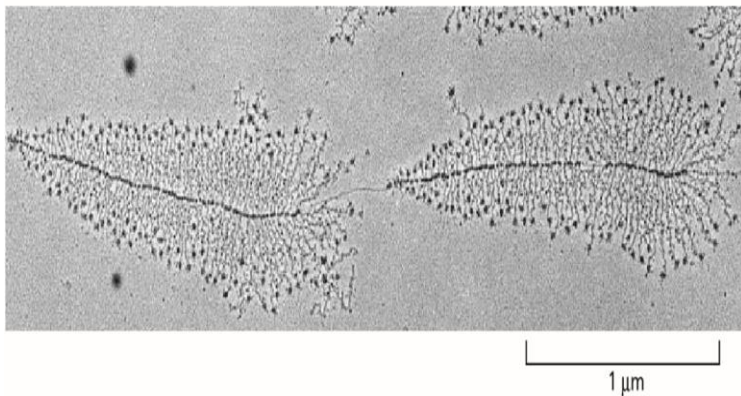
Enzim yang melakukan transkripsi disebut **RNA polimerase**. Seperti DNA polimerase yang mengkatalisasi replikasi DNA (dibahas pada Bab 5), RNA polimerase mengkatalisasi pembentukan ikatan fosfodiester yang menghubungkan nukleotida bersama untuk membentuk rantai linier. RNA polimerase bergerak bertahap di sepanjang DNA, membuka ikatan heliks DNA tepat di depan situs aktif untuk polimerisasi untuk mengekspos wilayah baru untai cetakan untuk pemasangan pasangan basa komplementer. Dari sini, rantai RNA yang tumbuh diperpanjang oleh satu nukleotida pada suatu waktu dalam arah 5'-3' (**Gambar 8**). Substratnya adalah nukleosida trifosfat (ATP, CTP, UTP, dan GTP); seperti dalam replikasi DNA, hidrolisis ikatan berenergi tinggi menyediakan energi yang dibutuhkan untuk mendorong reaksi ke depan (lihat Gambar 5-4).



**Gambar 8. DNA ditranskripsi oleh enzim RNA polimerase.** (A) RNA polimerase (biru pucat) bergerak bertahap di sepanjang DNA, melepaskan ikatan DNA helix di situs aktifnya. Saat berlangsung, polimerase menambahkan nukleotida (direpresentasikan sebagai bentuk "T" kecil) satu per satu ke rantai RNA di lokasi polimerisasi, menggunakan untai DNA yang terpapar sebagai contoh. Transkrip RNA dengan demikian merupakan salinan pelengkap dari salah satu dari dua untai DNA. Karenanya, wilayah pendek heliks DNA / RNA (panjangnya sekitar sembilan pasang nukleotida) hanya terbentuk secara sementara, dan "jendela" heliks DNA / RNA bergerak di sepanjang DNA dengan polimerase. Nukleotida yang masuk adalah dalam bentuk ribonukleosida trifosfat (ATP, UTP, CTP, dan GTP), dan energi yang tersimpan dalam ikatan fosfat-fosfatnya memberikan kekuatan pendorong untuk reaksi polimerisasi (lihat Gambar 5-4). (B) Struktur bakteri RNA polimerase, sebagaimana ditentukan oleh kristalografi sinar-x. Empat subunit yang berbeda, ditunjukkan oleh warna yang berbeda, terdiri dari RNA polimerase ini. Untai DNA yang digunakan sebagai contoh berwarna merah, dan untai non-contoh berwarna kuning. (A, diadaptasi dari Gambar milik Robert Landick; B, milik Seth Darst.)

Pelepasan untai RNA yang hampir segera dari DNA saat disintesis berarti bahwa banyak salinan RNA dapat

dibuat dari gen yang sama dalam waktu yang relatif singkat, dengan sintesis molekul RNA tambahan dimulai sebelum RNA pertama selesai (**Gambar 9**). Ketika molekul RNA polimerase mengikuti dengan keras pada tumit masing-masing dengan cara ini, masing-masing bergerak sekitar 20 nukleotida per detik (kecepatan dalam eukariota), lebih dari seribu transkrip dapat disintesis dalam satu jam dari satu gen.



**Gambar 9 Transkripsi dua gen seperti yang diamati di bawah mikroskop elektron.** Mikrograf menunjukkan banyak molekul RNA polimerase secara bersamaan menyalin masing-masing dari dua gen yang berdekatan. Molekul RNA polimerase terlihat sebagai serangkaian titik di sepanjang DNA dengan transkrip yang baru disintesis (benang halus) yang melekat padanya. Molekul RNA (RNA ribosom) yang ditunjukkan dalam contoh ini tidak diterjemahkan ke dalam protein tetapi sebaliknya digunakan langsung sebagai komponen ribosom, mesin di mana

terjemahan berlangsung. Partikel-partikel di ujung 5 '(ujung bebas) dari setiap transkrip rRNA diyakini mencerminkan permulaan perakitan ribosom. Dari panjang transkrip yang baru disintesis, dapat disimpulkan bahwa molekul RNA polimerase mentranskripsi dari kiri ke kanan. (Atas perkenan Ulrich Scheer.)

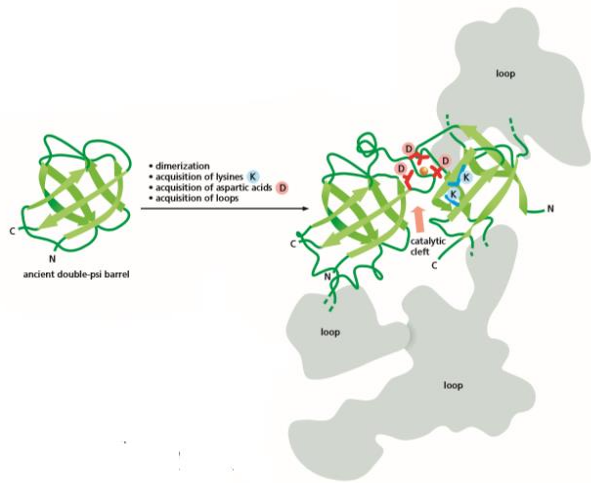
Meskipun RNA polimerase pada dasarnya mengkatalisis reaksi kimia yang sama dengan DNA polimerase, ada beberapa perbedaan penting antara aktivitas kedua enzim. *Pertama*, dan yang paling jelas, RNA polimerase mengkatalisasi hubungan ribonukleotida, bukan deoksiribonukleotida. *Kedua*, tidak seperti DNA polimerase yang terlibat dalam replikasi DNA, RNA polimerase dapat memulai rantai RNA tanpa primer. Perbedaan ini mungkin ada karena transkripsi tidak perlu seakurat replikasi DNA (lihat Tabel 5-1, hal. 271). Tidak seperti DNA, RNA tidak secara permanen menyimpan informasi genetik dalam sel. RNA polimerase membuat sekitar satu kesalahan untuk setiap  $10^4$  nukleotida yang disalin ke dalam RNA (dibandingkan dengan tingkat kesalahan untuk penyalinan langsung oleh DNA polimerase sekitar satu dalam  $10^7$  nukleotida), dan konsekuensi dari kesalahan dalam

transkripsi RNA jauh kurang signifikan daripada dalam replikasi DNA.

Meskipun RNA polimerase hampir tidak seakurat polimerase DNA yang mereplikasi DNA, mereka tetap memiliki mekanisme proofreading sederhana. Jika ribonukleotida yang salah ditambahkan ke rantai RNA yang tumbuh, polimerase dapat kembali, dan situs aktif enzim dapat melakukan reaksi eksisi yang menyerupai kebalikan dari reaksi polimerisasi kecuali bahwa air sebagai pengganti pirofosfat digunakan dan nukleosida monofosfat dilepaskan.

Mengingat bahwa DNA dan RNA polimerase, keduanya melakukan polimerisasi nukleotida yang bergantung pada contoh, mungkin diharapkan bahwa kedua jenis enzim tersebut akan terkait secara struktural. Namun, studi kristalografi x-ray dari kedua jenis enzim mengungkapkan bahwa, selain mengandung ion  $Mg^{2+}$  kritis di situs katalitik, mereka hampir tidak berhubungan satu sama lain; memang enzim nukleotida yang bergantung pada contoh tampaknya telah muncul secara independen dua kali selama evolusi awal sel. Satu garis keturunan mengarah pada DNA polimerase modern dan transkriptase terbalik yang

dibahas pada Bab 5, serta beberapa polimerase RNA subunit tunggal dari virus. Silsilah lainnya membentuk semua polimerase RNA seluler modern (**Gambar 10**), yang akan kita bahas dalam bab ini.



**Gambar 10 Evolusi RNA polimerase seluler modern.** Menurut hipotesis ini, RNA polimerase berevolusi dari domain protein kuno, yang disebut barrel psi ganda. Langkah-langkah evolusi penting diperkirakan mencakup dimerisasi domain, penyisipan "loop" polipeptida besar, akuisisi dua lisin penting yang diperlukan untuk memposisikan contoh, dan akuisisi tiga asam aspartat yang diperlukan untuk mengkelat magnesium di lokasi aktif. Skema ini menggambarkan evolusi dua subunit terbesar RNA polimerase, yang membentuk situs aktif enzim. Struktur yang diperlihatkan  $\beta$  adalah subunit band  $\beta'$  dari enzim *E. coli*, tetapi subunit yang sesuai dari enzim eukariotik berhubungan erat. (Diadaptasi dari L.M. Iyer, E.V. Koonin dan L. Aravind, *BMC Struct. Biol.* 3: 1, 2003.)

## Sel Menghasilkan Beberapa Jenis RNA

Mayoritas gen yang dibawa dalam DNA sel menentukan urutan asam amino protein; molekul RNA yang disalin dari gen ini (yang akhirnya mengarahkan sintesis protein) disebut molekul **messenger RNA (mRNA)**. Namun, produk akhir dari sebagian kecil gen adalah RNA itu sendiri. Analisis cermat dari urutan DNA lengkap genom ragi *S. cerevisiae* telah menemukan lebih dari 750 gen (agak lebih dari 10% dari jumlah total gen ragi) yang menghasilkan RNA sebagai produk akhir mereka. RNA ini, seperti protein, berfungsi sebagai komponen enzimatik dan struktural untuk berbagai proses di dalam sel. Pada Bab 5 kami menemukan salah satu RNA itu, contoh yang dibawa oleh enzim telomerase. Meskipun banyak dari RNA nonkoding ini masih misterius, kita akan melihat dalam bab ini bahwa *molekul RNA nuklir kecil (snRNA)* mengarahkan penyambungan pra-mRNA untuk membentuk mRNA, bahwa molekul *RNA ribosom (rRNA)* membentuk inti dari ribosom, dan bahwa *mentransfer molekul RNA (tRNA)* membentuk adaptor yang memilih asam amino dan

menahannya pada ribosom untuk dimasukkan ke dalam protein. Akhirnya, kita akan melihat di Bab 7 bahwa *molekul microRNA (miRNA)* dan *molekul kecil yang mengganggu RNA (siRNA)* berfungsi sebagai pengatur utama ekspresi gen eukariotik (**Tabel 1**).

Setiap segmen DNA yang ditranskripsi disebut *unit transkripsi*. Dalam eucaryotes, unit transkripsi biasanya membawa informasi hanya satu gen, dan oleh karena itu mengkode molekul RNA tunggal atau protein tunggal (atau kelompok protein terkait jika transkrip RNA awal disambungkan dalam lebih dari satu cara untuk menghasilkan mRNA yang berbeda. Pada bakteri, satu set gen yang berdekatan sering ditranskripsi sebagai satu unit; molekul mRNA yang dihasilkan membawa informasi untuk beberapa protein berbeda.

Secara keseluruhan, RNA membentuk beberapa persen dari berat kering sel. Sebagian besar RNA dalam sel adalah rRNA; mRNA hanya terdiri dari 3-5% dari total RNA dalam sel mamalia yang khas. Populasi mRNA terdiri dari puluhan ribu spesies yang berbeda, dan rata-rata hanya ada 10-15 molekul setiap spesies mRNA yang ada di setiap sel.



**Tabel 1 Jenis RNA Khusus yang Diproduksi dalam Sel**

<b>JENIS RNA</b>	<b>FUNGSI</b>
mRNAs	Messenger RNA, kode untuk protein
rRNAs	RNA ribosom, membentuk struktur dasar ribosom dan mengkatalisis sintesis protein
tRNAs	Mentransfer RNAs, pusat sintesis protein sebagai adaptor antara mRNA dan asam amino
snRNAs	RNA nuklir kecil, berfungsi dalam berbagai proses nuklir, termasuk penyambungan pra-mRNA
snoRNAs	RNA nukleolar kecil, digunakan untuk memproses dan memodifikasi rRNA secara kimia
snoRNAs	RNA nukleolar kecil, digunakan untuk memproses dan memodifikasi rRNA secara kimia

scaRNAs	RNA cajal kecil, digunakan untuk memodifikasi snoRNA dan snRNA
miRNAs	MicroRNAs, mengatur ekspresi gen biasanya dengan memblokir terjemahan mRNA selektif
siRNAs	RNA kecil yang mengganggu, matikan ekspresi gen dengan mengarahkan degradasi mRNA selektif dan pembentukan struktur kromatin padat
RNA nonkoding lainnya	Fungsi dalam berbagai proses sel, termasuk sintesis telomer, inaktivasi kromosom X, dan pengangkutan protein ke ER

## Sinyal yang Dikodekan dalam DNA Memberi tahu RNA Polymerase Dimana untuk Mulai dan Berhenti

Untuk menyalin gen secara akurat, RNA polimerase harus mengenali dari mana genom memulai dan di mana

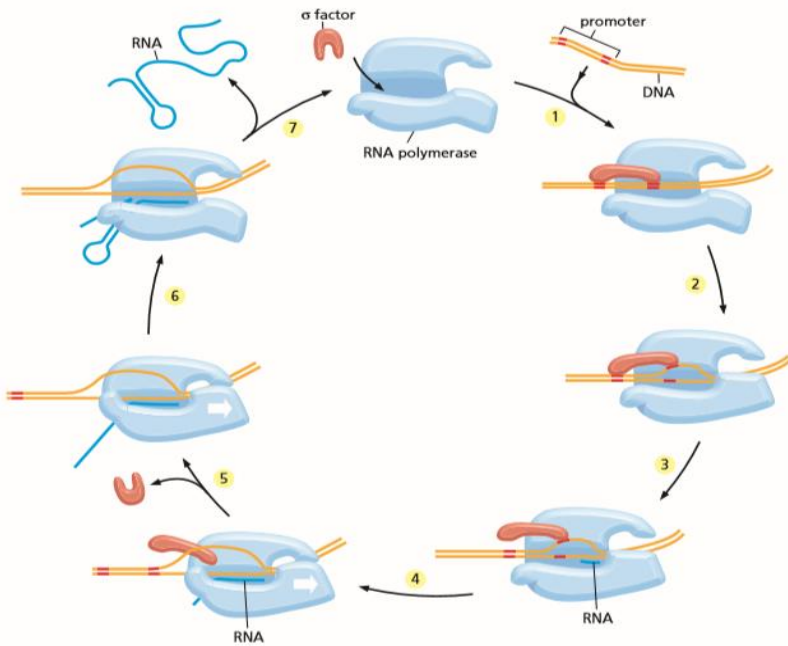
harus selesai. Cara RNA polimerase melakukan tugas-tugas ini agak berbeda antara bakteri dan eukariota. Karena proses pada bakteri lebih sederhana, kami membahasnya terlebih dahulu.

Inisiasi transkripsi merupakan langkah yang sangat penting dalam ekspresi gen karena merupakan titik utama di mana sel mengatur protein mana yang akan diproduksi dan pada tingkat berapa. Enzim inti RNA polimerase bakteri adalah kompleks multisubunit yang mensintesis RNA menggunakan contoh DNA sebagai panduan. Subunit yang dapat dilepas yang disebut *faktor sigma* ( $\sigma$ ) berasosiasi dengan enzim inti dan membantunya membaca sinyal dalam DNA yang menentukan di mana ia harus mulai **menyalin (Gambar 11)**. Bersama,  $\sigma$  faktor dan enzim inti dikenal sebagai **holoenzyme RNA polimerase**; kompleks ini hanya melekat lemah pada DNA bakteri ketika keduanya bertabrakan, dan holoenzyme biasanya meluncur dengan cepat di sepanjang molekul DNA yang panjang sampai berdisosiasi kembali. Namun, ketika holoenzyme polimerase meluncur ke suatu wilayah pada heliks ganda DNA yang disebut **promoter**, urutan nukleotida khusus yang

menunjukkan titik awal untuk sintesis RNA, polimerase berikatan erat dengan DNA ini. Holoenzim polimerase, melalui faktornya, mengenali sekuens DNA promotor dengan membuat kontak spesifik dengan bagian-bagian basa yang terpapar di luar heliks (langkah 1 pada Gambar 11).

Setelah holoenzyme RNA polimerase berikatan erat dengan DNA promotor dengan cara ini, holoenzim RNA polimerase terbuka untuk mengekspos bentangan nukleotida pada setiap untai (langkah 2 pada Gambar 11). Tidak seperti reaksi DNA helicase (lihat Gambar 5-14), pembukaan helix yang terbatas ini tidak memerlukan energi hidrolisis ATP. Sebagai gantinya, polimerase dan DNA keduanya mengalami perubahan struktural yang dapat dibalik yang menghasilkan keadaan yang lebih baik secara energetik daripada pengikatan awal. Dengan DNA yang tidak terurai, salah satu dari dua untai DNA yang terpapar bertindak sebagai contoh untuk pemasangan pasangan basa komplementer dengan ribonukleotida yang masuk, dua di antaranya bergabung bersama oleh polimerase untuk memulai rantai RNA (langkah 3 pada Gambar 11). Setelah sepuluh atau lebih nukleotida RNA pertama telah disintesis

(proses yang relatif tidak efisien selama polimerase mensintesis dan membuang oligomer RNA pendek), enzim inti memutuskan interaksinya dengan DNA promotor, melemahkan interaksinya dengan faktor  $\sigma$ , dan mulai bergerak menuruni DNA, mensintesis RNA (langkah 4 dan 5 pada Gambar 11). Pemanjangan rantai berlanjut (pada kecepatan sekitar 50 nukleotida / detik untuk RNA polimerase bakteri) sampai enzim menemukan sinyal kedua dalam DNA, **terminator** (dijelaskan di bawah), di mana polimerase berhenti dan melepaskan kedua rantai RNA yang baru dibuat dan Contoh DNA (langkah 7 pada Gambar 11). Setelah enzim inti polimerase dilepaskan pada terminator, enzim tersebut bekerja sama dengan  $\sigma$  faktor bebas untuk membentuk holoenzim yang dapat memulai proses transkripsi lagi



**Gambar 11 Siklus transkripsi bakteri RNA polimerase.** Pada langkah 1, holoenzyme RNA polimerase (enzim inti polimerase ditambah sfaktor) berkumpul dan kemudian mencari promotor (lihat Gambar 12). Polimerase melepaskan DNA pada posisi di mana transkripsi akan dimulai (langkah 2) dan mulai menyalin (langkah 3). Sintesis RNA awal ini (kadang-kadang disebut "inisiasi gagal") relatif tidak efisien. Namun, begitu RNA polimerase berhasil mensintesis sekitar 10 nukleotida RNA, ia memutuskan interaksinya dengan DNA promotor dan melemahkan, dan akhirnya memutuskan interaksinya dengan  $\sigma$ . Polimerase sekarang bergeser ke mode elongasi sintesis RNA (langkah 4), bergerak ke kanan sepanjang DNA dalam diagram ini. Selama mode perpanjangan

(langkah 5), transkripsi sangat prosesif, dengan polimerase meninggalkan templat DNA dan melepaskan RNA yang baru ditranskripsi hanya ketika bertemu dengan sinyal terminasi (langkah 6 dan 7). Sinyal terminasi biasanya dikodekan dalam DNA, dan banyak fungsi dengan membentuk struktur RNA yang mengganggu kestabilan pegangan polimerase pada RNA (langkah 7). Pada bakteri, semua molekul RNA disintesis oleh satu jenis RNA polimerase dan oleh karena itu siklus yang digambarkan dalam gambar berlaku untuk produksi mRNA serta RNA struktural dan katalitik. (Diadaptasi dari figur yang berasal dari Robert Landick.)

Proses inisiasi transkripsi kompleks dan mensyaratkan bahwa RNA polimerase holoenzyme dan DNA mengalami serangkaian perubahan konformasi. Kita dapat melihat perubahan ini sebagai membuka dan memposisikan DNA di situs aktif diikuti oleh pengetatan enzim di sekitar DNA dan RNA untuk memastikan bahwa itu tidak berdisosiasi sebelum selesai menyalin gen. Jika RNA polimerase terdisosiasi sebelum waktunya, ia tidak dapat melanjutkan sintesis tetapi harus memulai dari awal lagi pada promotor.

Bagaimana sinyal terminasi dalam DNA menghentikan polimerase memanjang? Untuk sebagian besar gen bakteri, sinyal terminasi terdiri dari serangkaian pasangan nukleotida A-T yang didahului oleh urutan DNA simetris dua kali lipat, yang ketika ditranskripsi menjadi

RNA, dilipat ke dalam struktur "jepit rambut" melalui pairing pasangan Watson-Crick (lihat Gambar 11). Ketika polimerase mentranskripsikan melintasi terminator, pembentukan jepit rambut dapat membantu untuk "menarik" transkrip RNA dari situs aktif. Hibrid DNA-RNA di situs aktif, yang disatukan di terminator yang didominasi oleh pasangan basa U-A (yang kurang stabil dibandingkan pasangan basa G-C karena mereka membentuk dua daripada tiga ikatan hidrogen per pasangan basa), tidak cukup kuat untuk menahan RNA di tempatnya, dan terdisosiasi menyebabkan pelepasan polimerase dari DNA (langkah 7 pada Gambar 11). Dengan demikian, dalam beberapa hal, pemutusan transkripsi tampaknya melibatkan pembalikan transisi struktural yang terjadi selama inisiasi. Proses penghentian juga merupakan contoh tema umum dalam bab ini: pelipatan RNA ke dalam struktur spesifik mempengaruhi banyak langkah dalam mendekode genom.

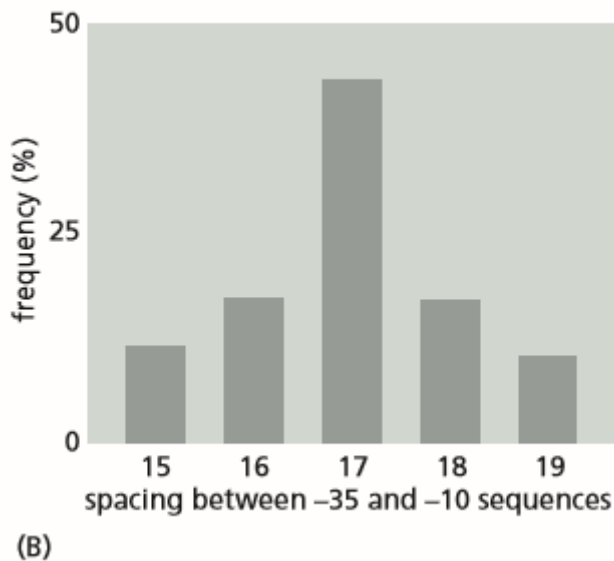
## **Sinyal Mulai dan Berhenti Transkripsi Heterogen dalam Urutan Nukleotida**



Seperti yang baru saja kita lihat, proses inisiasi dan terminasi transkripsi melibatkan serangkaian transisi struktural yang rumit dalam molekul protein, DNA, dan RNA. Sinyal yang dikodekan dalam DNA yang menentukan transisi ini seringkali sulit untuk dikenali oleh para peneliti. Memang, perbandingan banyak promotor bakteri yang berbeda mengungkapkan tingkat variasi yang mengejutkan. Namun demikian, semuanya mengandung sekuens terkait, mencerminkan sebagian aspek DNA yang dikenali langsung oleh faktor  $\sigma$ . Ciri-ciri umum ini sering dirangkum dalam bentuk *urutan konsensus* (**Gambar 12**). **Urutan nukleotida konsensus** diperoleh dengan membandingkan banyak urutan dengan fungsi dasar yang sama dan menghitung nukleotida yang paling umum ditemukan di setiap posisi. Karena itu berfungsi sebagai ringkasan atau "rata-rata" dari sejumlah besar urutan nukleotida individu.

Urutan DNA dari masing-masing promotor bakteri berbeda dalam cara yang menentukan kekuatan mereka (jumlah peristiwa inisiasi per unit waktu promotor). Proses evolusi telah menyelaraskan masing-masing untuk memulai sesering yang diperlukan dan dengan demikian telah

menciptakan spektrum yang luas dari para promotor. Promotor untuk gen yang mengkode protein berlimpah jauh lebih kuat daripada yang terkait dengan gen yang mengkode protein langka, dan urutan nukleotida mereka bertanggung jawab atas perbedaan ini.



**Gambar 12 Urutan konsensus untuk kelas utama *E. coli* promotor.** (A) Promotor ditandai oleh dua sekuens DNA heksamerik, urutan -35 dan urutan -10 yang dinamai berdasarkan perkiraan lokasi mereka relatif terhadap titik awal transkripsi (ditunjuk +1). Untuk kenyamanan, urutan nukleotida dari untai tunggal DNA ditunjukkan; pada kenyataannya RNA polimerase mengenali promotor sebagai DNA beruntai ganda. Atas dasar perbandingan 300 promotor, frekuensi dari empat nukleotida pada setiap posisi dalam hexamers -35 dan -10 diberikan. Urutan

konsensus, yang ditunjukkan di bawah grafik, mencerminkan nukleotida yang paling umum ditemukan pada setiap posisi dalam kumpulan promotor. Urutan nukleotida antara hexamers -35 dan -10 tidak menunjukkan kesamaan yang signifikan di antara promotor. (B) Distribusi jarak antara hexamers -35 dan -10 ditemukan di promotor *E. coli*

Informasi yang ditampilkan dalam dua grafik ini berlaku untuk promotor *E. coli* yang diakui oleh RNA polimerase dan  $\sigma$  faktor utama (ditunjuk  $\sigma^{70}$ ). Seperti yang akan kita lihat pada bab berikutnya, bakteri juga mengandung faktor-faktor kecil, yang masing-masing mengenali urutan promotor yang berbeda. Beberapa promotor yang sangat kuat yang dikenali oleh RNA polimerase dan  $\sigma^{70}$  memiliki urutan tambahan, yang terletak di hulu (ke kiri, dalam gambar) dari hexamer -35, yang dikenali oleh subunit lain dari RNA polimerase.

Seperti promotor bakteri, terminator transkripsi juga memiliki berbagai urutan, dengan potensi untuk membentuk struktur RNA jepit rambut sederhana yang menjadi fitur umum yang paling penting. Karena sekuens nukleotida yang jumlahnya hampir tak terbatas memiliki potensi ini, sekuens terminator bahkan lebih heterogen daripada sekuens promotor.

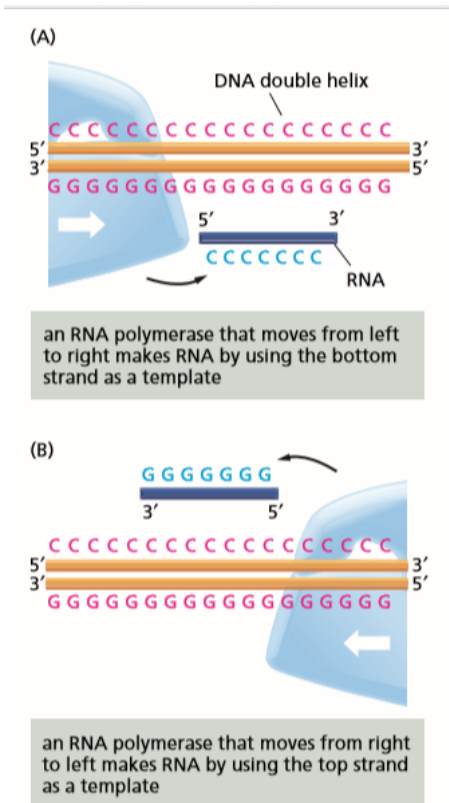
Kami telah membahas promotor dan terminator bakteri dalam beberapa detail untuk mengilustrasikan poin penting mengenai analisis sekuens genom. Meskipun kita tahu banyak tentang promotor dan terminator bakteri dan

dapat membangun urutan konsensus yang meringkas fitur yang paling menonjol, variasi mereka dalam urutan nukleotida membuatnya sulit untuk menemukan mereka secara definitif hanya dengan menganalisis urutan nukleotida genom. Bahkan lebih sulit untuk menemukan urutan analog dalam genom eukariotik, sebagian karena kelebihan DNA yang dibawa di dalamnya. Seringkali, kita memerlukan informasi tambahan, beberapa di antaranya dari eksperimen langsung, untuk menemukan dan secara akurat menafsirkan sinyal DNA pendek yang terkandung dalam genom.

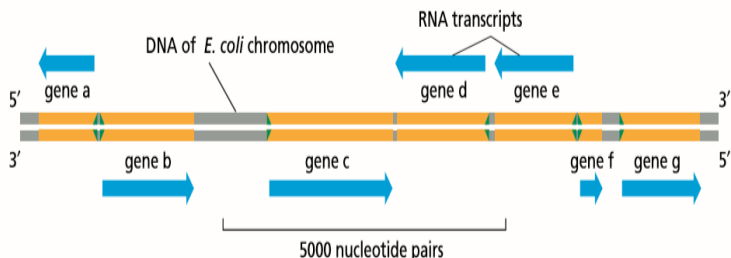
Karena DNA beruntai ganda, pada dasarnya dua molekul RNA yang berbeda dapat ditranskripsi dari gen manapun, menggunakan masing-masing dari dua untai DNA sebagai contoh. Namun, gen biasanya hanya memiliki satu promotor, dan karena sekuen nukleotida promotor bersifat asimetris (lihat Gambar 12), polimerase dapat mengikat hanya dalam satu orientasi. Polimerase mensintesis RNA dalam arah 5'-3', dan karena itu hanya dapat menyalin satu untai per gen (**Gambar 13**). Urutan genom mengungkapkan bahwa untai DNA yang digunakan

sebagai contoh untuk sintesis RNA bervariasi dari gen ke gen tergantung pada lokasi dan orientasi promotor (**Gambar 14**).

Setelah mempertimbangkan transkripsi pada bakteri, kita sekarang beralih ke situasi pada eucaryotes, di mana sintesis molekul RNA adalah urusan yang jauh lebih rumit.



**Gambar 13 Pentingnya orientasi RNA polimerase.** Untai DNA yang berfungsi sebagai contoh harus dilalui dalam arah 3'-5'. Dengan demikian, arah gerakan RNA polimerase menentukan yang mana dari dua untai DNA yang berfungsi sebagai contoh untuk sintesis RNA, seperti yang ditunjukkan pada (A) dan (B). Arah polimerase, pada gilirannya, ditentukan oleh orientasi urutan promotor, situs di mana RNA polimerase memulai transkripsi.



**Gambar 14. Arah transkripsi sepanjang bagian pendek dari kromosom bakteri.** Beberapa gen ditranskripsi menggunakan satu untai DNA sebagai contoh, sementara yang lain ditranskripsi menggunakan untai DNA lainnya. Arah transkripsi ditentukan oleh promotor pada awal setiap gen (panah hijau). Diagram ini menunjukkan sekitar 0,2% (9000 pasangan basa) dari kromosom *E. coli*. Gen yang ditranskripsi dari kiri ke kanan menggunakan untai DNA bawah sebagai contoh; yang ditranskripsikan dari kanan ke kiri menggunakan strand atas sebagai contoh.

## Inisiasi Transkripsi pada Eucaryotes Membutuhkan Banyak Protein

Berbeda dengan bakteri, yang mengandung satu jenis RNA polimerase, inti eukariotik memiliki tiga: *RNA polimerase I*, *RNA polimerase II*, dan *RNA polimerase III*. Tiga polimerase secara struktural mirip satu sama lain (dan dengan enzim bakteri) dan berbagi beberapa subunit yang sama, tetapi mereka menuliskan berbagai jenis gen (**Tabel-**

2). RNA polimerase I dan III mentranskripsikan gen yang mengkode RNA transfer, RNA ribosom, dan berbagai RNA kecil. RNA polimerase II mentranskripsikan sebagian besar gen, termasuk semua gen yang mengkode protein, dan diskusi selanjutnya kami berfokus pada enzim ini.

**Tabel-2 Tiga RNA Polymerase dalam Sel Eukariotik**

JENIS POLIMERASE	DUPLIKAT GEN
RNA polimerase I	5.8S, 18S, dan 28S rRNA gen
RNA polimerase II	Semua gen penyandi protein, ditambah snoRNAgen, gen miRNA, gen siRNA, dan sebagian besar gen snRNA
RNA polimerase III	gen tRNA, gen 5S rRNA, beberapa gen snRNA dan gen untuk RNA kecil lainnya

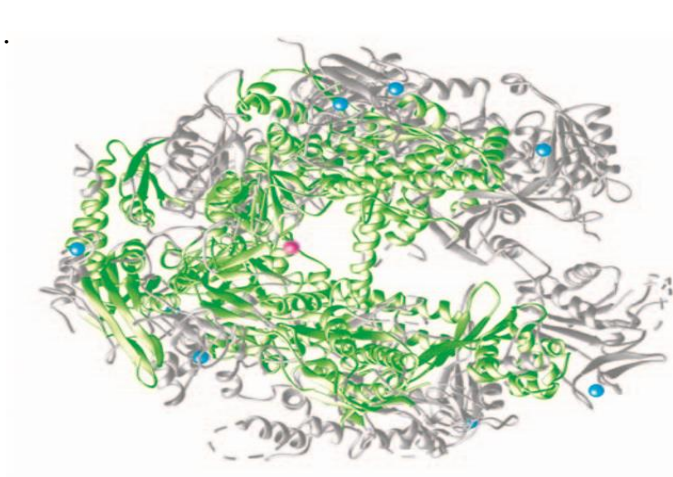
rRNA diberi nama sesuai dengan nilai "S" mereka, yang merujuk pada tingkat sedimentasi mereka dalam ultrasentrifuge. Semakin besar nilai S, semakin besar rRNA.

1. Sementara RNA polimerase bakteri hanya membutuhkan satu protein tambahan (faktor) untuk inisiasi transkripsi terjadi secara *in vitro*, RNA polimerase eukariotik membutuhkan banyak

protein tambahan, secara kolektif disebut faktor transkripsi umum.

2. Inisiasi transkripsi eukariotik harus berurusan dengan pengemasan DNA menjadi nukleosom dan bentuk struktur kromatin tingkat tinggi, fitur yang tidak ada pada kromosom bakteri.

Meskipun RNA polimerase II eukariotik memiliki banyak kesamaan struktural dengan RNA polimerase bakteri (**Gambar 15**), ada beberapa perbedaan penting dalam cara di mana fungsi bakteri dan eukariotik berfungsi, dua di antaranya menjadi perhatian kita segera



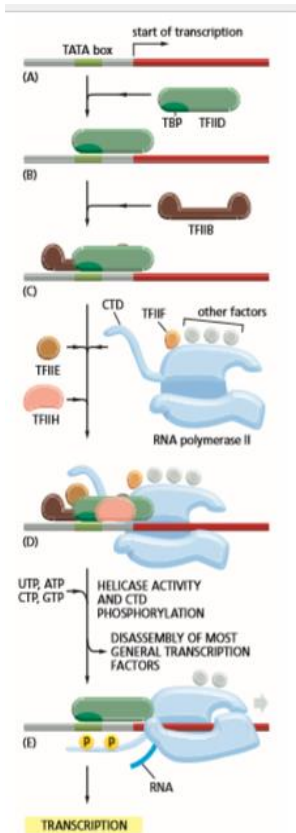


**Gambar 15. Kesamaan struktural antara RNA polimerase bakteri dan RNA polimerase II eukariotik.** Daerah dua RNA polimerase yang memiliki struktur serupa ditunjukkan dalam warna *hijau*. Eukariotik polimerase lebih besar dari enzim bakteri (12 subunit bukannya 5), dan beberapa daerah tambahan ditunjukkan dalam warna *abu-abu*. Bola biru mewakili atom Zn yang berfungsi sebagai komponen struktural dari polimerase, dan bola merah mewakili atom Mg yang ada di situs aktif, tempat polimerisasi berlangsung RNA polimerase dalam semua sel modern (bakteri, archaea, dan eucaryotes) terkait erat, menunjukkan bahwa fitur dasar enzim berada di tempat sebelum divergensi dari tiga cabang utama kehidupan. (Atas perkenan P. Cramer dan R. Kornberg.)

## RNA Polymerase II Membutuhkan Faktor Transkripsi Umum

**Faktor transkripsi umum** membantu memposisikan RNA polimerase eukariotik dengan benar pada promotor, membantu memisahkan dua untai DNA untuk memungkinkan transkripsi dimulai, dan melepaskan RNA polimerase dari promotor ke mode perpanjangan begitu transkripsi dimulai. <CTAT> Proteinnya "umum" karena dibutuhkan di hampir semua promotor yang digunakan oleh RNA polimerase II; terdiri dari satu set protein yang berinteraksi, mereka ditunjuk sebagai *TFII* (untuk faktor transkripsi untuk polimerase II), dan dilambangkan secara

sewenang-wenang sebagai TFIIB, TFIID, dan sebagainya. Dalam arti luas, faktor-faktor transkripsi umum eukariotik menjalankan fungsi yang setara dengan faktor-faktor dalam bakteri; memang, bagian dari TFIIF memiliki struktur tiga dimensi yang sama dengan bagian yang setara dari  $\sigma$ .



**Gambar 16. Inisiasi transkripsi gen eukariotik oleh RNA polimerase II.** Untuk memulai transkripsi, RNA polimerase memerlukan beberapa faktor transkripsi umum. (A) Promotor berisi sekuens DNA yang disebut kotak **TATA**, yang terletak 25 nukleotida dari situs di mana transkripsi dimulai. (B) Melalui subunit TBPnya, TFIID mengenali dan mengikat kotak TATA, yang kemudian memungkinkan pengikatan TFIIB (C) yang berdekatan. Untuk kesederhanaan, distorsi DNA yang dihasilkan oleh pengikatan TFIID (lihat Gambar 18) tidak diperlihatkan. (D) Sisa faktor transkripsi umum, serta RNA polimerase itu sendiri, berkumpul di promotor. (E) TFIIF kemudian menggunakan ATP untuk mencabut heliks ganda DNA pada titik awal transkripsi, secara lokal memperlihatkan untai cetakan. TFIIF juga memfosforilasi RNA polimerase II, mengubah konformasi sehingga polimerase dilepaskan dari faktor umum dan dapat memulai fase pemanjangan transkripsi. Seperti yang ditunjukkan, situs

fosforilasi adalah ekor polipeptida terminal-C yang panjang, juga disebut domain terminal-C (CTD), yang memanjang dari molekul polimerase.

Skema perakitan yang ditunjukkan pada gambar disimpulkan dari percobaan yang dilakukan secara *in vitro*, dan urutan yang tepat di mana faktor transkripsi umum berkumpul pada promotor dapat bervariasi dari gen ke gen *in vivo*. Faktor transkripsi umum telah sangat dilestarikan dalam evolusi; beberapa di antaranya dari sel manusia dapat diganti dalam percobaan biokimia oleh faktor yang sesuai dari ragi sederhana

**Gambar 16** mengilustrasikan bagaimana faktor transkripsi umum berkumpul di promotor yang digunakan oleh RNA polimerase II, dan **Tabel-3** merangkum kegiatan mereka. Proses perakitan dimulai ketika faktor transkripsi umum TFIID berikatan dengan urutan DNA heliks ganda pendek yang utamanya terdiri dari nukleotida T dan A. Karena alasan ini, urutan ini dikenal sebagai urutan TATA, atau **kotak TATA**, dan subunit TFIID yang mengenalinya disebut TBP (untuk protein yang mengikat TATA). Kotak TATA biasanya terletak 25 nukleotida di hulu dari situs awal transkripsi. Ini bukan satu-satunya sekuens DNA yang memberi sinyal dimulainya transkripsi (**Gambar 17**), tetapi bagi sebagian besar promotor polimerase II, ini adalah yang paling penting. Pengikatan TFIID menyebabkan distorsi besar pada DNA kotak TATA (**Gambar 18**). Distorsi ini dianggap berfungsi sebagai tengerang fisik untuk lokasi promotor aktif di tengah-tengah genom yang sangat besar,

dan itu membawa sekuens DNA pada kedua sisi distorsi bersama-sama untuk memungkinkan langkah-langkah perakitan protein berikutnya. Faktor-faktor lain kemudian berkumpul, bersama dengan RNA polimerase II, untuk membentuk kompleks inisiasi transkripsi lengkap (lihat Gambar 16). Faktor transkripsi umum yang paling rumit adalah TFIID. Terdiri dari 9 subunit, hampir sama besar dengan RNA polimerase II itu sendiri, dan seperti yang akan kita lihat sebentar lagi, melakukan beberapa langkah enzimatik yang diperlukan untuk memulai transkripsi.

**Tabel-3 Faktor Transkripsi Umum yang Dibutuhkan untuk Inisiasi Transkripsi oleh Eukariotik RNA Polymerase II**

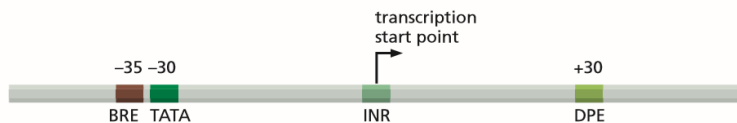
Nama	Nama Jumlah Sub-Unit	Peran Inisiasi Transisi
TFIID TBP Subunit TAF Subunits	1 ~ 11	Mengenali kotak TATA Mengenali urutan DNA lain di dekat titik awal transkripsi; mengatur pengikatan DNA oleh TBP

TFIIB	1	Mengenali elemen BRE dalam promotor; secara akurat menempatkan RNA polimerase di tempat awal transkripsi
TFIIF	3	Menstabilkan interaksi RNA polimerase dengan TBP dan TFIIB; membantu menarik TFIIE dan TFIIH
TFIIE	2	Menarik dan mengatur TFIIH
TFIIH	9	Membuka DNA pada titik awal transkripsi, memfosforilasi Ser5 dari RNA polimerase CTD; melepaskan RNA polimerase dari promotor

TFIID terdiri dari TBP dan ~ 11 subunit tambahan yang disebut TAF (faktor terkait TBP); CTD, domain terminal-C.

Setelah membentuk kompleks inisiasi transkripsi pada DNA promotor, RNA polimerase II harus mendapatkan akses ke untai contoh pada titik awal transkripsi. TFIIH, yang mengandung DNA helicase sebagai salah satu subunitnya, memungkinkan langkah ini dengan

menghidrolisis ATP dan melepaskan DNA, sehingga membuka untai cetakan. Selanjutnya, RNA polimerase II, seperti bakteri polimerase, tetap berada pada promotor mensintesis RNA dengan panjang pendek sampai mengalami serangkaian perubahan konformasi yang memungkinkannya untuk menjauh dari promotor dan memasuki fase pemanjangan transkripsi. Langkah kunci dalam transisi ini adalah penambahan gugus fosfat ke "ekor" RNA polimerase (dikenal sebagai domain CTD atau terminal-C). Pada manusia, CTD terdiri dari 52 ulangan tandem dari urutan tujuh asam amino, yang meluas dari struktur inti RNA polimerase. Selama inisiasi transkripsi, serin yang terletak di posisi kelima dalam urutan berulang (Ser5) difosforilasi oleh TFIIH, yang mengandung protein kinase di subunitnya yang lain (lihat Gambar 16D dan E). Polimerase kemudian dapat melepaskan diri dari kelompok faktor transkripsi umum. Selama proses ini, ia mengalami serangkaian perubahan konformasi yang mempererat interaksinya dengan DNA, dan ia memperoleh protein baru yang memungkinkannya untuk menyalin jarak jauh, dan dalam beberapa kasus selama berjam-jam, tanpa memisahkan diri dari DNA



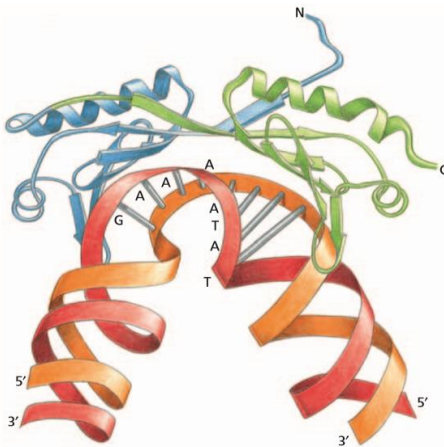
element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

**Gambar 17 Urutan konsensus ditemukan di sekitar titik awal RNA polimerase II eukariotik.** Nama yang diberikan untuk setiap urutan konsensus (kolom pertama) dan faktor transkripsi umum yang mengenalinya (kolom terakhir) ditunjukkan. N menunjukkan adanya nukleotida, dan dua nukleotida yang dipisahkan oleh garis miring menunjukkan probabilitas yang sama dari kedua nukleotida tersebut pada posisi yang ditunjukkan. Pada kenyataannya, setiap urutan konsensus adalah representasi singkatan dari histogram yang mirip dengan Gambar 12.

Untuk sebagian besar titik awal transkripsi RNA polimerase II, hanya dua atau tiga dari empat urutan yang ada. Misalnya, banyak promotor polimerase II memiliki urutan kotak TATA, tetapi mereka yang biasanya tidak memiliki urutan INR "kuat". Meskipun sebagian besar sekuens DNA yang mempengaruhi inisiasi transkripsi terletak di hulu dari titik awal transkripsi, beberapa, seperti DPE yang ditunjukkan pada gambar, terletak di wilayah transkripsi.

Setelah polimerase II mulai memanjang, transkrip RNA, sebagian besar faktor transkripsi umum dilepaskan

dari DNA sehingga mereka tersedia untuk memulai putaran transkripsi lain dengan molekul RNA polimerase baru. Seperti yang kita lihat sebentar lagi, fosforilasi ekor RNA polimerase II juga menyebabkan komponen mesin pemrosesan RNA memuat ke polimerase dan dengan demikian diposisikan untuk memodifikasi RNA yang baru ditranskripsi ketika muncul dari polimerase.



**Gambar 18 Struktur tiga dimensi TBP (protein pengikat TATA) terikat pada DNA.** TBP adalah subunit dari faktor transkripsi umum TFIID yang bertanggung jawab untuk mengenali dan mengikat urutan kotak TATA dalam DNA (merah). Pembengkokan DNA unik yang disebabkan oleh TBP — dua kekusutan dalam heliks ganda yang dipisahkan oleh sebagian DNA yang tidak terurai — dapat berfungsi sebagai tengara yang membantu menarik faktor transkripsi umum lainnya. TBP adalah rantai polipeptida tunggal yang dilipat menjadi dua

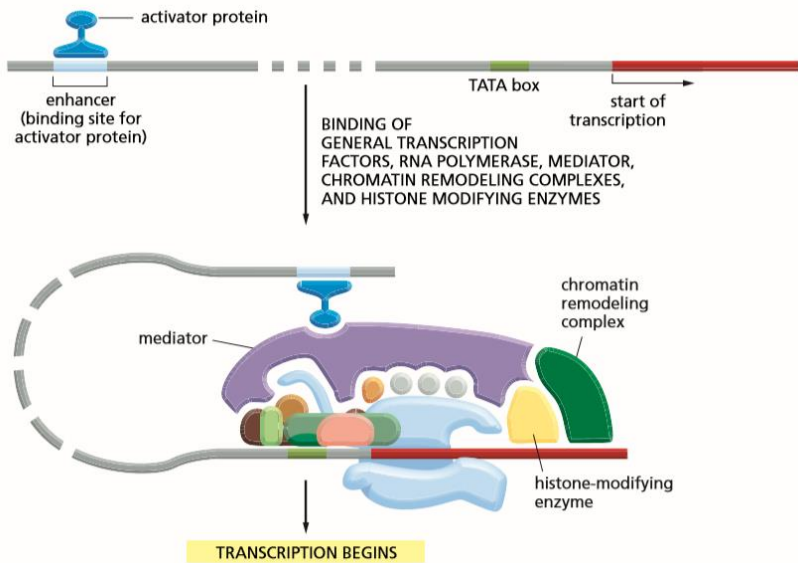


domain yang sangat mirip (biru dan hijau). (Diadaptasi dari J.L. Kim et al., Nature 365: 520–527, 1993. Dengan izin dari Macmillan Publishers Ltd.)

## **Polymerase II Juga Membutuhkan Aktivator, Mediator, dan Protein Pemodifikasi Chromatin**

Studi tentang perilaku RNA polimerase II dan faktor transkripsi umum pada contoh DNA murni secara *in vitro* membentuk model untuk inisiasi transkripsi yang baru saja dijelaskan. Namun, seperti yang dibahas pada Bab 4, DNA dalam sel eukariotik dikemas menjadi nukleosom, yang selanjutnya diatur dalam struktur kromatin tingkat tinggi. Akibatnya, inisiasi transkripsi dalam sel eukariotik lebih kompleks dan membutuhkan lebih banyak protein daripada pada DNA murni. Pertama, protein pengatur gen yang dikenal sebagai *aktivator transkripsional* harus mengikat urutan spesifik dalam DNA dan membantu menarik RNA polimerase II ke titik awal transkripsi (**Gambar –19**). Kami membahas peran aktivator dalam Bab 7, karena mereka adalah salah satu cara utama di mana sel mengatur ekspresi gen mereka. Di sini kami hanya mencatat bahwa kehadiran mereka pada DNA diperlukan untuk inisiasi transkripsi

dalam sel eukariotik. Kedua, inisiasi transkripsi eukariotik *in vivo* membutuhkan adanya kompleks protein yang dikenal sebagai *Mediator*, yang memungkinkan protein aktivator untuk berkomunikasi dengan baik dengan polimerase II dan dengan faktor transkripsi umum. Akhirnya, inisiasi transkripsi dalam sel eukariotik biasanya membutuhkan rekrutmen lokal dari enzim pemodifikasi kromatin, termasuk kompleks remodeling kromatin dan enzim pemodifikasi histon. Seperti dibahas pada Bab 4, kedua jenis enzim ini dapat memungkinkan akses yang lebih besar ke DNA yang ada dalam kromatin, dan dengan demikian, mereka memfasilitasi perakitan mesin inisiasi transkripsi ke dalam DNA. Kami akan meninjau kembali peran enzim ini dalam inisiasi transkripsi di Bab 7.



**Gambar 19** Inisiasi transkripsi oleh RNA polimerase II dalam sel eukariotik. Inisiasi transkripsi in vivo membutuhkan adanya protein aktivator transkripsional. Seperti dijelaskan dalam Bab 7, protein-protein ini berikatan dengan urutan pendek spesifik dalam DNA. Meskipun hanya satu yang ditampilkan di sini, gen eukariotik khas memiliki banyak protein aktivator, yang bersama-sama menentukan laju dan pola transkripsi. Kadang-kadang bertindak dari jarak beberapa ribu pasangan nukleotida (ditunjukkan oleh molekul DNA putus-putus), protein pengatur gen ini membantu RNA polimerase, faktor transkripsi umum, dan mediator semuanya berkumpul di promotor. Selain itu, aktivator menarik kompleks remodeling kromatin ATP dan asetilen yang bergantung pada ATP.

Seperti dibahas dalam Bab 4, keadaan "default" chromatin mungkin adalah filamen 30-nm (lihat Gambar 4-22), dan ini kemungkinan merupakan bentuk DNA yang menjadi dasar transkripsi. Untuk kesederhanaan, itu tidak ditampilkan dalam gambar.

Seperti diilustrasikan dalam Gambar 19, banyak protein (lebih dari 100 subunit individu) harus berkumpul pada titik awal transkripsi untuk memulai transkripsi dalam sel eukariotik. Urutan perakitan protein ini tampaknya tidak mengikuti jalur yang ditentukan; alih-alih, urutannya berbeda dari gen ke gen. Memang, beberapa kompleks protein yang berbeda ini dapat berinteraksi satu sama lain menjauh dari DNA dan dibawa ke DNA sebagai subassemblies yang telah dibentuk sebelumnya. Untuk mulai menyalin, RNA polimerase II harus dilepaskan dari protein kompleks yang besar ini, dan, di samping langkah-langkah yang dijelaskan dalam Gambar 16, ini sering memerlukan proteolisis *in situ* dari protein aktivator. Kami kembali ke beberapa masalah ini di Bab 7, di mana kami membahas bagaimana sel eukariotik dapat mengatur proses inisiasi transkripsi.

### **Pemanjangan Transkripsi Menghasilkan Ketegangan Superhelis dalam DNA**

Setelah memulai transkripsi, RNA polimerase tidak berjalan dengan lancar di sepanjang molekul DNA; alih-alih,

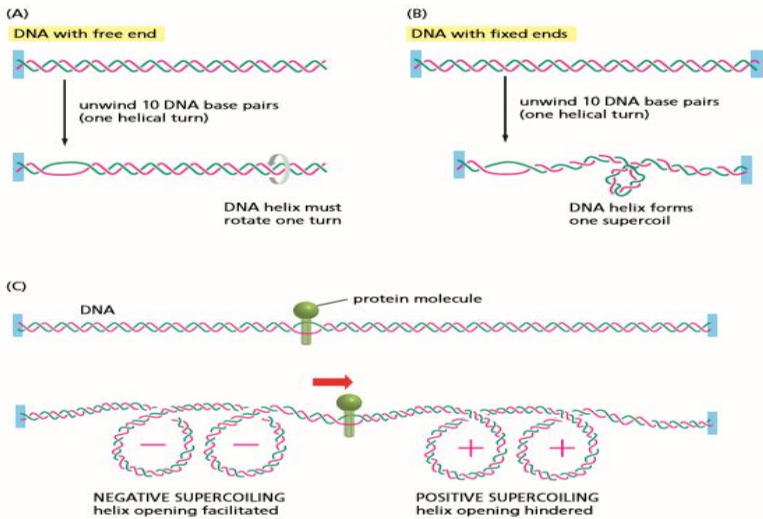
ia bergerak tersentak-sentak, berhenti pada beberapa urutan dan dengan cepat menyalin melalui yang lain. RNA polimerase memanjang, baik bakteri maupun eukariotik, dikaitkan dengan serangkaian faktor perpanjangan, protein yang mengurangi kemungkinan RNA polimerase akan berdisosiasi sebelum mencapai akhir gen. Faktor-faktor ini biasanya terkait dengan RNA polimerase tak lama setelah inisiasi dan membantu polimerase untuk bergerak melalui berbagai sekuens DNA berbeda yang ditemukan dalam gen. Polimerase RNA eukariotik juga harus bersaing dengan struktur kromatin ketika mereka bergerak di sepanjang cetakan DNA, dan mereka biasanya dibantu oleh kompleks remodeling kromatin yang bergantung pada ATP (lihat hal. 215–216). Kompleks ini dapat bergerak dengan polimerase atau hanya mencari dan menyelamatkan polimerase terhenti sesekali. Selain itu, beberapa faktor perpanjangan yang terkait dengan RNA polimerase eukariotik memfasilitasi transkripsi melalui nukleosom tanpa memerlukan energi tambahan. Belum dipahami secara rinci bagaimana hal ini dilakukan, tetapi protein-protein ini dapat secara sementara mengeluarkan dimer H2A-H2B dari inti nukleosom,

menggantikannya ketika polimerase bergerak melalui nukleosom.

Masih ada penghalang lain untuk memperpanjang polimerase, baik bakteri dan eukariotik. Untuk membahas masalah ini, pertama-tama kita perlu mempertimbangkan sifat halus yang melekat dalam heliks ganda DNA yang disebut **DNA supercoiling**. Supercoiling DNA merupakan konformasi yang diadopsi oleh DNA sebagai respons terhadap ketegangan superhelical; sebaliknya, membuat berbagai loop atau gulungan di helix dapat menciptakan ketegangan seperti itu. Gambar 20 menggambarkan kendala topologi yang menyebabkan supercoiling DNA. Ada sekitar 10 pasangan nukleotida untuk setiap belokan heliks dalam heliks ganda DNA. Bayangkan sebuah helix yang kedua ujungnya tetap terkait satu sama lain (seperti mereka berada dalam lingkaran DNA, seperti kromosom bakteri, atau dalam lingkaran yang dijepit ketat, seperti yang diperkirakan ada dalam kromosom eukariotik). Dalam hal ini, satu supercoil DNA besar akan terbentuk untuk mengimbangi setiap 10 pasangan nukleotida yang dibuka (tidak dicabut). Pembentukan supercoil ini sangat menguntungkan karena

mengembalikan lilitan heliks normal ke daerah berpasangan-basa yang tersisa, yang jika tidak perlu perlu dilindas karena ujung yang tetap.

RNA polimerase juga menciptakan ketegangan superhelical saat bergerak sepanjang bentangan DNA yang berlabuh di ujungnya (lihat Gambar 20C). Selama polimerase tidak bebas berputar dengan cepat (dan rotasi seperti itu tidak mungkin diberikan dengan ukuran RNA polimerase dan transkrip terlampir), polimerase yang bergerak menghasilkan ketegangan superhelical positif pada DNA di depannya dan ketegangan heliks negatif di belakangnya. Untuk eucaryotes, situasi ini dianggap memberikan bonus: ketegangan superhelical positif di depan polimerase membuat heliks DNA lebih sulit untuk dibuka, tetapi ketegangan ini harus memfasilitasi pembukaan DNA dalam nukleosom, seperti pelepasan DNA dari inti histone membantu mengendurkan ketegangan superhelical positif



**Gambar 20 Ketegangan superhel dalam DNA menyebabkan superkoiling DNA.** (A) Untuk molekul DNA dengan satu ujung bebas (atau nick in one strand yang berfungsi sebagai swivel), heliks ganda DNA berputar dengan satu putaran untuk setiap 10 pasangan nukleotida yang dibuka. (B) Jika rotasi dicegah, ketegangan superhelical dimasukkan ke dalam DNA dengan pembukaan heliks. Salah satu cara mengakomodasi ketegangan ini adalah dengan meningkatkan putaran heliks ganda yang tersisa; DNA helix, bagaimanapun, tahan deformasi seperti itu dengan cara seperti musim semi, lebih memilih untuk meredakan ketegangan superhelical dengan membungkuk ke loop supercoiled. Akibatnya, satu supercoil DNA terbentuk dalam heliks ganda DNA untuk setiap 10 pasangan nukleotida yang dibuka. Supercoil yang terbentuk dalam hal ini adalah supercoil positif. (C) Supercoiling DNA diinduksi oleh pelacakan protein melalui heliks ganda DNA. Kedua



ujung DNA yang ditunjukkan di sini tidak dapat berputar secara bebas relatif satu sama lain, dan molekul protein diasumsikan juga dicegah agar tidak berputar bebas saat bergerak. Dalam kondisi ini, pergerakan protein menyebabkan kelebihan heliks untuk menumpuk di heliks DNA di depan protein dan defisit heliks untuk muncul di DNA di belakang protein, seperti yang ditunjukkan.

Setiap protein yang mendorong dirinya sendiri di sepanjang untai DNA heliks ganda cenderung menghasilkan ketegangan superhelical. Pada eucaryotes, enzim topoisomerase DNA dengan cepat menghilangkan ketegangan superhelical ini (lihat hal. 278). Tetapi pada bakteri topoisomerase khusus yang disebut DNA girase menggunakan energi hidrolisis ATP untuk memompa superkoil secara terus-menerus ke dalam DNA, sehingga mempertahankan DNA di bawah tekanan konstan. Ini adalah *supercoils negatif*, memiliki kebalikan dari *supercoils positif* yang terbentuk ketika wilayah heliks DNA terbuka (lihat Gambar 20B). Setiap kali heliks terbuka, ia akan menghilangkan superkoil negatif ini dari DNA bakteri, mengurangi ketegangan superhelical. Oleh karena itu, DNA girase menjadikan pembukaan heliks DNA pada bakteri lebih menguntungkan dibandingkan dengan pembukaan heliks pada DNA yang tidak superkoil. Untuk alasan ini,

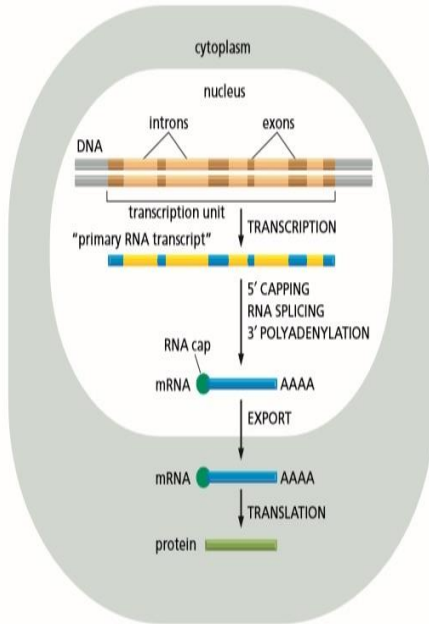
biasanya memfasilitasi proses genetik pada bakteri, termasuk inisiasi transkripsi oleh bakteri RNA polimerase, yang membutuhkan pembukaan heliks (lihat Gambar 11).

### **Perpanjangan Transkripsi Pada Eukariota sangat erat dengan Pemrosesan RNA**

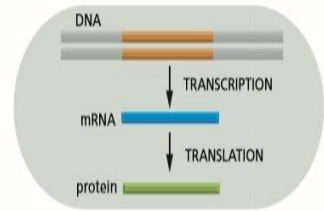
Kita telah melihat bahwa mRNA bakteri disintesis semata-mata oleh RNA polimerase yang dimulai dan berhenti pada titik-titik spesifik pada genom. Situasi pada eucaryotes sangat berbeda. Secara khusus, transkripsi hanyalah yang pertama dari beberapa langkah yang diperlukan untuk menghasilkan mRNA. Langkah penting lainnya adalah modifikasi kovalen dari ujung RNA dan penghapusan urutan intron yang dibuang dari tengah transkrip RNA oleh proses penyambungan RNA (Gambar –

21)

(A) EUCARYOTES

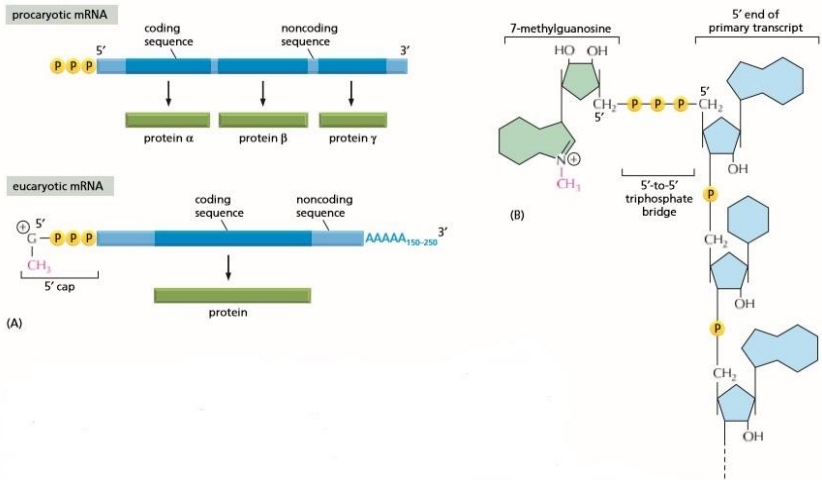


(B) PROCARYOTES



**Gambar 21 Ringkasan langkah-langkah yang mengarah dari gen ke protein pada eucaryotes dan bakteri.** Tingkat akhir protein dalam sel tergantung pada efisiensi setiap langkah dan pada tingkat degradasi RNA dan molekul protein. (A) Dalam sel eukariotik, molekul RNA yang dihasilkan dari transkripsi mengandung urutan pengkodean (exon) dan noncoding (intron). Sebelum dapat diterjemahkan menjadi protein, kedua ujung RNA dimodifikasi, intron dihilangkan oleh reaksi splicing RNA yang dikatalisis secara enzimatik, dan mRNA yang dihasilkan diangkut dari inti ke sitoplasma. Meskipun langkah-langkah dalam gambar ini digambarkan sebagai terjadi satu per satu, secara berurutan, pada kenyataannya mereka dapat terjadi secara bersamaan. Misalnya, tutup RNA ditambahkan dan splicing biasanya dimulai sebelum

transkripsi selesai. Karena hubungan antara transkripsi dan pemrosesan RNA, transkrip primer — RNA yang akan, secara teori, diproduksi jika tidak ada pemrosesan yang terjadi — hanya jarang ditemukan. (B) Dalam procaryotes, produksi mRNA jauh lebih sederhana. Ujung 5' dari molekul mRNA diproduksi oleh inisiasi transkripsi, dan ujung 3' diproduksi oleh terminasi transkripsi. Karena sel procaryotic tidak memiliki nukleus, transkripsi dan translasi terjadi di kompartemen umum. Faktanya, terjemahan mRNA bakteri sering dimulai sebelum sintesisnya selesai.



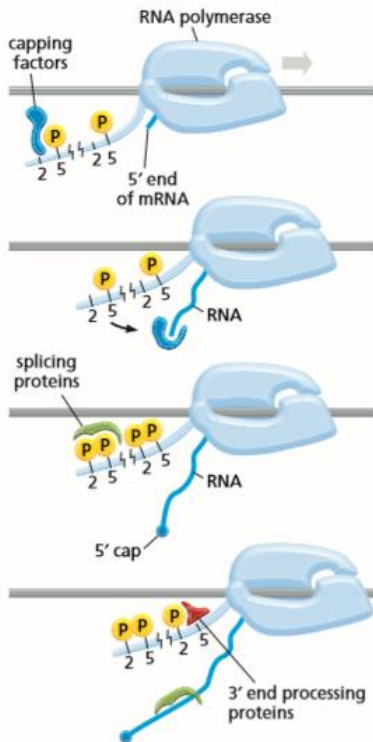
**Gambar 22 perbandingan struktur molekul mRNA procaryotic dan eukariotik.** (A) Ujung 5' dan 3' dari mRNA bakteri adalah ujung rantai yang tidak dimodifikasi yang disintesis oleh RNA polimerase, yang masing-masing menginisiasi dan mengakhiri transkripsi pada titik-titik tersebut. Ujung yang sesuai dari mRNA eukariotik dibentuk dengan menambahkan 5' cap dan dengan pembelahan transkrip pra-mRNA dan penambahan ekor poli-A, masing-masing. Gambar tersebut juga menggambarkan perbedaan lain antara mRNA procaryotic dan

eukariotik: mRNA bakteri dapat berisi instruksi untuk beberapa protein yang berbeda, sedangkan mRNA eukariotik hampir selalu berisi informasi hanya untuk satu protein tunggal. (B) Struktur tutup pada ujung 5' dari molekul mRNA eukariotik. Perhatikan keterkaitan 5'-ke-5' yang tidak biasa dari 7-metil G dengan sisa RNA. Banyak mRNA eukariotik membawa modifikasi tambahan: kelompok 2-hidroksil pada gula ribosa kedua dalam mRNA dimetilasi (tidak diperlihatkan).

Kedua ujung mRNA eukariotik dimodifikasi: dengan *membatasi* pada ujung 5' dan dengan *polyadenylation* dari ujung 3' (**Gambar 22**). Ujung-ujung khusus ini memungkinkan sel untuk menilai apakah kedua ujung molekul mRNA hadir (dan karena itu pesannya utuh) sebelum mengekspor urutan RNA dari nukleus dan menerjemahkannya menjadi protein. Penyambungan RNA menggabungkan bagian-bagian berbeda dari urutan pengkodean protein, dan memberikan kemampuan eucaryotes yang lebih tinggi dengan kemampuan untuk mensintesis beberapa protein berbeda dari gen yang sama.

Mekanisme cerdas memasang semua langkah pemrosesan RNA di atas untuk pemanjangan transkripsi. Seperti dibahas sebelumnya, langkah kunci dalam inisiasi transkripsi oleh RNA polimerase II adalah fosforilasi ekor RNA polimerase II, yang disebut CTD (domain C-terminal).

Fosforilasi ini berlangsung secara bertahap ketika RNA polimerase memulai transkripsi dan bergerak di sepanjang DNA. Ini tidak hanya membantu memisahkan RNA polimerase II dari protein lain yang ada pada titik awal transkripsi, tetapi juga memungkinkan satu set protein baru untuk dikaitkan dengan ekor RNA polimerase yang berfungsi dalam pemanjangan transkripsi dan pemrosesan RNA. Seperti yang dibahas selanjutnya, beberapa protein pemrosesan ini tampaknya "melompat" dari ekor polimerase ke molekul RNA yang baru lahir untuk mulai memprosesnya ketika muncul dari RNA polimerase. Dengan demikian, kita dapat melihat RNA polimerase II dalam mode perpanjangannya sebagai pabrik RNA yang mentranskripsi DNA menjadi RNA dan memproses RNA yang dihasilkannya (**Gambar 23**). Diperpanjang penuh, CTD hampir 10 kali lebih lama dari sisa RNA polimerase dan, pada dasarnya, berfungsi sebagai penambat, menahan berbagai protein di dekatnya hingga dibutuhkan. Strategi ini, yang mempercepat laju reaksi selanjutnya, adalah salah satu yang biasa diamati dalam sel (lihat Gambar 4-69 dan 16-38).



**Gambar 23. Eukariotik RNA polimerase II sebagai “pabrik RNA.”**

Ketika polimerase mentranskripsi DNA menjadi RNA, ia membawa protein pemrosesan-mRNA pada ekornya yang ditransfer ke RNA yang baru lahir pada waktu yang tepat. Ekor, yang dikenal sebagai CTD, mengandung 52 ulangan tandem dari urutan tujuh asam amino, dan ada dua serin di setiap ulangan. Protein capping pertama-tama mengikat ekor RNA polimerase ketika dip memfosforilasi pada Ser5 heptad yang diulang terlambat dalam proses inisiasi transkripsi (lihat Gambar 16). Strategi ini memastikan bahwa molekul RNA dibatasi secara efisien segera setelah ujung 5' muncul dari RNA polimerase. Sebagai polimerase terus menyalin, ekornya secara luas terfosforilasi pada posisi Ser2 oleh

kinase yang terkait dengan polimerase memanjang dan akhirnya mengalami defosforilasi pada posisi Ser5. Modifikasi lebih lanjut ini menarik splicing dan 3' pemrosesan akhir protein ke polimerase bergerak, memposisikan mereka untuk bertindak pada RNA yang baru disintesis ketika muncul dari RNA polimerase. Ada banyak enzim pemrosesan RNA, dan tidak semua berjalan dengan polimerase. Untuk penyambungan RNA, misalnya, ekor hanya membawa beberapa komponen penting; sekali ditransfer ke molekul RNA, mereka berfungsi sebagai situs nukleasi untuk komponen yang tersisa.

Ketika RNA polimerase II selesai menyalin gen, ia dilepaskan dari DNA, fosfatase larut menghilangkan fosfat pada ekornya, dan dapat memulai kembali transkripsi. Hanya bentuk RNA polimerase II terdefosforilasi yang kompeten untuk memulai sintesis RNA pada promotor.

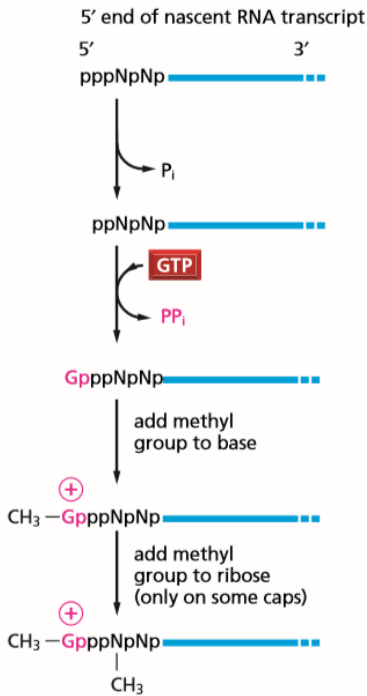
## **RNA Capping Adalah Modifikasi Pertama Pre-mRNA Eukariotik**

Begitu RNA polimerase II telah menghasilkan sekitar 25 nukleotida RNA, ujung 5' dari molekul RNA baru dimodifikasi dengan penambahan penutup yang terdiri dari nukleotida guanin yang dimodifikasi (lihat Gambar 22B). Tiga enzim, bertindak secara berurutan, melakukan reaksi pembatasan: satu (fosfat) menghilangkan fosfat dari ujung 5' RNA yang baru lahir, yang lain (transfer guanyl) menambahkan GMP dalam hubungan balik (sebagai gantinya 5' menjadi 5' dari 5' hingga 3'), dan yang ketiga



(metil transferase) menambahkan gugus metil ke guanosin **(Gambar 24)**. Karena ketiga enzim mengikat ekor RNA polimerase terfosforilasi pada posisi serin-5, modifikasi yang ditambahkan oleh TFIIF selama inisiasi transkripsi, mereka siap untuk memodifikasi 5' ujung transkrip yang baru lahir segera setelah muncul dari polimerase.

Tutup 5'-metil menandakan ujung 5' mRNA eukariotik, dan landmark ini membantu sel untuk membedakan mRNA dari jenis molekul RNA lain yang ada dalam sel. Sebagai contoh, RNA polimerase I dan III menghasilkan RNA yang tidak tertutup selama transkripsi, sebagian karena polimerase ini tidak memiliki CTD. Dalam nukleus, tutup mengikat kompleks protein yang disebut CBC (kompleks pengikat tutup), yang, seperti yang akan kita bahas di bagian selanjutnya, membantu RNA diproses dan diekspor dengan benar. Tutup 5'-metil juga memiliki peran penting dalam penerjemahan mRNA dalam sitosol, seperti yang akan kita bahas nanti dalam bab ini.

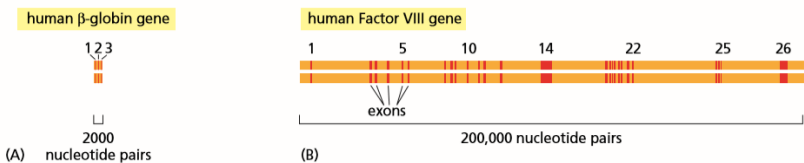


**Gambar 24. Reaksi yang membatasi ujung 5' dari**

**setiap molekul RNA yang disintesis oleh RNA polimerase II.** Penutup akhir berisi tautan baru 5'-ke-5' antara residu 7-metil G bermuatan positif dan ujung 5' dari transkrip RNA (lihat Gambar –22B). Huruf N mewakili salah satu dari empat ribonukleotida, meskipun nukleotida yang memulai rantai RNA biasanya berupa purin (A atau G). (Setelah A.J. Shatkin, *BioEssays* 7: 275-277, 1987. Dengan izin dari ICSU Press.)

## Penyambungan RNA Menghapus Urutan Intron dari Pr-mRNA yang Baru Ditranskripsi

Seperti dibahas pada Bab 4, urutan pengkodean protein dari gen eukariotik biasanya terganggu oleh urutan intervensi nonkode (intron). Ditemukan pada tahun 1977, fitur gen eukariotik ini mengejutkan para ilmuwan, yang sampai saat itu, hanya mengenal gen bakteri, yang biasanya terdiri dari rangkaian terus menerus pengkodean DNA yang secara langsung ditranskripsi menjadi mRNA. Dalam kontras yang ditandai, gen eukariotik ditemukan dipecah menjadi potongan-potongan kecil dari urutan pengkodean (*urutan yang diekspresikan* atau **ekson**) diselingi dengan *urutan intervensi* yang lebih lama atau **intron**; dengan demikian, bagian pengkodean gen eukariotik seringkali hanya sebagian kecil dari panjang gen (**Gambar 25**).



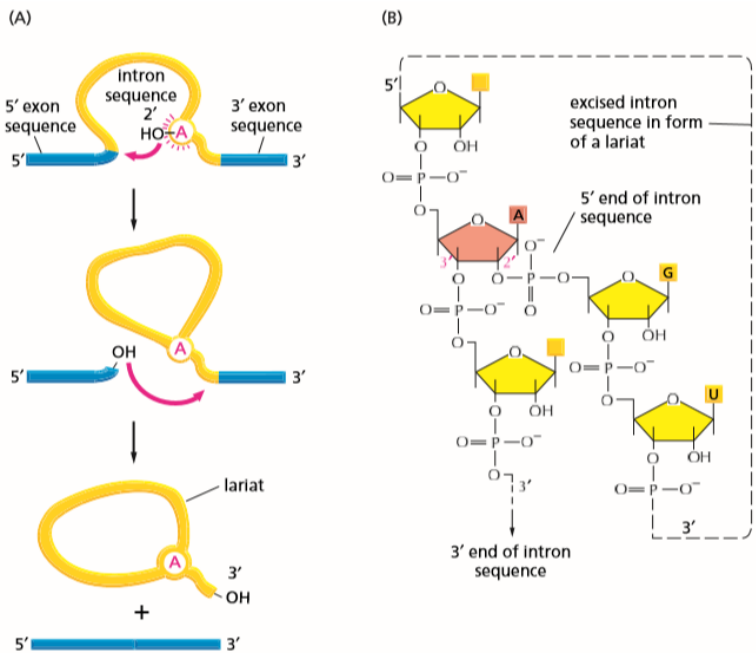
**Gambar 25. Struktur dua gen manusia menunjukkan susunan ekson dan intron.** (A) Gen  $\beta$ -globin yang relatif kecil, yang mengkodekan salah satu subunit dari protein hemoglobin pembawa oksigen, mengandung 3

ekson (lihat juga Gambar 4-7). (B) Gen Faktor VIII yang jauh lebih besar mengandung 26 ekson; itu kode untuk protein (Faktor VIII) yang berfungsi dalam jalur pembekuan darah. Bentuk paling umum dari hasil hemofilia dari mutasi pada gen ini.

Kedua urutan intron dan exon ditranskripsi menjadi RNA. Urutan intron dihapus dari RNA yang baru disintesis melalui proses **splicing RNA**. Sebagian besar penyambungan RNA yang terjadi dalam fungsi sel dalam produksi mRNA, dan diskusi kami tentang penyambungan berfokus pada apa yang disebut penyambungan prekursor-mRNA (atau pra-mRNA). Hanya setelah 5' dan 3' proses akhir dan splicing telah terjadi adalah RNA yang disebut mRNA.

Setiap peristiwa penyambungan menghilangkan satu intron, melanjutkan melalui dua reaksi transfer fosforil berurutan yang dikenal sebagai transesterifikasi; ini bergabung dengan dua ekson sambil menghapus intron sebagai "lariat" (**Gambar 26**). Karena jumlah ikatan fosfat berenergi tinggi tetap sama, reaksi ini pada prinsipnya dapat terjadi tanpa hidrolisis nukleosida trifosfat. Namun, mesin yang mengkatalisasi penyambungan pra-mRNA rumit, terdiri dari 5 molekul RNA tambahan dan sebanyak 200 protein, dan itu menghidrolisis banyak molekul ATP per

peristiwa penyambungan. Kompleksitas tambahan ini memastikan bahwa splicing akurat, sementara pada saat yang sama cukup fleksibel untuk menangani berbagai macam intron yang ditemukan dalam sel eukariotik yang khas.



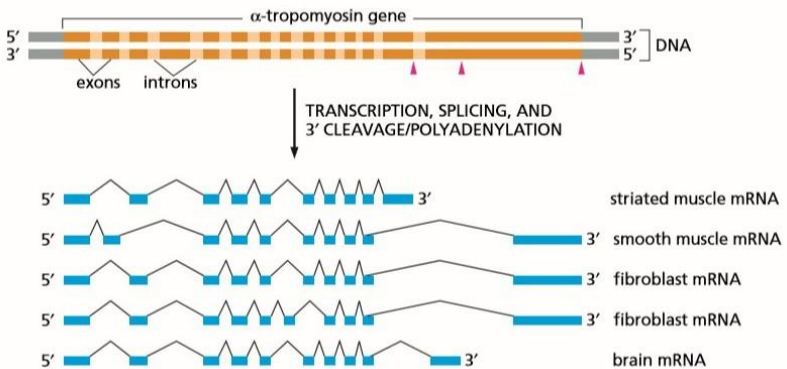
**Gambar 26 Reaksi splicing pra-mRNA.** (A) Pada langkah pertama, adenin nukleotida spesifik dalam urutan intron (ditunjukkan dengan warna merah) menyerang situs splice 5' dan memotong tulang punggung sugarphosphate dari RNA pada titik ini. Potongan 5' ujung intron secara kovalen terkait dengan adenin nukleotida, seperti yang ditunjukkan secara rinci dalam (B), sehingga menciptakan loop dalam molekul RNA.

Ujung bebas 3' -OH yang dirilis bebas dari urutan ekson kemudian bereaksi dengan dimulainya urutan ekson berikutnya, menggabungkan kedua ekson bersama-sama dan melepaskan urutan intron dalam bentuk lariat. Dengan demikian, dua sekuens ekson bergabung menjadi sekuens pengkodean yang berkelanjutan; urutan intron yang dirilis akhirnya terdegradasi

Tampaknya boros untuk menghapus intron dalam jumlah besar dengan penyambungan RNA. Dalam upaya menjelaskan mengapa itu terjadi, para ilmuwan telah menunjukkan bahwa pengaturan ekson-intron tampaknya akan memfasilitasi kemunculan protein baru dan bermanfaat dalam skala waktu evolusi. Dengan demikian, keberadaan banyak intron dalam DNA memungkinkan rekombinasi genetik dengan mudah menggabungkan ekson dari gen yang berbeda (lihat hal. 140), memungkinkan gen untuk protein baru berkembang lebih mudah dengan kombinasi bagian-bagian gen yang sudah ada sebelumnya. Pengamatan, dijelaskan dalam Bab 3, bahwa banyak protein dalam sel saat ini menyerupai tambal sulam yang terdiri dari satu set *domain* protein yang umum, mendukung gagasan ini.

Penyambungan RNA juga memiliki keunggulan saat ini. Transkrip dari banyak gen eukariotik (diperkirakan 75% dari gen pada manusia) disambung dalam lebih dari satu

cara, sehingga memungkinkan gen yang sama untuk menghasilkan serangkaian protein berbeda yang sesuai (**Gambar 27**). Daripada menjadi proses yang sia-sia seperti yang terlihat pada pandangan pertama, splicing RNA memungkinkan eucaryotes untuk meningkatkan potensi pengkodean genom mereka yang sudah sangat besar. Kita akan kembali ke ide ini lagi dalam bab ini dan selanjutnya, tetapi pertama-tama kita perlu menggambarkan mesin seluler yang melakukan tugas luar biasa ini.



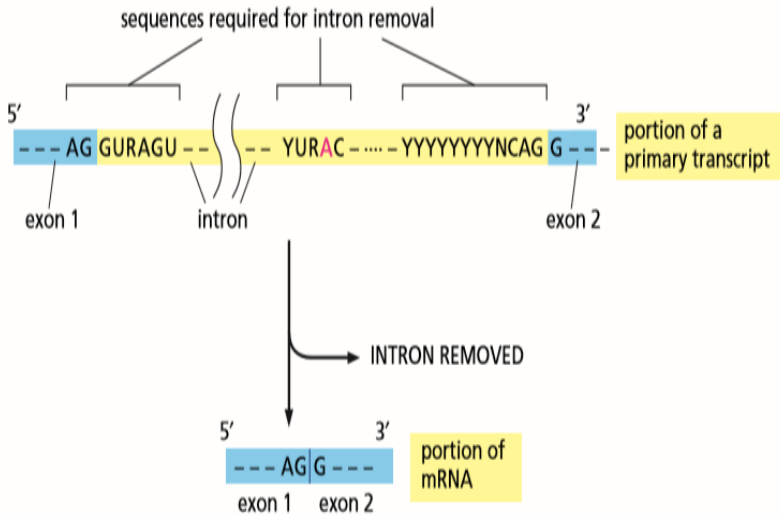
**Gambar 27 Penyambungan alternatif dari gen  $\alpha$ -tropomyosin dari tikus.**  $\alpha$ -Tropomyosin adalah protein koil-koil (lihat Gambar 3–9) yang mengatur kontraksi dalam sel otot. Transkrip primer dapat disambung dengan cara yang berbeda, seperti yang ditunjukkan pada gambar, untuk menghasilkan mRNA yang berbeda, yang kemudian memunculkan protein varian. Beberapa pola splicing spesifik untuk tipe sel tertentu. Sebagai contoh,  $\alpha$ -tropomyosin yang dibuat dalam otot lurik berbeda dari

yang dibuat dari gen yang sama pada otot polos. Panah di bagian atas gambar menandai situs tempat pembelahan dan penambahan poli-A membentuk 3' ujung mRNA dewasa

### Sinyal Urutan Nukleotida Dimana Penyambungan Terjadi

Mekanisme splicing pra-mRNA yang ditunjukkan pada Gambar 26 menyiratkan bahwa mesin splicing harus mengenali tiga bagian dari molekul RNA prekursor: situs splice 5', situs splice 3', dan titik cabang dalam urutan intron yang membentuk dasar lariat yang dipotong. Tidak mengherankan, setiap situs memiliki urutan konsensus nukleotida yang mirip dari intron ke intron dan memberikan sel dengan isyarat untuk tempat splicing akan terjadi (**Gambar –28**). Namun, urutan konsensus ini relatif singkat dan dapat mengakomodasi tingkat variabilitas urutan yang tinggi; seperti yang akan kita lihat sebentar lagi, sel memasukkan jenis informasi tambahan untuk akhirnya memilih di mana, pada setiap molekul RNA, penyambungan akan terjadi.





**Gambar 28 Urutan nukleotida konsensus dalam molekul RNA yang menandakan awal dan akhir sebagian besar intron pada manusia.** Hanya tiga blok sekuens nukleotida yang diperlihatkan yang diperlukan untuk menghilangkan sekuens intron; sisa intron dapat ditempati oleh nukleotida apa pun. Di sini A, G, U, dan C adalah nukleotida RNA standar; R adalah purin (A atau G); dan Y berarti pirimidin (C atau U). Huruf A yang disorot dengan warna merah merupakan titik cabang dari lariat yang dihasilkan oleh splicing. Hanya GU pada awal intron dan AG pada akhirnya adalah nukleotida invarian dalam urutan konsensus penyambungan. Beberapa nukleotida yang berbeda dapat menempati posisi yang tersisa (bahkan titik cabang A), walaupun nukleotida yang ditunjukkan lebih disukai. Jarak di sepanjang RNA antara tiga urutan konsensus penyambungan sangat bervariasi; Namun, jarak antara titik cabang dan 3' sambungan sambatan biasanya jauh lebih pendek daripada jarak antara 5' sambungan sambatan dan titik cabang.

Variabilitas tinggi dari urutan konsensus penyambungan menyajikan tantangan khusus bagi para ilmuwan yang mencoba menguraikan urutan genom. Intron berkisar dalam ukuran dari sekitar 10 nukleotida hingga lebih dari 100.000 nukleotida, dan memilih batas yang tepat dari setiap intron adalah tugas yang sulit bahkan dengan bantuan komputer yang kuat. Kemungkinan splicing alternatif mempersulit masalah memprediksi sekuens protein hanya dari sekuens genom. Kesulitan ini adalah salah satu hambatan utama untuk mengidentifikasi semua gen dalam urutan genom lengkap, dan itu adalah salah satu alasan utama mengapa kita hanya tahu perkiraan jumlah gen dalam genom manusia.

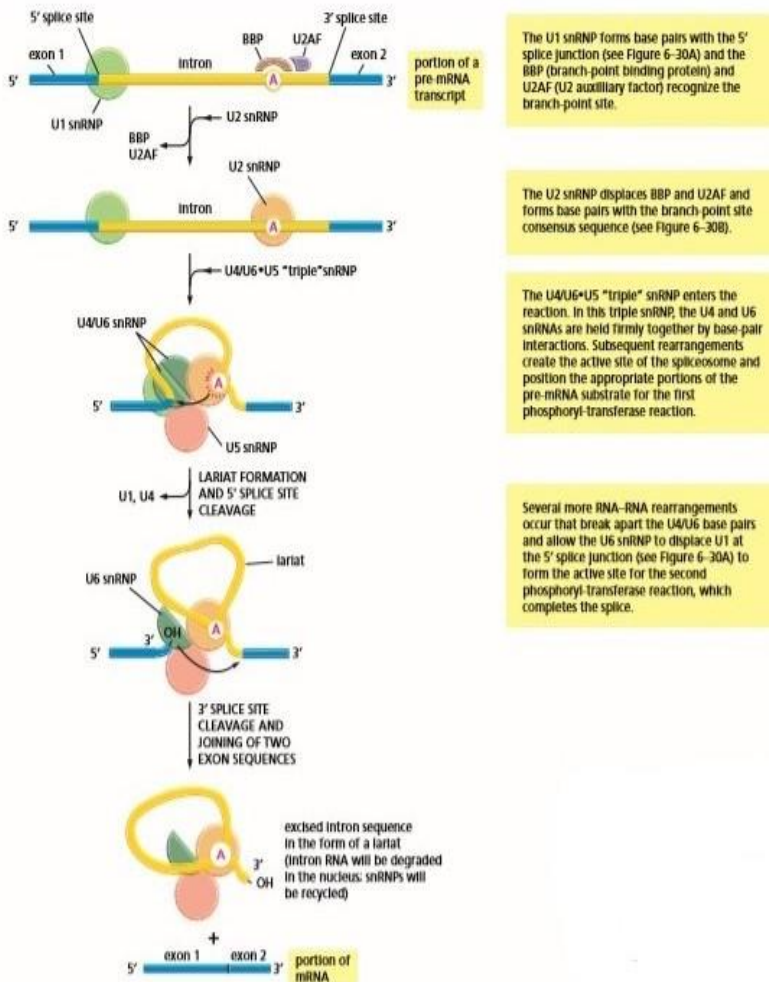
### **Penyambungan RNA Dilakukan oleh Spliceosome**

Tidak seperti langkah-langkah lain dari produksi mRNA yang telah kita bahas, langkah-langkah kunci dalam penyambungan RNA dilakukan oleh molekul RNA daripada protein. Molekul RNA khusus mengenali sekuens nukleotida yang menentukan di mana splicing akan terjadi dan juga

berpartisipasi dalam kimia splicing. Molekul RNA ini relatif pendek (masing-masing kurang dari 200 nukleotida), dan ada lima di antaranya (U1, U2, U4, U5, dan U6) yang terlibat dalam bentuk utama penyambungan pra-mRNA. Dikenal sebagai **snRNAs (small RNA nuklir)**, masing-masing dikomplekskan dengan setidaknya tujuh subunit protein untuk membentuk snRNP (ribonucleoprotein nuklir kecil). SnRNPs ini membentuk inti dari **spliceosome**, kumpulan besar molekul RNA dan protein yang melakukan splicing pra-mRNA dalam sel.

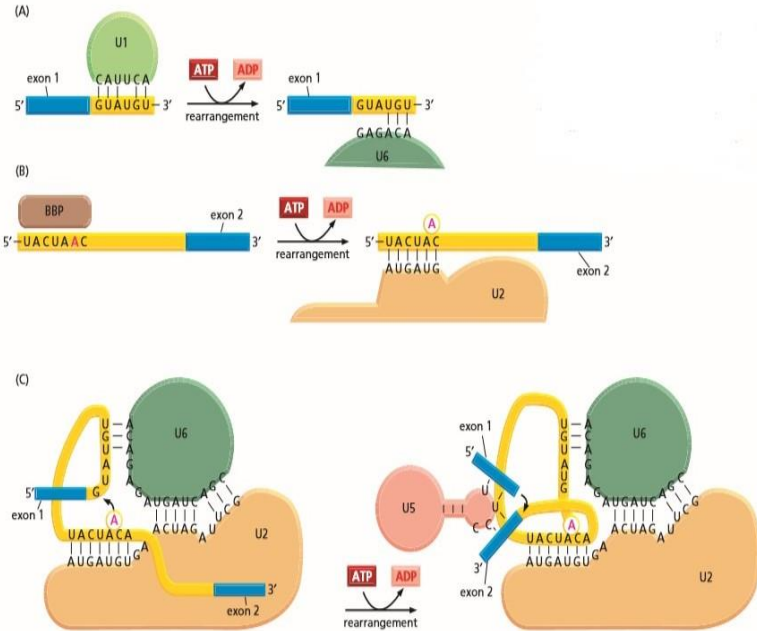
Spliceosome adalah mesin yang kompleks dan dinamis. Ketika dipelajari secara *in vitro*, beberapa komponen spliceosome berkumpul pada pre-mRNA dan, ketika reaksi splicing berlangsung, komponen-komponen baru masuk ketika komponen-komponen yang sudah melakukan tugas-tugasnya dibuang (**Gambar 29**). Namun, banyak ilmuwan percaya bahwa, di dalam sel, spliceosome adalah perakitan longgar semua komponen yang sudah ada sebelumnya, menangkap, menyambungkan dan melepaskan RNA sebagai unit terkoordinasi, dan menjalani penataan ulang yang luas setiap kali sambatan dibuat. Selama reaksi penyambungan,

pengenalan sambungan splice 5', situs titik cabang, dan sambungan splice 3' dilakukan sebagian besar melalui pair-pairing antara snRNAs dan urutan konsensus RNA dalam substrat pra-mRNA (Gambar 30). Dalam proses splicing, spliceosome mengalami beberapa perubahan di mana satu set interaksi basa-pasangan rusak dan yang lain terbentuk di tempatnya. Misalnya, U1 digantikan oleh U6 di persimpangan splice 5' (lihat Gambar 30A). Jenis penataan ulang RNA-RNA (di mana pembentukan satu interaksi RNA-RNA membutuhkan gangguan yang lain) terjadi beberapa kali selama reaksi splicing. Ini memungkinkan pemeriksaan dan pengecekan ulang urutan RNA sebelum reaksi kimia diizinkan untuk melanjutkan, sehingga meningkatkan akurasi penyambungan.



**Gambar 29 Mekanisme penyambungan pra-mRNA.** Penyambungan RNA dikatalisis oleh rakitan snRNPs (ditampilkan sebagai lingkaran berwarna) ditambah protein lain (kebanyakan tidak ditampilkan), yang bersama-sama membentuk spliceosome. Spliceosome mengenali sinyal

penyambungan pada molekul pra-mRNA, menyatukan kedua ujung intron, dan menyediakan aktivitas enzimatik untuk dua langkah reaksi (lihat Gambar 26).



**Gambar 30 Beberapa penataan ulang yang terjadi di spliceosome selama splicing pra-mRNA.** Berikut ini adalah rincian untuk ragi *Saccharomyces cerevisiae*, di mana urutan nukleotida yang terlibat sedikit berbeda dari yang ada di sel manusia. (A) Pertukaran U1 snRNP untuk U6 snRNP terjadi sebelum reaksi transfer fosforil pertama (lihat Gambar –29). Pertukaran ini membutuhkan situs splice 5' untuk dibaca oleh dua snRNP yang berbeda, sehingga meningkatkan akurasi pemilihan situs splice 5' oleh spliceosome. (B) Situs titik cabang pertama kali diakui oleh BBP dan selanjutnya oleh U2 snRNP; seperti pada (A), strategi "periksa dan periksa kembali" ini memberikan peningkatan akurasi pemilihan lokasi. Pengikatan U2 ke titik cabang memaksa

adenine yang sesuai (berwarna merah) tidak berpasangan dan dengan demikian mengaktifkannya untuk serangan pada situs splice 5' (lihat Gambar –29). Ini, dalam kombinasi dengan pengakuan oleh BBP, adalah cara di mana spliceosome secara akurat memilih adenin yang pada akhirnya membentuk titik cabang. (C) Setelah reaksi transfer fosforil pertama (kiri) terjadi, serangkaian pengaturan ulang membawa kedua ekson menjadi dekat untuk reaksi transfer fosforil kedua (kanan). SnRNA keduanya memposisikan reaktan dan memberikan (baik semua atau sebagian) situs katalitik untuk dua reaksi. SnRNP U5 hadir dalam spliceosome sebelum penataan ulang ini terjadi; untuk kejelasannya telah dihilangkan dari panel kiri. Seperti yang dibahas dalam teks, semua penataan ulang RNA-RNA yang ditunjukkan pada gambar ini (serta yang lain yang terjadi pada spliceosome tetapi tidak ditampilkan) memerlukan partisipasi protein tambahan dan hidrolisis ATP.

### **Spliceosome Menggunakan Hidrolisis ATP untuk Menghasilkan Serangkaian Penataan RNA-RNA Kompleks**

Meskipun hidrolisis ATP tidak diperlukan untuk kimia splicing RNA per se, itu diperlukan untuk perakitan dan penataan ulang spliceosome. Beberapa protein tambahan yang membentuk spliceosome menggunakan energi hidrolisis ATP untuk memutus interaksi RNA-RNA yang ada untuk memungkinkan pembentukan yang baru. Faktanya, semua langkah yang ditunjukkan sebelumnya pada Gambar 29 kecuali hubungan BBP dengan situs titik

cabang dan U1 snRNP dengan situs splice 5' membutuhkan hidrolisis ATP dan protein tambahan. Setiap sambatan yang berhasil membutuhkan sebanyak 200 protein, jika kita termasuk yang membentuk snRNP.

Penataan ulang RNA-RNA yang membutuhkan ATP yang terjadi di spliceosome terjadi di dalam snRNPs sendiri dan antara snRNPs dan substrat premRNA. Salah satu fungsi terpenting dari penyusunan ulang ini adalah pembuatan situs katalitik aktif spliceosome. Strategi membuat situs aktif hanya setelah perakitan dan penataan ulang komponen penyambungan pada substrat pra-mRNA adalah cara yang sangat efektif untuk mencegah cara penyambungan ruang.

Mungkin fitur yang paling mengejutkan dari spliceosome adalah sifat situs katalitik itu sendiri: sebagian besar (jika tidak secara eksklusif) dibentuk oleh molekul RNA bukan protein. Pada bagian terakhir bab ini kita membahas secara umum sifat struktural dan kimia dari RNA yang memungkinkannya untuk melakukan katalisis; di sini kita hanya perlu mempertimbangkan bahwa snRNA U2 dan U6 dalam spliceosome membentuk struktur RNA tiga



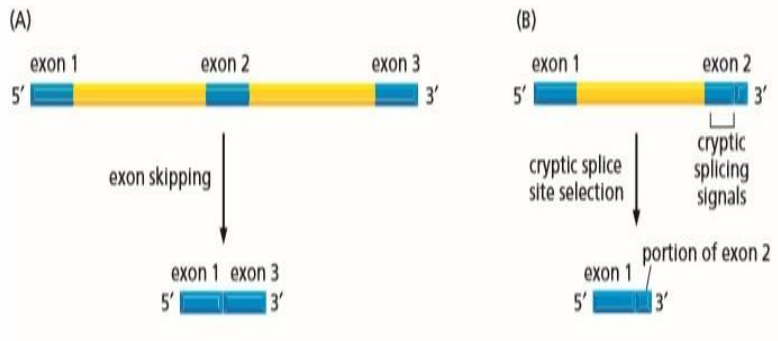
dimensi yang tepat yang menyandingkan situs splice 5' dari pre-mRNA dengan situs titik-cabang dan mungkin melakukan reaksi transesterifikasi pertama (lihat Gambar 30C). Dengan cara yang sama, sambungan sambatan 5' dan 3' disatukan (suatu peristiwa yang membutuhkan snRNA U5) untuk memfasilitasi transesterifikasi kedua.

Setelah kimia penyambungan selesai, snRNP tetap terikat pada lariat. Pembongkaran snRNP ini dari lariat (dan dari satu sama lain) membutuhkan serangkaian penataan ulang RNA-RNA yang membutuhkan hidrolisis ATP, sehingga mengembalikan snRNA ke konfigurasi aslinya sehingga dapat digunakan kembali dalam reaksi baru. Pada penyelesaian splice, spliceosome mengarahkan satu set protein untuk berikatan dengan mRNA di dekat posisi yang sebelumnya ditempati oleh intron. Disebut sebagai *exon junction complex (EJC)*, protein-protein ini menandai lokasi peristiwa penyambungan yang berhasil dan, seperti yang akan kita lihat nanti dalam bab ini, memengaruhi nasib mRNA selanjutnya.

## Properti Lain dari Pre-mRNA dan Sintesisnya Membantu Menjelaskan Pilihan Situs Sambungan yang Tepat

Seperti yang telah kita lihat, urutan intron sangat bervariasi dalam ukuran, dengan beberapa yang melebihi 100.000 nukleotida. Jika pemilihan tempat-splice ditentukan semata-mata oleh snRNP yang bekerja pada molekul RNA yang dibentuk sebelumnya dan bebas protein, kita akan mengharapkan kesalahan penyambungan seperti lompatan ekson dan penggunaan situs splice “samar” menjadi sangat umum (**Gambar 31**). Mekanisme kesetiaan dibangun ke dalam spliceosome, bagaimanapun, dilengkapi oleh dua strategi tambahan yang meningkatkan akurasi splicing. Yang pertama hanyalah konsekuensi dari tahap awal splicing yang terjadi sementara molekul pra-mRNA sedang disintesis oleh RNA polimerase II. Sebagai hasil transkripsi, ekor terfosforilasi dari RNA polimerase membawa beberapa komponen spliceosome (lihat Gambar 23), dan komponen-komponen ini ditransfer langsung dari polimerase ke RNA ketika RNA disintesis. Strategi ini membantu sel melacak intron dan ekson: misalnya, snRNP yang berkumpul di situs splice 5' awalnya disajikan dengan hanya situs splice 3'

tunggal karena situs lebih jauh hilir belum disintesis. Koordinasi transkripsi dengan splicing sangat penting dalam mencegah skipping ekson yang tidak pantas.

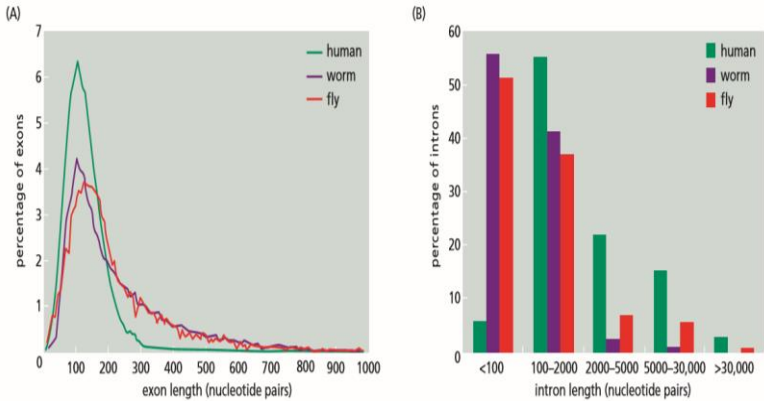


**Gambar 31 Dua jenis kesalahan penyambungan.** (A) Exon melewati. (B) Pemilihan lokasi sambaran samar. (B) Pemilihan lokasi sambaran samar. Sinyal splicing cryptic adalah urutan nukleotida RNA yang sangat mirip dengan sinyal splicing sejati.

Strategi yang disebut "definisi ekson" adalah cara lain sel memilih situs sambungan yang tepat. Ukuran ekson cenderung jauh lebih beragam daripada ukuran intron, rata-rata sekitar 150 pasangan nukleotida di berbagai organisme eukariotik (**Gambar 32**). Menurut ide definisi ekson, mesin splicing awalnya mencari urutan ekson berukuran relatif

homogen. Sebagai hasil sintesis RNA, sekelompok komponen tambahan (terutama protein SR, dinamai karena mengandung domain yang kaya akan serin dan arginin) berkumpul pada urutan ekson dan membantu menandai setiap situs splice 3' dan 5' mulai dari 5' akhir RNA (**Gambar 33**). Protein-protein ini, pada gilirannya, merekrut U1 snRNA, yang menandai batas ekson hilir, dan U2AF, yang menentukan yang hulu. Dengan secara khusus menandai ekson dengan cara ini dan dengan demikian mengambil keuntungan dari ukuran ekson yang relatif seragam, sel meningkatkan keakuratan dengan mana ia menyimpan komponen penyambungan awal pada RNA yang baru lahir dan dengan demikian membantu untuk menghindari tempat sambungan yang samar. Bagaimana protein SR membedakan urutan ekson dari urutan intron tidak dipahami secara rinci; Namun, diketahui bahwa beberapa protein SR berikatan secara istimewa dengan sekuens RNA spesifik dalam ekson, disebut *peningkat penyambungan*. Pada prinsipnya, karena salah satu dari beberapa kodon yang berbeda dapat digunakan untuk mengkode asam amino yang diberikan, ada kebebasan untuk menyesuaikan urutan nukleotida ekson sehingga dapat

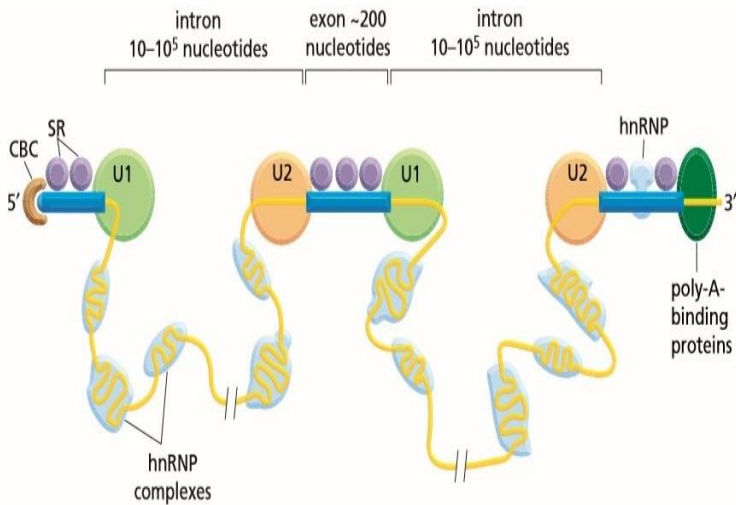
membentuk situs pengikatan untuk protein SR, tanpa harus mempengaruhi urutan asam amino yang exon menentukan.



**Gambar 32 Variasi dalam panjang intron dan exon pada genom manusia, cacing, dan lalat.** (A) Ukuran distribusi exon. (B) Ukuran distribusi intron. Perhatikan bahwa panjang exon jauh lebih seragam daripada panjang intron. (Diadaptasi dari International Human Genome Sequencing Consortium, Nature 409: 860–921, 2001. Dengan izin dari Macmillan Publishers Ltd.)

Penandaan batas exon dan intron dan perakitan spliceosome dimulai pada molekul RNA sementara itu masih memanjang oleh RNA polimerase pada ujung 3' nya. Namun, kimia splicing yang sebenarnya dapat terjadi jauh di kemudian hari. Penundaan ini berarti bahwa urutan intron tidak harus dihilangkan dari molekul pra-mRNA dalam

urutan di mana mereka terjadi di sepanjang rantai RNA. Ini juga berarti bahwa, meskipun perakitan spliceosome adalah co-transkripsional, reaksi splicing kadang-kadang terjadi pasca transkripsi yaitu, setelah molekul pra-mRNA lengkap dibuat. Namun, kimia splicing yang sebenarnya dapat terjadi jauh di kemudian hari. Penundaan ini berarti bahwa urutan intron tidak harus dihilangkan dari molekul pra-mRNA dalam urutan di mana mereka terjadi di sepanjang rantai RNA. Ini juga berarti bahwa, meskipun perakitan spliceosome adalah co-transkripsional, reaksi splicing kadang-kadang terjadi pasca transkripsi - yaitu, setelah molekul pra-mRNA lengkap dibuat.



**Gambar 33. Gagasan definisi ekson.** Menurut satu proposal, protein SR mengikat setiap urutan ekson dalam premRNA dan dengan demikian membantu memandu snRNPs ke batas intron / ekson yang tepat. Demarkasi ekson oleh protein SR ini terjadi secara co-transkripsi, dimulai dari CBC (kompleks pengikat) di ujung 5'. Seperti ditunjukkan, urutan intron dalam pre-mRNA, yang bisa sangat panjang, dikemas ke dalam kompleks hnRNP (ribonucleoprotein nuklir heterogen) yang memadatkannya menjadi struktur yang lebih mudah dikelola dan mungkin menutupi situs splice cryptic. Telah diusulkan bahwa protein hnRNP dapat secara istimewa berasosiasi dengan urutan intron dan bahwa preferensi ini juga dapat membantu spliceosome membedakan intron dari ekson. Namun, seperti yang ditunjukkan, setidaknya beberapa protein hnRNP juga mengikat urutan ekson. (Diadaptasi dari R. Reed, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 340–345, 2000. Dengan izin dari Elsevier.)

## Seperangkat kedua snRNPs Menyambung Sebagian Kecil dari Urutan Intron pada Hewan dan Tumbuhan

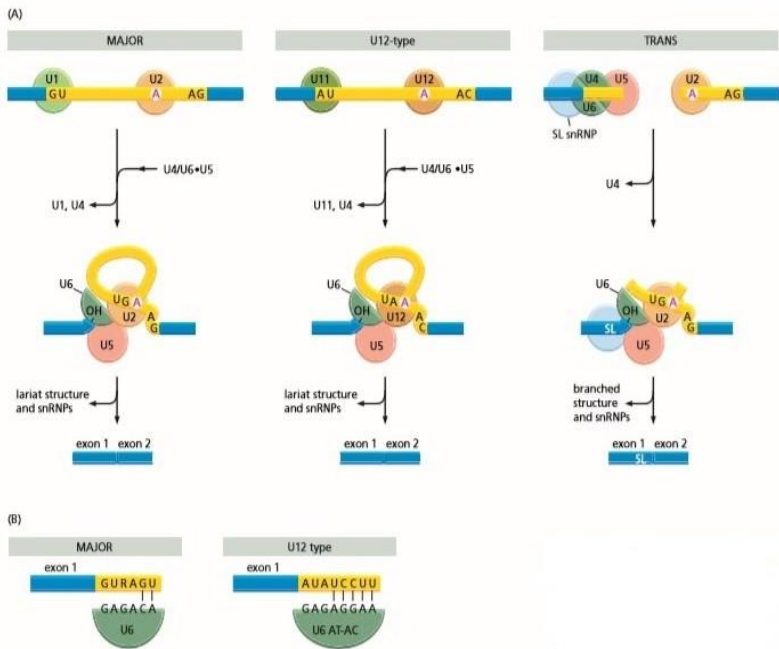
Eucaryotes sederhana seperti ragi hanya memiliki satu set snRNP yang melakukan semua penyambungan pre-mRNA. Namun, eukariota yang lebih kompleks seperti lalat, mamalia, dan tumbuhan memiliki set kedua snRNP yang mengarahkan penyambungan sebagian kecil dari urutan intronnya. Bentuk minor spliceosome ini mengenali rangkaian sekuens RNA yang berbeda pada persimpangan splice 5' dan 3' dan pada titik cabang; itu disebut spliceosome tipe U12 karena keterlibatan SnRNP U12 (**Gambar 34A**). Meskipun mengenali urutan nukleotida yang berbeda, snRNPs dalam spliceosome ini membuat jenis interaksi RNA-RNA yang sama dengan pre-mRNA dan dengan satu sama lain seperti halnya snRNP utama (Gambar 34B). Meskipun, seperti yang telah kita lihat, komponen-komponen spliceosom utama berjalan dengan RNA polimerase II saat mentranskripsikan gen, ini mungkin bukan kasus untuk spliceosome U12. Mungkin saja splicing yang dimediasi-U12 dengan demikian tertunda, dan ini menghadirkan sel dengan cara untuk mengatur co-splicing



beberapa ratus gen yang ekspresinya membutuhkan spliceosome ini. Sejumlah mRNA mamalia mengandung campuran intron, beberapa dihilangkan oleh spliceosome utama dan lainnya oleh spliceosome minor, dan telah diusulkan bahwa pengaturan ini memungkinkan pola rumit khusus dari splicing alternatif terjadi.

Beberapa organisme eukariotik menunjukkan variasi tertentu pada splicing, yang disebut **trans-splicing**. Organisme ini termasuk trypanosoma sel tunggal protozoa yang menyebabkan penyakit tidur pada manusia di Afrika dan model organisme multiseluler, cacing nematode. Dalam trans-splicing, ekson dari dua transkrip RNA terpisah disambungkan bersama untuk membentuk molekul mRNA yang matang (lihat Gambar 34A). Trypanosom memproduksi semua mRNA mereka dengan cara ini, sedangkan trans-splicing hanya menyumbang sekitar 1% dari nematoda mRNA. Dalam kedua kasus, ekson tunggal disambungkan ke ujung 5' dari banyak transkrip RNA berbeda yang diproduksi oleh sel; dengan cara ini, semua produk trans-splicing memiliki ekson 5' yang sama dan ekson 3' yang berbeda. Banyak snRNP yang sama yang

berfungsi dalam splicing konvensional digunakan dalam reaksi ini, meskipun transsplicing menggunakan snRNP unik (disebut SL RNP) yang membawa ekson umum (lihat Gambar 34).



**Gambar 34** Garis mekanisme yang digunakan untuk tiga jenis penyambungan RNA. (A) Tiga jenis spliceosom. Spliceosome utama (kiri), spliceosome tipe U12 (tengah), dan trans-spliceosome (kanan) masing-masing ditampilkan pada dua tahap perakitan. Intron yang dihilangkan oleh spliceosome tipe U12 memiliki serangkaian sekuens nukleotida konsensus yang berbeda dari yang dihilangkan oleh spliceosome utama. Pada manusia, diperkirakan 0,1% intron dihilangkan

oleh spliceosome tipe U12. Dalam trans-splicing, yang tidak terjadi pada manusia, SL snRNP dikonsumsi dalam reaksi karena sebagian dari SL snRNA menjadi ekson pertama dari mRNA dewasa. (B) UR snRNP utama dan UR snRNP khusus untuk spliceosome tipe U12 keduanya mengenali sambungan splice 5', tetapi mereka melakukannya melalui interaksi pasangan pasangan basa yang berbeda. Urutan yang ditampilkan adalah dari manusia. (Diadaptasi dari Y.T. Yu et al., *The RNA World*, hlm. 487-524. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.)

Kita tidak tahu mengapa beberapa organisme menggunakan trans-splicing; Namun, diperkirakan bahwa ekson 5' umum dapat membantu dalam menerjemahkan mRNA. Dengan demikian, mRNA yang dihasilkan oleh trans-splicing pada nematoda tampaknya diterjemahkan dengan efisiensi yang sangat tinggi.

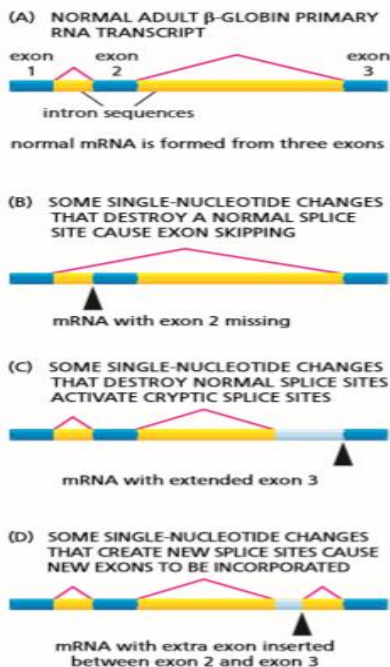
### **Splicing RNA Menunjukkan Plastisitas Luar Biasa**

Kita telah melihat bahwa pilihan lokasi sambungan tergantung pada fitur transkrip premRNA seperti afinitas dari tiga sinyal pada RNA (persimpangan splice 5' dan 3' dan titik cabang) untuk mesin penyambungan, ko-transkripsi perakitan spliceosome, dan "pembukuan" yang mendasari definisi ekson. Kita tidak tahu seberapa akurat penyambungan yang normal karena, seperti yang kita lihat

nanti, ada beberapa sistem kendali mutu yang dengan cepat menghancurkan mRNA yang penyambungannya serba salah. Namun, kita tahu bahwa, dibandingkan dengan langkah-langkah lain dalam ekspresi gen, splicing sangat fleksibel. Sebagai contoh, mutasi dalam urutan nukleotida penting untuk penyambungan intron tertentu tidak serta merta mencegah penyambungan intron itu sama sekali. Sebaliknya, mutasi biasanya menciptakan pola splicing baru (**Gambar 35**). Paling umum, ekson hanya dilewati (**Gambar 35B**). Dalam kasus lain, mutasi menyebabkan sambungan splice cryptic digunakan secara efisien (**Gambar 35C**). Rupanya, mesin splicing telah berevolusi untuk memilih pola sambungan sambungan terbaik, dan jika yang optimal rusak oleh mutasi, ia akan mencari pola terbaik berikutnya, dan seterusnya. Fleksibilitas dalam proses splicing RNA ini menunjukkan bahwa perubahan pola splicing yang disebabkan oleh mutasi acak telah menjadi jalur penting dalam evolusi gen dan organisme.

Plastisitas penyambungan RNA juga berarti bahwa sel dapat mengatur pola penyambungan RNA. Sebelumnya di bagian ini kita melihat bahwa splicing alternatif dapat

menimbulkan protein berbeda dari gen yang sama. Beberapa contoh splicing alternatif bersifat konstitutif; yaitu, mRNA yang disambung secara alternatif diproduksi terus menerus oleh sel-sel suatu organisme. Namun, dalam banyak kasus, sel mengatur pola splicing sehingga berbagai bentuk protein diproduksi pada waktu yang berbeda dan di jaringan yang berbeda (lihat Gambar 27). Dalam Bab 7 kita kembali ke masalah ini untuk mendiskusikan beberapa contoh spesifik dari penyambungan RNA yang diatur.



**Gambar 35** pengolahan normal transkrip RNA primer  $\beta$ -globin pada manusia dengan penyakit  $\beta$  thalassemia. Dalam contoh yang ditunjukkan, penyakit ini disebabkan oleh mutasi situs splice (panah hitam) yang ditemukan dalam genom pasien yang terkena. Kotak biru gelap mewakili tiga urutan ekson normal; garis merah menunjukkan situs sambatan 5' dan 3'. Kotak biru muda menggambarkan urutan nukleotida baru yang termasuk dalam molekul mRNA akhir sebagai hasil mutasi. Perhatikan bahwa ketika mutasi meninggalkan situs sambatan normal tanpa pasangan, ekson dilewati atau satu atau lebih situs splice cryptic abnormal di dekatnya digunakan sebagai situs mitra, seperti dalam (C) dan (D). (Diadaptasi sebagian dari S.H. Orkin, dalam *The Molecular Basis of Blood Diseases* [G. Stamatoyannopoulos et al., Eds.], Hlm. 106–126. Philadelphia: Saunders, 1987.)

## Penyambungan RNA Spliceosome Catalyzed Mungkin Berevolusi dari Mekanisme Penyambungan Sendiri

Ketika spliceosome pertama kali ditemukan, ia membingungkan para ahli biologi molekuler. Mengapa molekul RNA bukannya protein melakukan peran penting dalam pengenalan lokasi splice dan dalam kimia splicing? Mengapa perantara lariat digunakan daripada alternatif yang tampaknya lebih sederhana untuk menyatukan 5' dan 3' situs sambatan dalam satu langkah, diikuti oleh pembelahan langsung dan bergabung kembali? Jawaban atas pertanyaan-pertanyaan ini mencerminkan cara di mana spliceosome diyakini telah berevolusi.

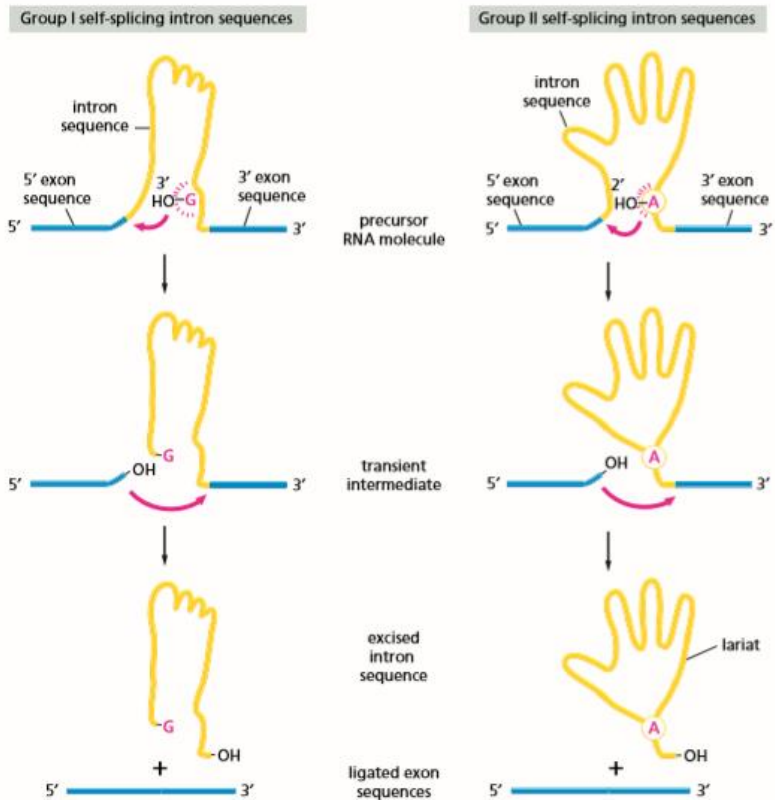
Sebagaimana dibahas secara singkat di Bab 1 (dan lebih terinci di bagian akhir bab ini), ada kemungkinan bahwa sel-sel awal menggunakan molekul RNA daripada protein sebagai katalis utama mereka dan bahwa mereka menyimpan informasi genetik mereka dalam RNA daripada dalam urutan DNA. Reaksi splicing yang dikatalisis oleh RNA mungkin memiliki peran penting dalam sel-sel awal ini. Sebagai bukti, beberapa intron *penyambungan diri* RNA (yaitu, urutan intron dalam RNA yang penyambungannya

dapat terjadi tanpa adanya protein atau molekul RNA lainnya) tetap ada sampai sekarang misalnya, dalam gen rRNA nuklir dari *Tetrahymena* ciliate, di beberapa gen T4 bakteriofag, dan pada beberapa gen mitokondria dan kloroplas.

Urutan intron penyambungan diri dapat diidentifikasi dalam tabung reaksi dengan menginkubasi molekul RNA murni yang berisi urutan intron dan mengamati reaksi penyambungan. Dua kelas utama dari urutan intron self-splicing dapat dibedakan dengan cara ini. *Grup I urutan intron* mulai reaksi splicing dengan mengikat nukleotida G ke urutan intron; G ini dengan demikian diaktifkan untuk membentuk kelompok penyerang yang akan mematahkan ikatan fosfodiester pertama yang dibelah selama penyambungan (ikatan di situs splice 5'). Dalam *sekuens intron grup II*, residu A yang sangat reaktif dalam sekuens intron adalah grup penyerang, dan intermediat lariat dihasilkan. Kalau tidak, jalur reaksi untuk kedua jenis urutan intron penyambungan sendiri adalah sama. Keduanya dianggap mewakili sisa-sisa mekanisme yang sangat kuno (**Gambar 36**).

Untuk kedua jenis reaksi splicing sendiri, urutan nukleotida intron sangat penting; RNA intron terlipat ke dalam struktur tiga dimensi tertentu, yang menyatukan persimpangan 5' dan 3' bersama-sama dan menyediakan kelompok reaktif yang diposisikan secara tepat untuk melakukan kimia (lihat Gambar 6C). Karena kimia reaksi splicing mereka sangat mirip, telah diusulkan bahwa mekanisme splicing pra-mRNA dari spliceosome berevolusi dari kelompok II penyambungan diri. Menurut gagasan ini, ketika snRNPs spliceosomal mengambil alih peran struktural dan kimia intron kelompok II, batasan sekuens ketat pada sekuens intron akan menghilang, sehingga memungkinkan ekspansi besar-besaran dalam jumlah RNA berbeda yang dapat disambungkan.





**Gambar 36. Dua kelas sekuens intron penyambungan diri yang diketahui.** Gambar tersebut menekankan kesamaan antara dua mekanisme. Keduanya biasanya dibantu oleh protein dalam sel yang mempercepat reaksi, tetapi katalisis tetap dimediasi oleh RNA dalam urutan intron. Sekuens intron grup I mengikat nukleotida G bebas ke situs spesifik pada RNA untuk memulai penyambungan, sedangkan sekuens intron grup II menggunakan nukleotida A yang reaktif dalam sekuens intron itu sendiri untuk tujuan yang sama. Kedua jenis reaksi penyimpanan sendiri membutuhkan intron untuk dilipat menjadi struktur

tiga dimensi yang sangat spesifik yang menyediakan aktivitas katalitik untuk reaksi (lihat Gambar –6). Mekanisme yang digunakan oleh urutan intron grup II melepaskan intron sebagai struktur lariat dan sangat mirip dengan jalur splicing pra-mRNA yang dikatalisis oleh spliceosome (bandingkan dengan Gambar 29). Spliceosome melakukan sebagian besar penyambungan RNA dalam sel eukariotik, dan RNA penyambungan sendiri merupakan kasus yang tidak biasa. (Diadaptasi dari T.R. Cech, *Cell* 44: 207–210, 1986. Dengan izin dari Elsevier.)

## **Enzim Pemrosesan RNA Menghasilkan Ujung 3' dari mRNA eukariotik**

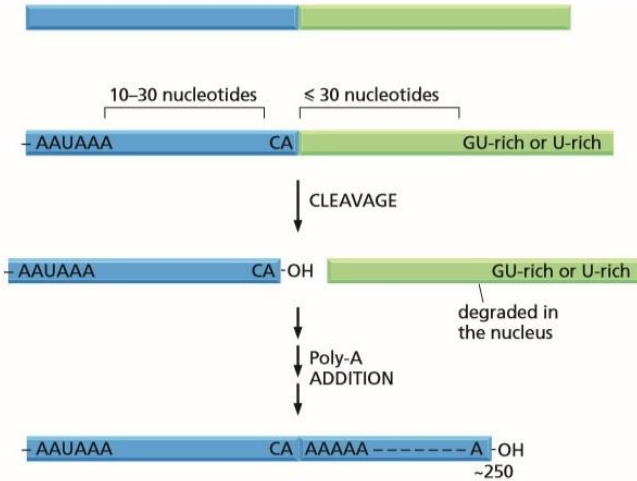
Seperti yang dijelaskan sebelumnya, ujung 5' dari pre-mRNA yang diproduksi oleh RNA polimerase II ditutup segera setelah muncul dari RNA polimerase. Kemudian, ketika polimerase melanjutkan pergerakannya sepanjang gen, spliceosome berkumpul pada RNA dan menggambarkan batas intron dan ekson. Ekor terminal C yang panjang dari RNA polimerase mengoordinasikan proses-proses ini dengan mentransfer capping dan menyambungkan komponen secara langsung ke RNA ketika ia muncul dari enzim. Kita melihat di bagian ini bahwa, ketika RNA polimerase II mencapai ujung gen, mekanisme serupa memastikan bahwa ujung 3' dari pre-mRNA diproses dengan tepat.

Seperti yang mungkin diharapkan, posisi ujung 3' dari setiap molekul mRNA pada akhirnya ditentukan oleh sinyal yang dikodekan dalam genom (**Gambar 37**). Sinyal-sinyal ini ditranskripsi menjadi RNA ketika RNA polimerase II bergerak melaluinya, dan kemudian dikenali (sebagai RNA) oleh serangkaian protein pengikat RNA dan enzim pemroses RNA (**Gambar 38**). Dua protein multisubunit, yang disebut CstF (faktor stimulasi pembelahan) dan CPSF (faktor spesifisitas pembelahan dan poligadenilasi), sangat penting. Kedua protein ini berjalan dengan ekor RNA polimerase dan ditransfer ke urutan pemrosesan akhir 3' pada molekul RNA saat muncul dari RNA polimerase.

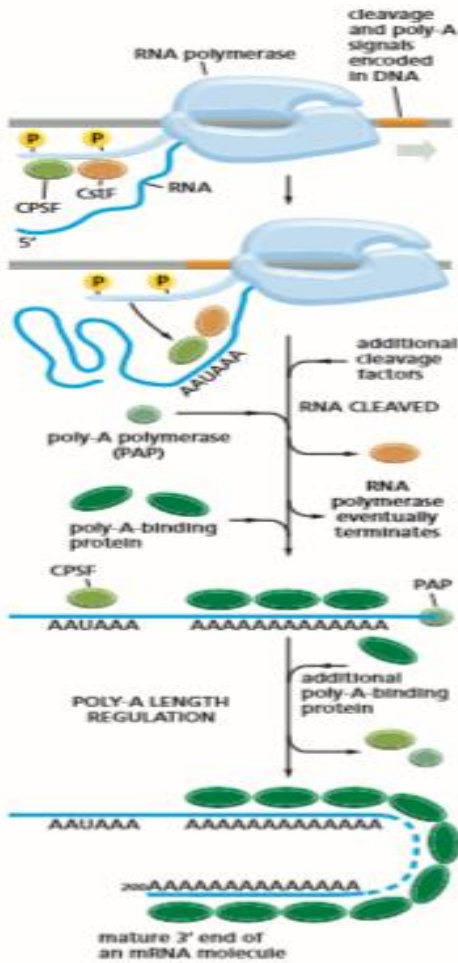
Setelah CstF dan CPSF mengikat urutan nukleotida spesifik pada molekul RNA yang muncul, protein tambahan berkumpul dengan mereka untuk menciptakan ujung 3' mRNA. Pertama, RNA dibelah (lihat Gambar 38). Selanjutnya enzim yang disebut poly-A polimerase (PAP) menambahkan, satu per satu, sekitar 200 nukleotida ke ujung 3' yang dihasilkan oleh pembelahan. Prekursor nukleotida untuk penambahan ini adalah ATP, dan tipe ikatan 5'-3' yang sama terbentuk seperti pada sintesis RNA konvensional

(lihat Gambar –4). Berbeda dengan RNA polimerase biasa, poli-A polimerase tidak memerlukan contoh; karenanya, ekor poli-A mRNA eukariotik tidak secara langsung dikodekan dalam genom. Ketika ekor poli-A di sintesis, protein yang disebut protein pengikat poli-A berkumpul di atasnya dan, dengan mekanisme yang kurang dipahami, menentukan panjang akhir ekor. Beberapa protein pengikat poli-A tetap terikat pada ekor poli-A ketika mRNA bergerak dari nukleus ke sitosol dan mereka membantu mengarahkan sintesis protein pada ribosom, seperti yang akan kita lihat nanti dalam bab ini.

Setelah 3' akhir molekul pre-mRNA eukariotik telah dibelah, RNA polimerase II terus menyalin, dalam beberapa kasus untuk ratusan nukleotida. Tetapi polimerase segera melepaskan cengkeramannya pada contoh dan transkripsi berakhir. Setelah pembelahan akhir 3' terjadi, RNA yang baru disintesis yang muncul dari polimerase tidak memiliki tutup 5'; RNA yang tidak dilindungi ini dengan cepat terdegradasi oleh eksonuklease 5' → 3' yang dibawa bersama pada ekor polimerase. Rupanya, degradasi RNA inilah yang akhirnya menyebabkan RNA polimerase terlepas dari DNA



**Gambar 37 Urutan nukleotida konsensus yang mengarahkan pembelahan dan polyadenylation untuk membentuk ujung 3' dari mRNA eukaryotic.** Urutan ini dikodekan dalam genom; protein spesifik mengenalinya setelah ditranskripsi menjadi RNA. Hexamer AAUAAA diikat oleh CPSF, elemen kaya GU di luar situs pembelahan diikat oleh CstF (lihat Gambar 38), dan urutan CA terikat oleh faktor ketiga yang diperlukan untuk langkah pembelahan. Seperti sekuens nukleotida konsensus lain yang dibahas dalam bab ini (lihat Gambar 12), urutan yang ditunjukkan pada gambar mewakili berbagai pembelahan individu dan sinyal polyadenylation



**Gambar 38.** Beberapa langkah utama dalam menghasilkan ujung 3' mRNA eukariotik. Proses ini jauh lebih rumit daripada proses analog pada bakteri, di mana RNA polimerase berhenti pada sinyal terminasi dan melepaskan kedua transkrip 3' dan cetakan DNA (lihat Gambar 11).

## mRNA Eukariotik yang matang secara selektif diekspor dari nukleus

Kita telah melihat bagaimana sintesis dan pemrosesan pre-mRNA eukariotik berlangsung secara teratur di dalam inti sel. Namun, peristiwa ini menciptakan masalah khusus untuk sel eukariotik, terutama yang berasal dari organisme kompleks di mana intron jauh lebih lama daripada ekson. Dari pra-mRNA yang disintesis, hanya sebagian kecil mRNA matang yang digunakan lebih lanjut untuk sel. Sisanya intron yang dipotong, RNA yang rusak, dan pra-mRNA yang diproses secara tidak adil tidak hanya tidak berguna tetapi berpotensi berbahaya. Lalu bagaimana sel dapat membedakan antara molekul mRNA matang yang relatif langka yang ingin disimpannya dan jumlah puing yang luar biasa dari pemrosesan RNA?

Jawabannya adalah bahwa, ketika molekul RNA diproses, ia kehilangan protein tertentu dan memperoleh yang lain, sehingga menandakan keberhasilan penyelesaian setiap langkah yang berbeda. Sebagai contoh, kita telah melihat bahwa perolehan kompleks ikatan-pengikat, kompleks sambungan ekson, dan protein pengikat poli-A

menandai penyelesaian penambahan capping, splicing, dan poli-A secara berurutan. Molekul mRNA yang diselesaikan dengan baik juga dibedakan oleh protein yang kurang. Misalnya, kehadiran snRNP akan menandakan penyambungan tidak lengkap atau menyimpang. Hanya ketika protein hadir pada molekul mRNA secara kolektif menandakan bahwa pemrosesan berhasil diselesaikan adalah mRNA yang diekspor dari nukleus ke dalam sitosol, di mana ia dapat diterjemahkan menjadi protein. MRNA yang diproses secara tidak benar, dan serpihan RNA lainnya disimpan dalam nukleus, di mana mereka akhirnya terdegradasi oleh **exosome** nuklir, kompleks protein besar yang interiornya kaya dengan 3'-5' RNA exonucleases. Sel-sel eukariotik dengan demikian hanya mengeksport molekul RNA yang bermanfaat ke sitoplasma, sementara serpihan dibuang di dalam nucleus.

Dari semua protein yang berkumpul pada molekul pramRNA ketika mereka muncul dari transkrip RNA polimerase, yang paling banyak adalah hnRNPs (protein ribonuclear nuklir heterogen) (lihat Gambar -33). Beberapa protein ini (ada sekitar 30 di antaranya pada manusia)

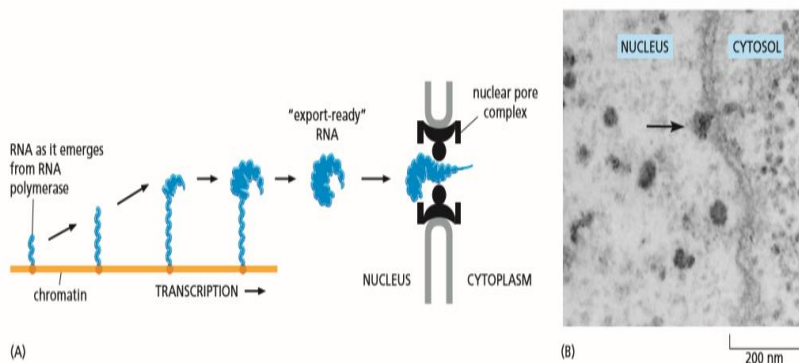


melepaskan helai jepit rambut dari RNA sehingga splicing dan sinyal lain pada RNA dapat dibaca dengan lebih mudah. Yang lain secara istimewa mengemas RNA yang terkandung dalam sekuens intron yang sangat panjang yang biasanya ditemukan pada gen organisme kompleks. Karena itu mereka dapat memainkan peran penting dalam membedakan mRNA dewasa dari serpihan yang tersisa dari pemrosesan RNA.

MRNA yang diproses dengan sukses dipandu melalui **kompleks pori nuklir (NPC)** saluran berair dalam membran nuklir yang secara langsung menghubungkan nukleoplasma dan sitosol (**Gambar 39**). Molekul kecil (kurang dari 50.000 dalton) dapat berdifusi bebas melalui saluran ini. Namun, sebagian besar makromolekul dalam sel, termasuk mRNA yang dikomplekskan dengan protein, terlalu besar untuk melewati saluran tanpa proses khusus. Sel menggunakan energi untuk secara aktif mengangkut makromolekul semacam itu di kedua arah melalui kompleks pori nuklir.

Seperti dijelaskan secara rinci dalam Bab 12, makromolekul dipindahkan melalui kompleks pori nuklir oleh *reseptor transpor nuklir*, yang tergantung pada gigi tiruan

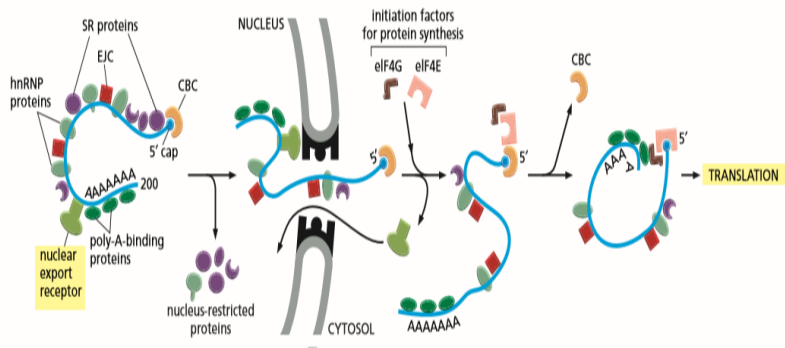
dari makromolekul, mengawalinya dari nukleus ke sitoplasma atau sebaliknya. Agar ekspor mRNA terjadi, reseptor transpor nuklir spesifik harus dimuat ke mRNA, suatu langkah yang, setidaknya dalam beberapa organisme, berlangsung bersamaan dengan pembelahan 3' dan poligadenilasi. Setelah itu membantu untuk memindahkan molekul RNA melalui kompleks pori nuklir, reseptor transport terdisosiasi dari mRNA, memasuki kembali nukleus, dan mengekspor molekul mRNA baru (**Gambar 40**).



**Gambar 39** Transportasi molekul mRNA besar melalui kompleks pori nuklir. (A) Pematangan molekul mRNA karena disintesis oleh RNA polimerase dan dikemas oleh berbagai protein nuklir. Gambar RNA berlimpah yang luar biasa ini, disebut Balbiani Ring mRNA, didasarkan pada mikrograf EM seperti yang ditunjukkan pada (B). Cincin Balbiani

ditemukan di sel-sel serangga tertentu. (A, diadaptasi dari B. Daneholt, Cell 88: 585-588, 1997).

Ekspor kompleks mRNA-protein dari nukleus dapat diamati dengan mikroskop elektron untuk mRNA berlimpah yang luar biasa dari gen Cincin Balbiani serangga. Ketika gen-gen ini ditranskripsi, RNA yang baru terbentuk terlihat dipaket oleh protein, termasuk hnRNPs, protein SR, dan komponen spliceosome. Kompleks protein RNA ini mengalami serangkaian transisi struktural, mungkin mencerminkan peristiwa pemrosesan RNA, yang berpuncak pada serat melengkung (lihat Gambar –39). Serat melengkung ini bergerak melalui nukleoplasma dan memasuki kompleks pori nuklir (dengan tutup 5' melanjutkan terlebih dahulu), dan kemudian mengalami serangkaian transisi struktural lain saat bergerak melalui pori. Pengamatan ini dan lainnya mengungkapkan bahwa kompleks pra-mRNA-protein dan mRNA-protein adalah struktur dinamis yang memperoleh dan kehilangan banyak protein spesifik selama sintesis, pemrosesan, dan ekspor RNA (lihat Gambar –40).



**Gambar 40 Ilustrasi skematis dari molekul mRNA "siap-ekspor" dan transpornya melalui pori nuklir.** Seperti yang ditunjukkan, beberapa protein bergerak dengan mRNA saat bergerak melalui pori-pori, sedangkan yang lain tetap di dalam nukleus. Reseptor ekspor nuklir untuk mRNA adalah kompleks protein yang didapatkan ketika mRNA telah disambungkan dengan benar dan dipoligadenilasi. Ketika mRNA diekspor ke sitosol, reseptor ekspor terdisosiasi dari mRNA dan diimpor kembali ke dalam nukleus, di mana ia dapat digunakan kembali. Tepat setelah ia meninggalkan nukleus, dan sebelum ia kehilangan kompleks pengikat (CBC), mRNA dikenai pemeriksaan akhir, yang disebut peluruhan yang dimediasi nonsense, yang akan dijelaskan nanti dalam bab ini. Setelah lulus tes ini mRNA terus melepaskan protein yang sebelumnya terikat dan memperoleh yang baru sebelum diterjemahkan secara efisien menjadi protein. EJC, kompleks persimpangan ekson.

Seperti yang telah kita lihat, beberapa protein ini menandai berbagai tahap pematangan mRNA; protein lain yang disimpan pada mRNA ketika masih dalam nukleus dapat mempengaruhi nasib RNA setelah diangkut ke sitosol.

Dengan demikian, stabilitas mRNA dalam sitosol, efisiensi yang diterjemahkan ke dalam protein, dan tujuan utamanya dalam sitosol semua dapat ditentukan oleh protein yang diperoleh dalam nukleus yang tetap terikat pada RNA setelah ia meninggalkan nukleus. Kita akan membahas masalah ini di Bab 7 ketika kita beralih ke kontrol pasca-transkripsi ekspresi gen.

Kita telah melihat bahwa sintesis dan pemrosesan RNA sangat erat digabungkan dalam sel, dan mungkin diharapkan bahwa ekspor dari nukleus entah bagaimana terintegrasi dengan kedua proses ini. Meskipun RNA cincin Balbiani dapat dilihat bergerak melalui nukleoplasma dan keluar melalui pori-pori nuklir, mRNA lain tampaknya disintesis dan diproses dalam jarak dekat dengan kompleks pori nuklir. Dalam kasus-kasus ini, yang mungkin mewakili sebagian besar gen eukariotik, sintesis mRNA, pemrosesan, dan transpor semuanya tampak sangat erat; mRNA dengan demikian dapat dilihat sebagai muncul dari pori-pori nuklir karena mobil yang baru diproduksi mungkin muncul dari jalur perakitan. Kemudian dalam bab ini, kita akan melihat bahwa sel melakukan pemeriksaan kontrol kualitas

tambahan pada setiap mRNA sebelum diizinkan untuk diterjemahkan secara efisien menjadi protein.

Sebelum membahas apa yang terjadi pada mRNA setelah mereka meninggalkan nukleus, kami secara singkat mempertimbangkan bagaimana sintesis dan pemrosesan molekul RNA nonkode terjadi. Meskipun ada banyak contoh lain, diskusi kami berfokus pada rRNA yang sangat penting untuk menerjemahkan mRNA menjadi protein.

### **Banyak RNA Nonkoding Juga Disintesis dan Diproses dalam Inti**

Beberapa persen dari berat kering sel mamalia adalah RNA; dari itu, hanya sekitar 3-5% adalah mRNA. Sebagian kecil dari sisanya merupakan urutan intron sebelum terdegradasi, tetapi sebagian besar RNA dalam sel melakukan fungsi struktural dan katalitik (lihat Tabel-1, hal. 336). RNA yang paling melimpah dalam sel adalah RNA ribosom (rRNA), yang merupakan sekitar 80% dari RNA dalam sel yang membelah dengan cepat. Sebagaimana dibahas nanti dalam bab ini, RNA ini membentuk inti dari ribosom. Tidak seperti bakteri di mana RNA polimerase

tunggal mensintesis semua RNA di dalam sel eukariotik memiliki polimerase khusus, RNA polimerase I, yang didedikasikan untuk memproduksi rRNA. RNA polimerase I mirip secara struktural dengan RNA polimerase II yang dibahas sebelumnya; Namun, tidak adanya ekor terminal-C dalam polimerase I membantu menjelaskan mengapa transkripnya tidak dibatasi atau di polyadenylated. Seperti disebutkan sebelumnya, perbedaan ini membantu sel membedakan antara RNA nonkoding dan mRNA

Karena beberapa putaran terjemahan setiap molekul mRNA dapat memberikan amplifikasi yang sangat besar dalam produksi molekul protein, banyak protein yang sangat berlimpah dalam sel dapat disintesis dari gen yang hadir dalam satu salinan per genom haploid. Sebaliknya, komponen RNA ribosom adalah produk gen akhir, dan sel mamalia yang tumbuh harus mensintesis sekitar 10 juta salinan dari setiap jenis RNA ribosom dalam setiap generasi sel untuk membangun 10 juta ribosomnya. Sel dapat menghasilkan jumlah RNA ribosom yang cukup hanya karena mengandung banyak salinan **gen rRNA** yang mengkode RNA ribosom (**rRNA**). Bahkan *E. coli*

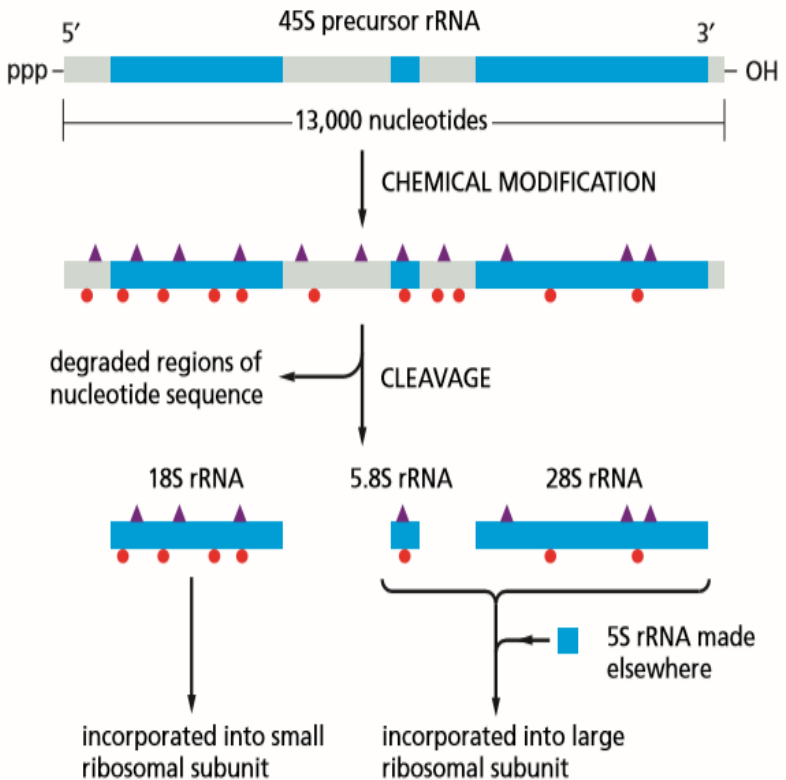
membutuhkan tujuh salinan gen rRNA untuk memenuhi kebutuhan sel akan ribosom. Sel manusia mengandung sekitar 200 salinan gen rRNA per genom haploid, tersebar dalam kelompok kecil pada lima kromosom yang berbeda (lihat Gambar 4-11), sementara sel-sel katak *Xenopus* mengandung sekitar 600 salinan gen rRNA per genom haploid dalam satu kelompok pada satu kelompok kromosom (**Gambar 41**).

Ada empat jenis rRNA eukariotik, masing-masing hadir dalam satu salinan per ribosom. Tiga dari empat rRNA (18S, 5.8S, dan 28S) dibuat dengan memodifikasi dan membelah secara kimiawi satu rRNA prekursor tunggal besar (**Gambar 42**); yang keempat (5S RNA) disintesis dari kelompok gen yang terpisah oleh polimerase yang berbeda, RNA polimerase III, dan tidak memerlukan modifikasi kimia.





**Gambar 41** Transkripsi dari gen rRNA yang disusun secara tandem, seperti yang terlihat pada mikroskop elektron. Pola gen transkripsi bolak-balik dan spacer yang tidak ditranskripsi mudah terlihat. Pandangan perbesaran gen rRNA yang lebih tinggi ditunjukkan pada Gambar 9. (Dari V.E. Foe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 723-740, 1978. Dengan izin dari Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

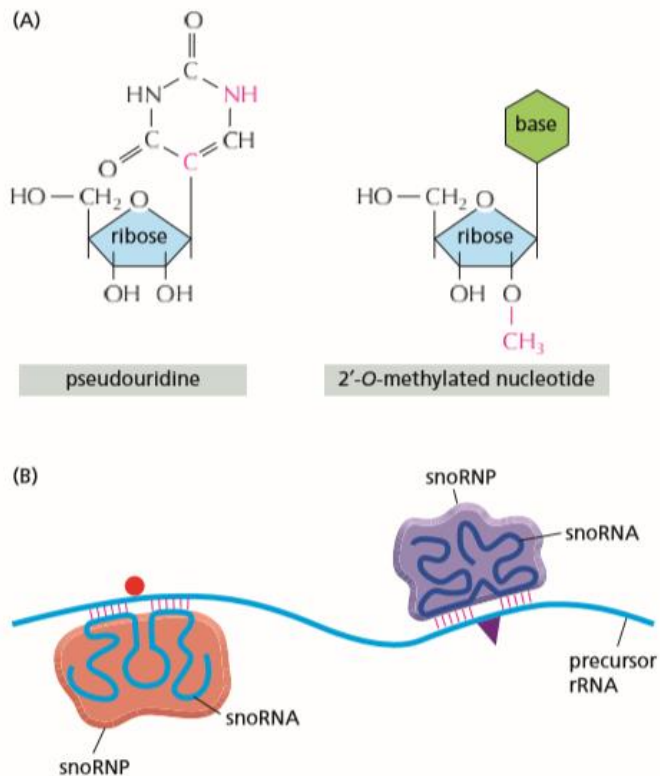


**Gambar 42** Modifikasi kimia dan pemrosesan nukleolitik dari molekul prekursor rRNA 45S eukariotik menjadi tiga RNA ribosom yang terpisah. Dua jenis modifikasi kimia (kode warna seperti yang ditunjukkan pada Gambar 43) dibuat untuk prekursor rRNA sebelum dibelah. Hampir setengah dari urutan nukleotida dalam prekursor rRNA ini dibuang dan terdegradasi dalam nukleus. RRNA diberi nama sesuai dengan nilai "S" mereka, yang merujuk pada tingkat sedimentasi mereka dalam ultrasentrifuge. Semakin besar nilai S, semakin besar rRNA

Modifikasi kimia ekstensif terjadi pada rRNA prekursor 13.000-nukleotida-panjang sebelum rRNA dibelah keluar dan dirakit menjadi ribosom. Ini termasuk sekitar 100 metilasi posisi 2'-OH pada gula nukleotida dan 100 isomerisasi nukleotida uridin menjadi pseudouridine (**Gambar 43A**). Fungsi-fungsi modifikasi ini tidak dipahami secara rinci, tetapi banyak yang mungkin membantu dalam pelipatan dan perakitan rRNA akhir dan beberapa mungkin secara halus mengubah fungsi ribosom. Setiap modifikasi dilakukan pada posisi tertentu dalam rRNA prekursor. Posisi-posisi ini ditentukan oleh sekitar 150 "RNA pemandu," yang memposisikan diri mereka melalui pasangan-basa dengan rRNA prekursor dan dengan demikian membawa enzim pengubah RNA ke posisi yang sesuai (**Gambar 43B**). Panduan lain RNA mempromosikan pembelahan rRNA prekursor ke rRNA matang, mungkin dengan menyebabkan perubahan konformasi pada rRNA prekursor yang membuat situs-situs ini terkena nukleasi. Semua RNA panduan ini adalah anggota dari kelas besar RNA yang disebut **RNA nukleolar kecil (atau snoRNAs)**,

dinamakan demikian karena RNA ini menjalankan fungsinya dalam subkotak nukleus yang disebut nukleolus. Banyak snoRNA dikodekan dalam intron gen lain, terutama yang mengkode protein ribosom. Oleh karena itu mereka disintesis oleh RNA polimerase II dan diproses dari urutan intron yang dipotong.

Baru-baru ini beberapa RNA seperti snoRNA telah diidentifikasi yang disintesis hanya dalam sel-sel otak. Ini diyakini mengarahkan modifikasi mRNA, bukan rRNA, dan cenderung mewakili jenis mekanisme pengaturan gen yang baru, tetapi kurang dipahami

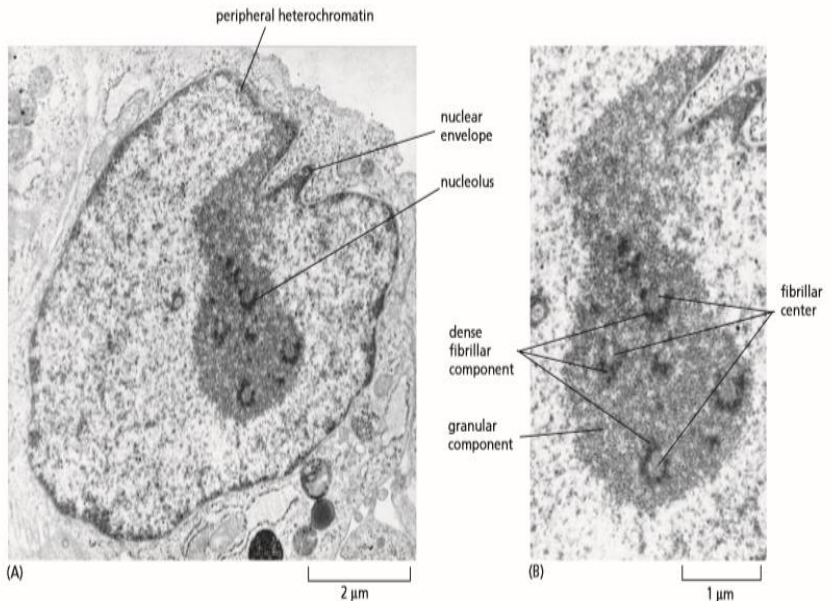


**Gambar 43. Modifikasi rRNA prekursor dengan panduan RNA.** (A) Dua modifikasi kovalen yang menonjol terjadi setelah sintesis rRNA; perbedaan dari nukleotida yang awalnya dimasukkan ditunjukkan oleh atom merah. Pseudouridine adalah isomer uridin; dasar telah "diputar" relatif terhadap gula. (B) Seperti yang ditunjukkan, snoRNAs menentukan situs modifikasi dengan pasangan-berpasangan untuk urutan pelengkap pada rRNA prekursor. SnoRNA terikat dengan

protein, dan kompleksnya disebut snoRNPs. snoRNP mengandung urutan panduan dan enzim yang memodifikasi rRNA.

## **Nucleolus Adalah Pabrik Penghasil Ribosome**

Nukleolus adalah struktur yang paling jelas terlihat pada nukleus sel eukariotik bila dilihat dalam mikroskop cahaya. Sebagai akibatnya, penelitian itu diawasi dengan cermat oleh para ahli sitologi awal sehingga suatu tinjauan tahun 1898 dapat mendaftarkan sekitar 700 referensi. Kita sekarang tahu bahwa nukleolus adalah situs untuk pemrosesan rRNA dan perakitannya menjadi subunit ribosom. Tidak seperti banyak organel utama dalam sel, nukleolus tidak terikat oleh membran (**Gambar 44**); sebaliknya, itu adalah agregat besar makromolekul, termasuk gen rRNA itu sendiri, rRNA prekursor, rRNA matang, enzim pemrosesan rRNA, snoRNPs, protein ribosom dan protein ribosom yang sebagian dirakit. Hubungan erat semua komponen ini memungkinkan perakitan ribosom terjadi dengan cepat dan lancar.



**Gambar 44 Mikrograf elektron dari bagian tipis nukleolus dalam fibroblast manusia, menunjukkan tiga zona berbeda.** (A) Tampilan seluruh inti. (B) Daya tinggi melihat nukleolus. Dipercayai bahwa transkripsi gen rRNA terjadi antara pusat fibrilar dan komponen fibrilar padat dan bahwa pemrosesan rRNA dan rakitannya menjadi dua subunit ribosom yang keluar dari komponen fibrilar padat ke komponen granular sekitarnya. (Atas perkenan E.G. Jordan dan J. McGovern.)

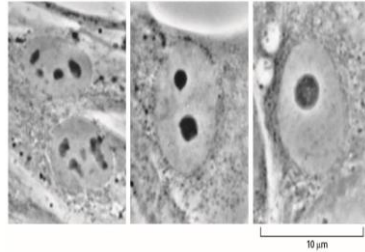
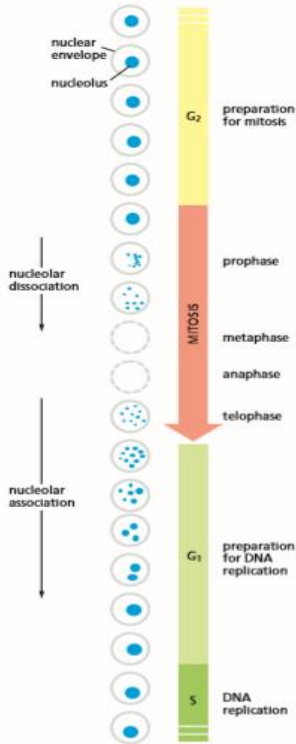
Berbagai jenis molekul RNA memainkan peran sentral dalam kimia dan struktur nukleolus, menunjukkan bahwa itu mungkin telah berevolusi dari struktur kuno hadir dalam sel yang didominasi oleh katalisis RNA. Dalam sel saat ini, gen

rRNA juga memiliki peran penting dalam pembentukan nucleolus. Dalam sel manusia diploid, gen rRNA didistribusikan ke dalam 10 kelompok, yang terletak di dekat ujung lima pasang kromosom yang berbeda (lihat Gambar 4-11). Selama interfase, 10 kromosom ini berkontribusi loop DNA (mengandung gen rRNA) ke nukleolus; dalam fase-M, ketika kromosom memadat, nukleolus menghilang. Akhirnya, di bagian telofase mitosis, ketika kromosom kembali ke keadaan semidispersednya, ujung 10 kromosom bergabung dan reformasi nukleolus (**Gambar 45 dan Gambar 46**). Transkripsi gen rRNA oleh RNA polimerase I diperlukan untuk proses ini. Seperti yang diharapkan, ukuran nukleolus mencerminkan jumlah ribosom yang diproduksi sel. Oleh karena itu ukurannya sangat bervariasi dalam sel yang berbeda dan dapat berubah dalam satu sel, menempati 25% dari total volume nuklir dalam sel yang menghasilkan jumlah protein yang luar biasa besar.

Perakitan ribosom adalah proses yang kompleks, fitur paling penting yang diuraikan dalam **Gambar 47**. Selain peran penting dalam biogenesis ribosom, nukleolus juga merupakan tempat di mana RNA lain diproduksi dan

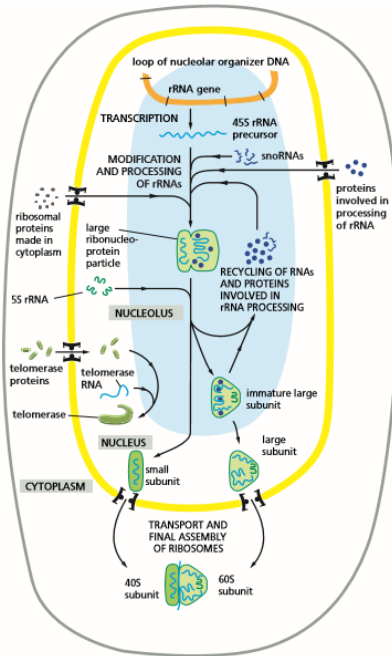


kompleks RNA-protein lainnya berkumpul. Sebagai contoh, snRNP U6, yang berfungsi dalam penyambungan pramRNA (lihat Gambar 29), terdiri dari satu molekul RNA dan setidaknya tujuh protein. SnRNA U6 dimodifikasi secara kimia oleh snoRNA di nukleolus sebelum perakitan terakhirnya di sana ke snRNP U6. Kompleks RNA-protein penting lainnya, termasuk telomerase (dijumpai pada Bab 5) dan partikel pengenal sinyal (yang kita bahas pada Bab 12), juga diyakini berkumpul di nukleolus. Akhirnya, tRNA (transfer RNA) yang membawa asam amino untuk sintesis protein diproses di sana juga; seperti gen rRNA, tRNA yang terkode itu dikelompokkan dalam nukleolus. Dengan demikian, nukleolus dapat dianggap sebagai pabrik besar di mana banyak RNA nonkode yang berbeda ditranskripsi, diproses, dan dirangkai dengan protein untuk membentuk berbagai macam kompleks ribonucleoprotein.



**Gambar 46 Fusi nuklir.** Mikrograf cahaya fibroblast manusia yang tumbuh dalam kultur ini menunjukkan berbagai tahap fusi nukleolar. Setelah mitosis, masing-masing dari 10 kromosom manusia yang membawa sekelompok gen rRNA mulai membentuk nukleolus kecil, tetapi ini dengan cepat bersatu ketika mereka tumbuh untuk membentuk nukleolus besar tunggal yang khas dari banyak sel interfase. (Atas perkenan E.G. Jordan dan J. McGovern.)

**Gambar 45 Perubahan dalam penampilan nukleolus dalam sel manusia selama siklus sel.** Hanya inti sel yang direpresentasikan dalam diagram ini. Pada sebagian besar sel eukariotik, amplop nuklir rusak



**Gambar 47 Fungsi nukleolus dalam ribosom dan sintesis ribonukleoprotein lainnya.** Prekursor rRNA 45S dikemas dalam partikel ribonukleoprotein besar yang mengandung banyak protein ribosom yang diimpor dari sitoplasma. Sementara partikel ini tetap di nukleolus, potongan-potongan yang dipilih ditambahkan dan yang lainnya dibuang karena diproses menjadi subunit ribosom besar dan kecil yang belum dewasa. Dua subunit ribosom diperkirakan mencapai bentuk fungsional akhirnya hanya karena masing-masing diangkut secara individu melalui pori-pori nuklir ke sitoplasma. Kompleks ribonucleoprotein lain, termasuk telomerase yang ditunjukkan di sini, juga dirakit dalam nukleolus.

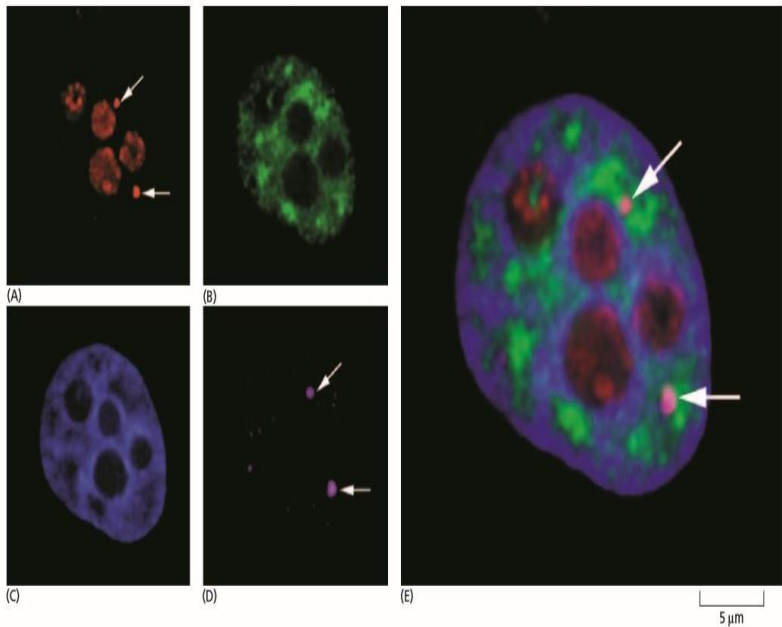
## Inti Mengandung Berbagai Struktur Subnuklear

Meskipun nukleolus adalah struktur yang paling menonjol dalam nukleus, beberapa badan nuklir lainnya telah diamati dan dipelajari (**Gambar 48**). Ini termasuk tubuh Cajal (dinamai untuk ilmuwan yang pertama kali menggambarannya pada tahun 1906), GEMS (Gemini dari tubuh Cajal), dan cluster granula interkromatin (juga disebut "bintik"). Seperti nukleolus, struktur nuklir lainnya ini tidak memiliki membran dan sangat dinamis; penampilan mereka mungkin merupakan hasil dari hubungan erat antara protein dan komponen RNA yang terlibat dalam sintesis, perakitan, dan penyimpanan makromolekul yang terlibat dalam ekspresi gen. Badan cajal dan permata menyerupai satu sama lain dan sering dipasangkan di nukleus; tidak jelas apakah mereka benar-benar mewakili struktur yang berbeda. Ini kemungkinan merupakan lokasi di mana snoRNA dan snRNA menjalani modifikasi kovalen dan perakitan akhir dengan protein. Sekelompok pemandu RNA, disebut *RNA Cajal kecil (scaRNAs)*, memilih situs modifikasi ini melalui pemasangan pasangan. Badan Cajal / GEMS juga dapat berupa situs dimana snRNP didaur ulang dan RNA-nya

"diatur ulang" setelah pengaturan ulang yang terjadi selama splicing (lihat hal. 352). Sebaliknya, kluster granula interkromatin telah diusulkan sebagai stok snRNP yang sepenuhnya matang dan komponen pemrosesan RNA lainnya yang siap digunakan dalam produksi mRNA **(Gambar 49)**.

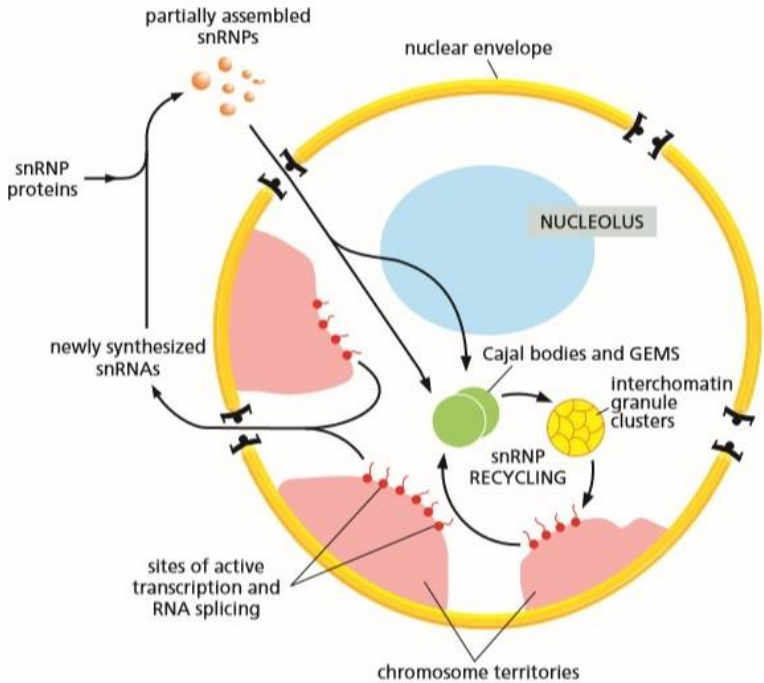
Para ilmuwan telah mengalami kesulitan dalam mengerjakan fungsi struktur-struktur subnuklir kecil ini, sebagian karena penampilan mereka berbeda di antara organisme dan dapat berubah secara dramatis ketika sel-sel melintasi siklus sel atau menanggapi perubahan dalam lingkungan mereka. Banyak kemajuan yang sekarang dibuat tergantung pada alat-alat genetik, pemeriksaan efek mutasi yang dirancang pada organisme model atau mutasi spontan pada manusia. Sebagai salah satu contoh, GEMS mengandung protein SMN (survival of motor neuron). Mutasi gen tertentu yang mengkode protein ini adalah penyebab atrofi otot tulang belakang yang diwariskan, penyakit manusia yang ditandai dengan pemborosan otot. Penyakit ini tampaknya disebabkan oleh cacat dalam

produksi snRNP. Hilangnya SNRNP yang lebih lengkap diharapkan akan mematikan.



**Gambar 48 Visualisasi beberapa badan nuklir terkemuka.** (A) - (D) Mikrograf dari inti sel manusia yang sama, masing-masing diproses untuk menunjukkan seperangkat struktur nuklir tertentu. (E) Keempat gambar diperbesar dan ditumpangkan. (A) menunjukkan lokasi protein fibrillarin (komponen dari beberapa snoRNPs), yang hadir di kedua nukleolus dan tubuh Cajal, yang terakhir ditunjukkan oleh panah. (B) menunjukkan kelompok granula interkromatin atau "bintik-bintik" yang terdeteksi dengan menggunakan antibodi terhadap protein yang terlibat dalam splicing pra-mRNA. (C) diwarnai untuk menunjukkan kromatin massal. (D) menunjukkan lokasi protein coilin, yang ada di tubuh Cajal (panah; lihat juga Gambar 4-67). (Dari J.R. Swedlow dan A.I. Lamond,

Jenderal Biol. 2:1-7, 2001. Dengan izin dari BioMed Central. Micrographs milik Judith Sleeman.)



**Gambar 49 Skema pandangan struktur subnuklir.** Inti vertebrata tipikal memiliki beberapa badan Cajal, yang diusulkan sebagai situs di mana snRNPs dan snoRNPs menjalani modifikasi akhir mereka. Cluster granula interkromatin diusulkan sebagai tempat penyimpanan untuk snRNP yang sepenuhnya matang. Inti vertebrata yang khas memiliki 20-50 kelompok granula interkromatin.

Setelah sintesis awal, snRNA diekspor dari nukleus untuk menjalani pemrosesan akhir 5' dan 3' dan berkumpul dengan tujuh protein snRNP yang umum (disebut protein Sm). Kompleks ini dimasukkan kembali ke dalam nukleus dan snRNPs menjalani modifikasi terakhirnya dengan scaRNAs di badan Cajal. Selain itu,

snoRNAs secara kimia mengubah snRNP U6 di nukleolus. Situs transkripsi aktif dan splicing (sekitar 2000-3000 situs per nukleus vertebrata) sesuai dengan "serat perichromatin" yang terlihat di bawah mikroskop elektron. (Diadaptasi dari J.D. Lewis dan D. Tollervey, *Science* 288: 1385–1389, 2000. Dengan izin dari AAAS.)

Mengingat pentingnya subdomain nuklir dalam pemrosesan RNA, mungkin diharapkan bahwa penyambungan pra-mRNA akan terjadi di lokasi tertentu dalam inti, karena memerlukan banyak komponen RNA dan protein. Namun, perakitan komponen penyambungan pada pre-mRNA adalah co-transkripsional; dengan demikian, splicing harus terjadi di banyak lokasi di sepanjang kromosom. Meskipun sel mamalia tipikal mungkin mengekspresikan pada urutan 15.000 gen, transkripsi dan splicing RNA dapat dilokalisasi ke hanya beberapa ribu situs di dalam nukleus. Situs-situs ini sendiri sangat dinamis dan mungkin hasil dari asosiasi komponen transkripsi dan penyambungan untuk membuat "jalur perakitan" kecil dengan konsentrasi lokal yang tinggi dari komponen-komponen ini. Cluster granula interkromatin yang mengandung timbunan komponen pemrosesan RNA sering diamati di sebelah lokasi transkripsi, seolah siap untuk



menambah persediaan. Dengan demikian, nukleus tampaknya sangat terorganisir menjadi subdomain, dengan snRNPs, snoRNPs, dan komponen nuklir lainnya bergerak di antara mereka secara teratur sesuai dengan kebutuhan sel (lihat Gambar 48; juga lihat Gambar 4–69).

## Ringkasan

*Sebelum sintesis protein tertentu dapat dimulai, molekul mRNA yang sesuai harus diproduksi dengan transkripsi. Bakteri mengandung satu jenis RNA polimerase (enzim yang melakukan transkripsi DNA menjadi RNA). Molekul mRNA diproduksi ketika enzim ini menginisiasi transkripsi pada promotor, mensintesis RNA dengan perpanjangan rantai, menghentikan transkripsi pada terminator, dan melepaskan contoh DNA dan molekul mRNA yang lengkap. Dalam sel eukariotik, proses transkripsi jauh lebih kompleks, dan ada tiga RNA polimerase, polimerase I, II, dan III yang terkait secara evolusioner satu sama lain dan dengan bakteriase polimerase.*

*RNA polimerase II mensintesis mRNA eukariotik. Enzim ini membutuhkan serangkaian protein tambahan, faktor transkripsi umum, untuk memulai transkripsi pada contoh DNA yang*

*dimurnikan, dan masih banyak lagi protein (termasuk kompleks remodeling kromatin dan enzim pengubah histone) untuk memulai transkripsi pada contoh kromatin di dalam sel.*

*Selama fase pemanjangan transkripsi, RNA yang baru lahir mengalami tiga jenis peristiwa pemrosesan: nukleotida khusus ditambahkan ke ujung 5' (capping), urutan intron dihapus dari tengah molekul RNA (splicing), dan 3' akhir RNA dihasilkan (pembelahan dan polyadenylation). Masing-masing proses ini diprakarsai oleh protein yang berjalan bersama dengan RNA polimerase II dengan mengikat ke situs pada ekor C-terminal yang panjang dan diperpanjang. Mencetak tidak biasa karena banyak langkah kuncinya dilakukan oleh molekul RNA khusus daripada protein. MRNA yang diproses dengan benar dilewatkan melalui kompleks pori nuklir ke dalam sitosol, di mana mereka diterjemahkan menjadi protein.*

*Untuk beberapa gen, RNA adalah produk akhir. Pada eucaryotes, gen-gen ini biasanya ditranskripsi oleh RNA polimerase I atau RNA polimerase III. RNA polimerase I membuat RNA ribosom. Setelah sintesisnya sebagai prekursor besar, rRNA dimodifikasi secara kimia, dibelah, dan dirangkai menjadi dua subunit ribosom di nukleolus — struktur subnuklear berbeda yang*

*juga membantu memproses beberapa kompleks protein RNA yang lebih kecil di dalam sel. Struktur subnuklir tambahan (termasuk badan Cajal dan kluster granula interkromatin) adalah tempat di mana komponen yang terlibat dalam pemrosesan RNA dirakit, disimpan, dan didaur ulang.*

## **DARI RNA KE PROTEIN**

Pada bagian sebelumnya kita telah melihat bahwa produk akhir dari beberapa gen adalah molekul RNA itu sendiri, seperti yang ada di snRNPs dan di ribosom. Namun, sebagian besar gen dalam sel menghasilkan molekul mRNA yang berfungsi sebagai perantara dalam jalur menuju protein. Pada bagian ini kita menguji bagaimana sel mengubah informasi yang dibawa dalam molekul mRNA menjadi molekul protein. Prestasi penerjemahan ini menjadi fokus perhatian para ahli biologi pada akhir 1950-an, ketika diajukan sebagai "masalah pengkodean": bagaimana informasi dalam urutan linear nukleotida dalam RNA diterjemahkan ke dalam urutan linear dari serangkaian kimia yang sangat berbeda unit — asam amino dalam protein? Pertanyaan yang menarik ini merangsang kegembiraan besar

di antara para ilmuwan saat itu. Inilah kriptogram yang dibuat oleh alam yang, setelah lebih dari 3 miliar tahun evolusi, akhirnya dapat dipecahkan oleh salah satu produk evolusi — manusia. Dan memang, kode itu tidak hanya retak secara bertahap, tetapi pada tahun 2000 struktur mesin rumit tempat sel membaca kode ini — ribosom — akhirnya terungkap dalam detail atom.

### **Sekuens mRNA Didekodekan dalam Set Tiga Nukleotida**

Setelah mRNA diproduksi melalui transkripsi dan pemrosesan, informasi yang ada dalam urutan nukleotidanya digunakan untuk mensintesis protein. Transkripsi mudah dipahami sebagai sarana transfer informasi: karena DNA dan RNA secara kimia dan struktural serupa, DNA dapat bertindak sebagai contoh langsung untuk sintesis RNA dengan pemasangan pasangan basa komplementer. Seperti istilah transkripsi menandakan, seolah-olah pesan yang ditulis dengan tangan sedang dikonversi, katakanlah, menjadi teks yang diketik. Bahasa itu sendiri dan bentuk pesan tidak berubah, dan simbol yang digunakan terkait erat.

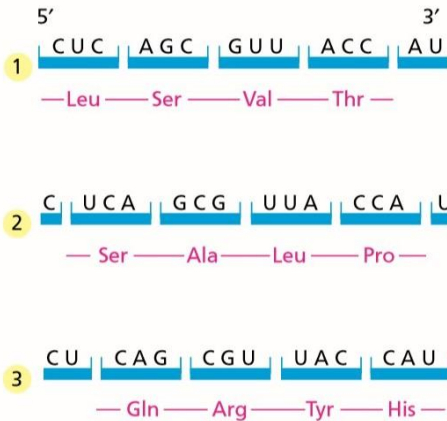
Sebaliknya, konversi informasi dalam RNA menjadi protein mewakili terjemahan informasi ke bahasa lain yang menggunakan simbol yang sangat berbeda. Selain itu, karena hanya ada 4 nukleotida berbeda dalam mRNA dan 20 jenis asam amino dalam protein, terjemahan ini tidak dapat dijelaskan dengan korespondensi satu-ke-satu langsung antara nukleotida dalam RNA dan asam amino dalam protein. Urutan nukleotida gen, melalui perantara mRNA, diterjemahkan ke dalam urutan asam amino protein dengan aturan yang dikenal sebagai kode genetik. Kode ini diuraikan pada awal 1960-an.

Urutan nukleotida dalam molekul mRNA dibaca dalam tiga kelompok berturut-turut. RNA adalah polimer linier dari empat nukleotida yang berbeda, jadi ada  $4 \times 4 \times 4 = 64$  kemungkinan kombinasi dari tiga nukleotida: kembar tiga AAA, AUA, AUG, dan sebagainya. Namun, hanya 20 asam amino berbeda yang biasa ditemukan dalam protein. Entah beberapa triplet nukleotida tidak pernah digunakan, atau kodenya redundan dan beberapa asam amino ditentukan oleh lebih dari satu triplet. Kemungkinan kedua adalah, pada kenyataannya, yang benar, seperti yang



amino diwakili oleh lebih dari satu kodon, dan bahwa ada beberapa keteraturan dalam himpunan kodon yang menentukan masing-masing asam amino. Kodon untuk asam amino yang sama cenderung mengandung nukleotida yang sama pada posisi pertama dan kedua, dan bervariasi pada posisi ketiga. Tiga kodon tidak menentukan asam amino apa pun tetapi bertindak sebagai tempat terminasi (stop kodon), menandakan akhir dari urutan pengkodean protein. Satu kodon — AUG — bertindak baik sebagai kodon inisiasi, menandakan awal dari pesan pengkode protein, dan juga sebagai kodon yang menentukan metionin.

Pada prinsipnya, urutan RNA dapat diterjemahkan dalam salah satu dari tiga frame pembacaan yang berbeda, tergantung di mana proses decoding dimulai (Gambar –51). Namun, hanya satu dari tiga kerangka bacaan yang memungkinkan dalam mRNA yang mengkode protein yang dibutuhkan. Kita melihat nanti bagaimana sinyal tanda baca khusus pada awal setiap pesan RNA menetapkan kerangka pembacaan yang benar pada awal sintesis protein.



**Gambar 51 Tiga kerangka bacaan yang memungkinkan dalam sintesis protein.** Dalam proses menerjemahkan urutan nukleotida (biru) menjadi urutan asam amino (merah), urutan nukleotida dalam molekul mRNA dibaca dari ujung 5' hingga ujung 3' dalam rangkaian tiga nukleotida berturut-turut. Pada prinsipnya, oleh karena itu, urutan RNA yang sama dapat menentukan tiga urutan asam amino yang sangat berbeda, tergantung pada kerangka bacaan. Namun pada kenyataannya, hanya satu dari kerangka bacaan ini yang mengandung pesan aktual.

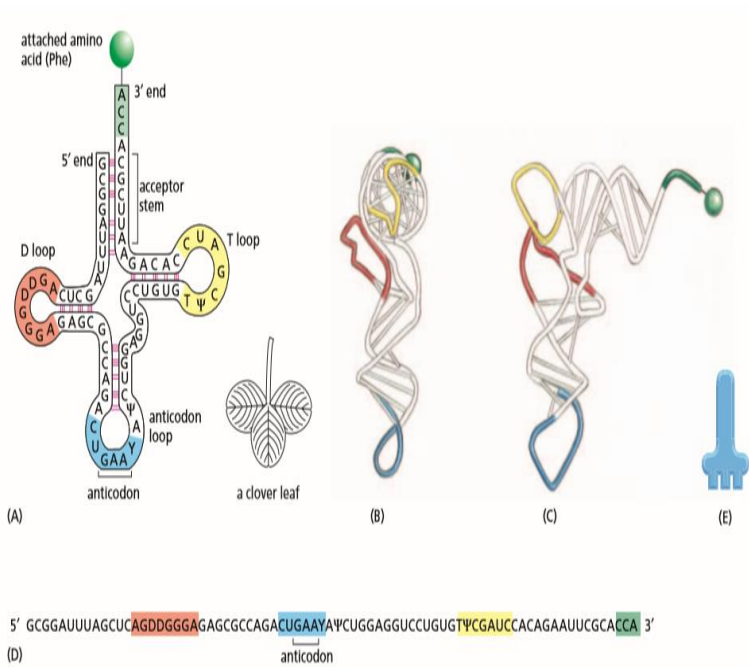
### Amino dengan Codon dalam mRNA

Kodon dalam molekul mRNA tidak secara langsung mengenali asam amino yang ditentukan: kelompok tiga nukleotida tidak, misalnya, berikatan langsung dengan asam amino. Sebaliknya, terjemahan mRNA menjadi protein



tergantung pada molekul adaptor yang dapat mengenali dan mengikat kodon dan, di situs lain di permukaannya, dengan asam amino. Adaptor ini terdiri dari seperangkat molekul RNA kecil yang dikenal sebagai transfer RNA (tRNA), masing-masing panjangnya sekitar 80 nukleotida.

Kita telah melihat sebelumnya dalam bab ini bahwa molekul RNA dapat dilipat menjadi struktur tiga dimensi yang tepat, dan molekul tRNA memberikan contoh yang mencolok. Empat segmen pendek dari tRNA terlipat adalah heliks ganda, menghasilkan molekul yang terlihat seperti daun semanggi ketika digambar secara skematis (Gambar – 52). Misalnya, urutan 5' -GCUC-3' di satu bagian rantai polinukleotida dapat membentuk hubungan yang relatif kuat dengan urutan 5' -GAGC-3' di wilayah lain dari molekul yang sama. Daun semanggi mengalami pelipatan lebih lanjut untuk membentuk struktur berbentuk L yang kompak yang disatukan oleh ikatan hidrogen tambahan antara berbagai daerah molekul.



**Gambar 52 Molekul tRNA.** Sebuah tRNA spesifik untuk fenilalanin asam amino (Phe) digambarkan dalam berbagai cara. (A) Struktur daun semanggi menunjukkan pemasangan pasangan basa komplementer (garis merah) yang menciptakan daerah heliks ganda dari molekul. Antikodon adalah urutan tiga nukleotida yang berpasangan dengan kodon dalam mRNA. Asam amino yang cocok dengan pasangan kodon / antikodon dilekatkan pada ujung 3' tRNA. tRNA mengandung beberapa basa yang tidak biasa, yang diproduksi oleh modifikasi kimia setelah tRNA disintesis. Misalnya, basa-basa yang dilambangkan y (pseudouridine — lihat Gambar –43) dan D (dihidrouridin — lihat Gambar –55) berasal dari urasil. (B dan C) Tampilan molekul berbentuk-L, berdasarkan analisis difraksi sinar-x. Meskipun diagram ini menunjukkan tRNA untuk fenilalanin asam amino, semua tRNA lainnya memiliki struktur yang serupa. <CGCA>. (D) Urutan nukleotida linear dari molekul, kode

warna untuk mencocokkan (A), (B), dan (C). (E) Ikon tRNA yang kami tuntut dalam buku ini.

Dua daerah nukleotida tidak berpasangan terletak di kedua ujung molekul berbentuk L sangat penting untuk fungsi tRNA dalam sintesis protein. Salah satu daerah ini membentuk antikodon, satu set tiga nukleotida berturut-turut yang berpasangan dengan kodon pelengkap dalam molekul mRNA. Yang lainnya adalah daerah berantai tunggal pendek di ujung 3' molekul; ini adalah situs di mana asam amino yang cocok dengan kodon melekat pada tRNA. Kita telah melihat di bagian sebelumnya bahwa kode genetik itu berlebihan; yaitu, beberapa kodon yang berbeda dapat menentukan asam amino tunggal (lihat Gambar 50). Redundansi ini menyiratkan bahwa ada lebih dari satu tRNA untuk banyak asam amino atau beberapa molekul tRNA dapat berpasangan dengan lebih dari satu kodon. Faktanya, kedua situasi terjadi. Beberapa asam amino memiliki lebih dari satu tRNA dan beberapa tRNA dibangun sehingga mereka membutuhkan pasangan basa yang akurat hanya pada dua posisi pertama kodon dan dapat mentolerir ketidakcocokan (atau goyangan) di posisi ketiga (Gambar

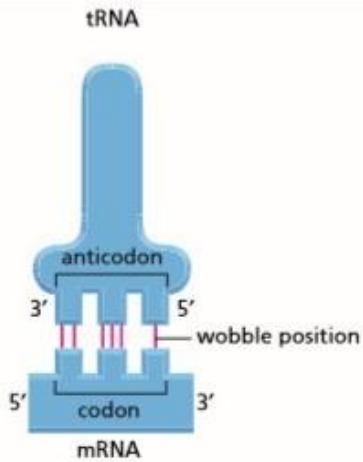
53). Pasangan basa goyah ini menjelaskan mengapa begitu banyak kodon alternatif untuk asam amino hanya berbeda dalam nukleotida ketiga (lihat Gambar 50). Pada bakteri, pasangan basa goyangan memungkinkan untuk mencocokkan 20 asam amino dengan 61 kodonnya dengan sedikitnya 31 jenis molekul tRNA. Namun, jumlah pasti dari berbagai jenis tRNA berbeda dari satu spesies ke spesies lainnya. Sebagai contoh, manusia memiliki hampir 500 gen tRNA tetapi, di antara mereka, hanya 48 antikodon yang berbeda terwakili.

### **tRNA Dimodifikasi Secara Kovalen Sebelum Keluar dari Inti**

Seperti kebanyakan RNA eukariotik lainnya, tRNA dimodifikasi secara kovalen sebelum diizinkan keluar dari nukleus. tRNA eukariotik disintesis oleh RNA polimerase III. Baik tRNA bakteri dan eukariotik biasanya disintesis sebagai tRNA prekursor yang lebih besar, yang kemudian dipangkas untuk menghasilkan tRNA dewasa. Selain itu, beberapa prekursor tRNA (dari bakteri dan eucaryotes) mengandung intron yang harus disambungkan. Reaksi

penyambungan ini berbeda secara kimia dari penyambungan pra-mRNA; Daripada menghasilkan perantara lariat, splicing tRNA menggunakan mekanisme cut-and-paste yang dikatalisis oleh protein (Gambar 54). Pemangkasan dan penyambungan keduanya membutuhkan prekursor tRNA untuk dilipat dengan benar dalam konfigurasi cloverleaf-nya. Karena prekursor tRNA yang tidak dilipat tidak akan diproses dengan benar, reaksi pemangkasan dan penyambungan dianggap bertindak sebagai langkah kontrol kualitas dalam pembuatan tRNA.

Semua tRNA dimodifikasi secara kimia hampir 1 dari 10 nukleotida dalam setiap molekul tRNA matang adalah versi yang diubah dari standar G, U, C, atau A ribonukleotida. Lebih dari 50 jenis modifikasi tRNA diketahui; beberapa ditunjukkan pada Gambar 55. Beberapa nukleotida termodifikasi terutama inosin, yang dihasilkan oleh deaminasi adenosin mempengaruhi konformasi dan basepairing antikodon dan dengan demikian memudahkan pengenalan kodon mRNA yang sesuai oleh molekul tRNA (lihat Gambar 53). Yang lain memengaruhi keakuratan tRNA yang melekat pada asam amino yang benar.



bacteria

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U or I
G	C or U

eucaryotes

wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I
C	G or I
A	U
G	C

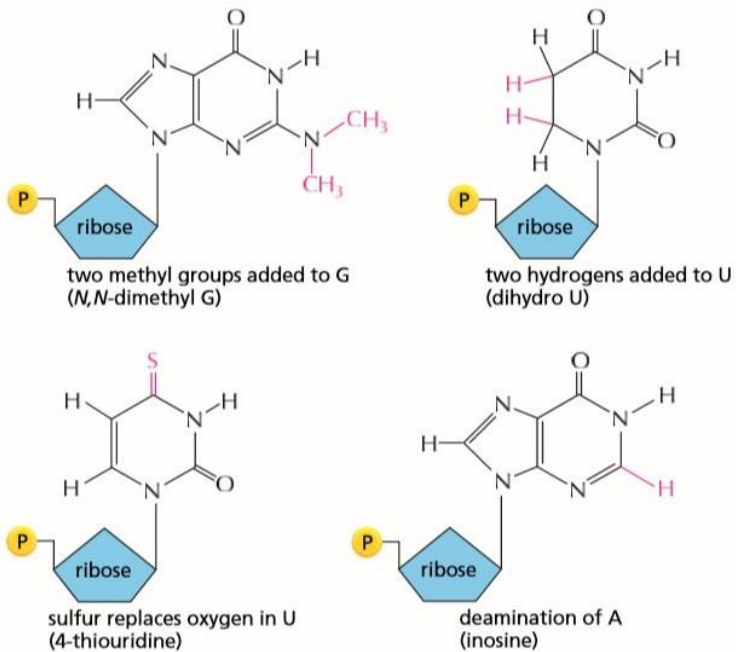
**Gambar 53 Goyangan pasangan antara kodon dan antikodon.**

Jika nukleotida yang tercantum dalam kolom pertama hadir pada posisi ketiga, atau goyangan, dari kodon, ia dapat mendasarkan dengan pasangan nukleotida yang tercantum dalam kolom kedua. Jadi, misalnya, ketika inosin (I) hadir dalam posisi goyangan dari antikodon tRNA, tRNA dapat mengenali salah satu dari tiga kodon berbeda dalam bakteri dan salah satu dari dua kodon pada eucaryotes. Inosin dalam tRNA terbentuk dari deaminasi guanin (lihat Gambar –55), modifikasi kimia yang terjadi setelah tRNA disintesis. Pasangan basa tidak standar, termasuk yang dibuat dengan inosin, umumnya lebih lemah dari pasangan basa konvensional. Perhatikan bahwa pemasangan pasangan kodon-antikodon lebih ketat pada posisi 1 dan 2 kodon: di sini hanya pasangan basa konvensional yang diizinkan. Perbedaan dalam interaksi pasangan basa goyangan antara bakteri dan eucaryotes mungkin hasil dari perbedaan struktural yang halus antara ribosom bakteri dan eucaryotic, mesin molekuler yang melakukan sintesis protein. (Diadaptasi dari C. Guthrie dan J. Abelson, dalam *Biologi Molekuler Ragi Saccharomyces: Metabolisme dan Ekspresi Gen*, hlm. 487-528. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.)



**Gambar 54 Struktur endonuklease splicing tRNA berlabuh ke tRNA prekursor.** Endonuklease (enzim empat-subunit) menghilangkan intron tRNA (biru). Enzim kedua, tRNA ligase multifungsi (tidak diperlihatkan), kemudian menggabungkan dua bagian tRNA menjadi satu. (Atas perkenan Hong Li, Christopher Trotta dan John Abelson.)



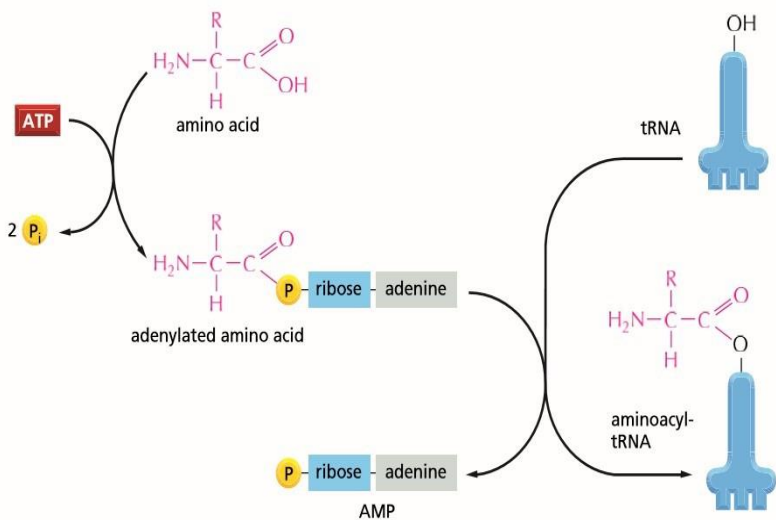


**Gambar 55A beberapa nukleotida yang tidak biasa ditemukan dalam molekul tRNA.** Nukleotida ini dihasilkan oleh modifikasi kovalen dari nukleotida normal setelah dimasukkan ke dalam rantai RNA. Dua jenis nukleotida termodifikasi ditunjukkan pada Gambar 43. Pada sebagian besar molekul tRNA, sekitar 10% nukleotida dimodifikasi (lihat Gambar 52).

## Enzim Khusus Menyatukan Setiap Asam Amino dengan Molekul tRNA yang Sesuai

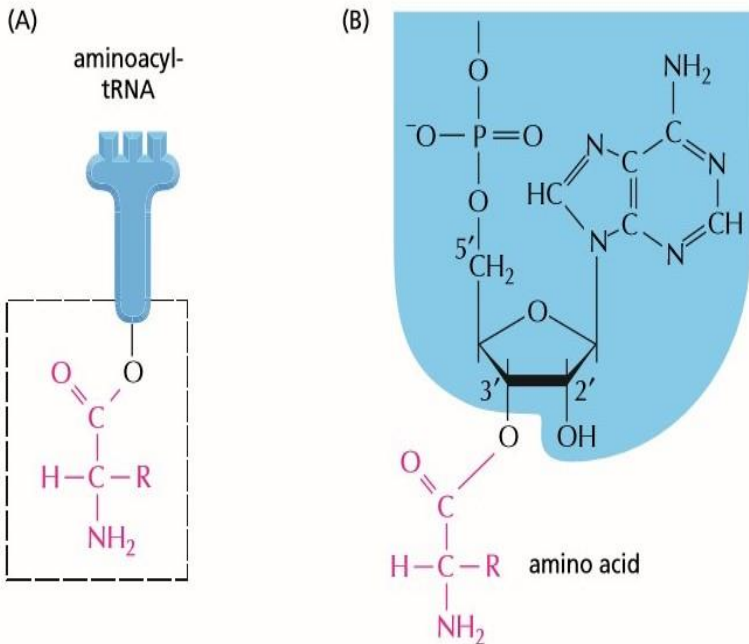
Kita telah melihat bahwa, untuk membaca kode genetik dalam DNA, sel membuat serangkaian tRNA yang berbeda. Kami sekarang mempertimbangkan bagaimana setiap molekul tRNA menjadi terkait dengan satu asam amino dalam 20 yang merupakan mitra yang tepat. Pengakuan dan perlekatan asam amino yang benar tergantung pada enzim yang disebut aminoacyl-tRNA synthetases, yang secara kovalen memasang setiap asam amino ke set molekul tRNA yang sesuai (Gambar 56 dan Gambar 57). Sebagian besar sel memiliki enzim sintetase yang berbeda untuk setiap asam amino (yaitu, 20 sintetase semuanya); satu menempel glisin ke semua tRNA yang mengenali kodon untuk glisin, yang lain menempel alanin ke semua tRNA yang mengenali kodon untuk alanin, dan sebagainya. Banyak bakteri, bagaimanapun, memiliki kurang dari 20 sintetase, dan enzim sintetase yang sama bertanggung jawab untuk menggabungkan lebih dari satu asam amino dengan tRNA yang sesuai. Dalam kasus ini, sebuah sintetase tunggal menempatkan asam amino yang

identik pada dua jenis tRNA yang berbeda, hanya satu yang memiliki antikodon yang cocok dengan asam amino. Enzim kedua kemudian secara kimia memodifikasi setiap asam amino yang melekat secara "salah" sehingga sekarang sesuai dengan antikodon yang ditunjukkan oleh tRNA yang terkait secara kovalen.



**Gambar 56 Aktivasi asam minmin.** Asam amino diaktifkan untuk sintesis protein oleh enzim aminoasil-tRNA sintetase dalam dua langkah. Enzim sintetase dalam dua langkah. Seperti yang ditunjukkan, energi hidrolisis ATP digunakan untuk mengikat setiap asam amino ke molekul tRNA-nya dalam hubungan energi tinggi. Asam amino pertama-tama diaktifkan melalui hubungan gugus karboksilnya langsung ke bagian AMP, membentuk asam amino adenilasi; hubungan AMP, biasanya

reaksi yang tidak menguntungkan, didorong oleh hidrolisis molekul ATP yang menyumbangkan AMP. Tanpa meninggalkan enzim sintetase, gugus karboksil AMPLinked pada asam amino kemudian dipindahkan ke gugus hidroksil pada gula pada ujung 3' dari molekul tRNA. Pemindahan ini menggabungkan asam amino dengan hubungan ester teraktivasi ke tRNA dan membentuk molekul aminoasil-tRNA akhir. Enzim sintetase tidak ditunjukkan dalam diagram ini.



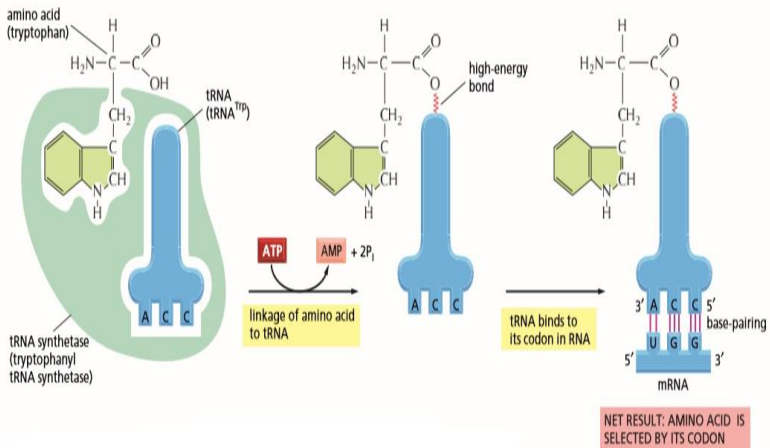
**Gambar –57 Struktur hubungan aminoasil-tRNA.** Ujung karboksil dari asam amino membentuk ikatan ester terhadap ribosa. Karena hidrolisis ikatan ester ini dikaitkan dengan perubahan besar yang menguntungkan dalam energi bebas, asam amino yang ditahan dengan cara ini dikatakan diaktifkan. (A) Gambar skematis struktur. Asam amino terkait dengan nukleotida pada ujung 3' tRNA (lihat Gambar 52). (B) Struktur aktual

yang sesuai dengan wilayah kotak di (A). Ada dua kelas utama enzim sintetase: satu menghubungkan asam amino langsung ke kelompok 3' - OH dari ribosa, dan yang lain menghubungkannya awalnya ke kelompok 2'-OH. Dalam kasus terakhir, reaksi transesterifikasi selanjutnya menggeser asam amino ke posisi 3'. Seperti pada Gambar 56, "grup R" menunjukkan rantai samping asam amino.

Reaksi yang dikatalisis oleh sintetase yang menempelkan asam amino ke ujung 3' tRNA adalah salah satu dari banyak reaksi yang digabungkan dengan hidrolisis ATP yang melepaskan energi (lihat hal. 79-81), dan menghasilkan ikatan energi tinggi antara tRNA dan asam amino. Energi ikatan ini digunakan pada tahap selanjutnya dalam sintesis protein untuk menghubungkan asam amino secara kovalen dengan rantai polipeptida yang sedang tumbuh.

Enzim aminoetil-tRNA synthetase dan tRNA sama pentingnya dalam proses dekode (Gambar 58). Ini didirikan oleh percobaan di mana satu asam amino (sistein) secara kimia diubah menjadi asam amino yang berbeda (alanin) setelah sudah melekat pada tRNA spesifiknya. Ketika molekul-molekul aminoasil-tRNA "hibrid" seperti itu digunakan untuk sintesis protein dalam sistem bebas-sel,

asam amino yang salah dimasukkan pada setiap titik dalam rantai protein tempat tRNA itu digunakan. Meskipun, seperti yang akan kita lihat, sel memiliki beberapa mekanisme kontrol kualitas untuk menghindari jenis kecelakaan ini, percobaan menetapkan bahwa kode genetik diterjemahkan oleh dua set adapter yang bertindak berurutan. Masing-masing mencocokkan satu permukaan molekul dengan lainnya dengan kekhususan yang besar, dan merupakan tindakan gabungan mereka yang menghubungkan setiap urutan tiga nukleotida dalam molekul mRNA yaitu, masing-masing kodon dengan asam amino khususnya



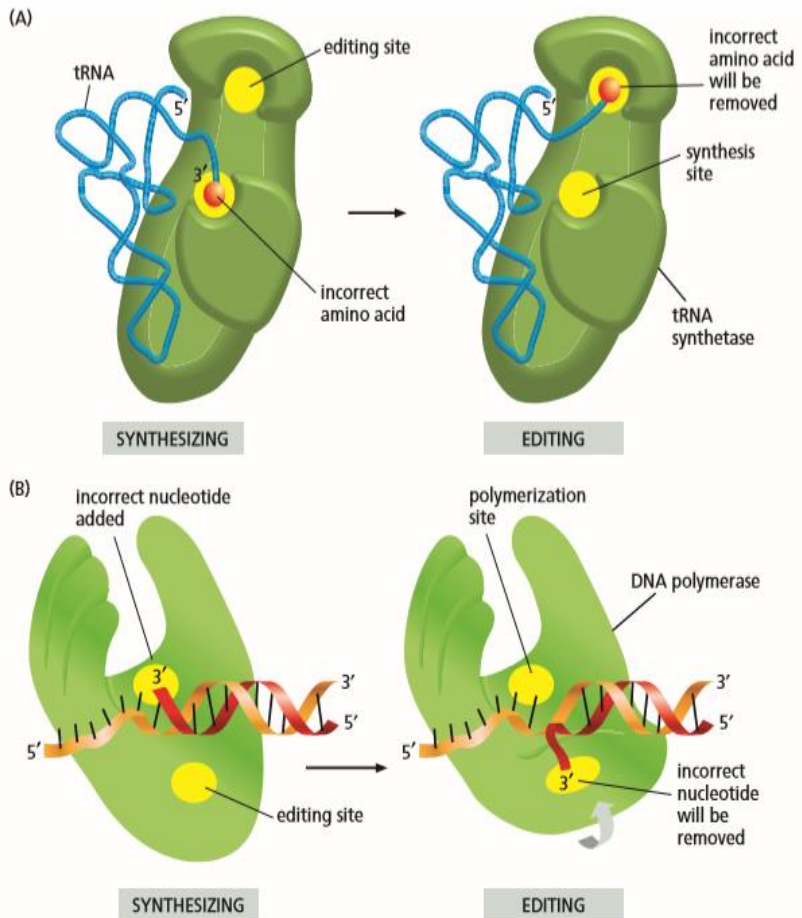
**Gambar 58 Kode genetik diterjemahkan dengan menggunakan dua adapter yang bertindak satu demi satu.** Adaptor pertama adalah aminoacyl-tRNA synthetase, yang memasangkan asam amino tertentu dengan tRNA yang sesuai; adaptor kedua adalah molekul tRNA itu sendiri, yang antikodonna membentuk pasangan basa dengan kodon yang sesuai pada mRNA. Kesalahan dalam setiap langkah akan menyebabkan asam amino yang salah dimasukkan ke dalam rantai protein. Dalam urutan kejadian yang ditunjukkan, asam amino triptofan (Trp) dipilih oleh kodon UGG pada mRNA.

### **Editing oleh tRNA Synthetases Memastikan Akurasi**

Beberapa mekanisme yang bekerja bersama memastikan bahwa tRNA synthetase menghubungkan asam amino yang benar dengan masing-masing tRNA. Sintetase pertama-tama harus memilih asam amino yang benar, dan sebagian besar sintetase melakukannya dengan mekanisme dua langkah. Pertama, asam amino yang benar memiliki afinitas tertinggi untuk kantong aktif-situs sintetase-nya, dan karena itu lebih disukai daripada yang lain 19. Secara khusus, asam amino yang lebih besar dari yang benar secara efektif dikeluarkan dari situs aktif. Namun, diskriminasi yang akurat antara dua asam amino yang sama, seperti isoleusin dan valin (yang berbeda hanya dengan kelompok

metil), sangat sulit dicapai dengan mekanisme pengenalan satu langkah. Langkah diskriminasi kedua terjadi setelah asam amino secara kovalen terkait dengan AMP (lihat Gambar 56). Ketika tRNA mengikat sintetase, ia mencoba untuk memaksa asam amino ke dalam kantong kedua di synthetase, dimensi tepat yang tidak termasuk asam amino yang benar tetapi memungkinkan akses oleh asam amino yang terkait erat. Setelah asam amino memasuki kantong pengeditan ini, asam terhidrolisis dari AMP (atau dari tRNA itu sendiri jika ikatan aminoasil-tRNA telah terbentuk), dan dilepaskan dari enzim. Pengeditan hidrolitik ini, yang analog dengan proofreading eksonukleolitik oleh DNA polimerase (Gambar 59), meningkatkan akurasi pengisian tRNA secara keseluruhan hingga sekitar satu kesalahan dalam 40.000 sambungan.

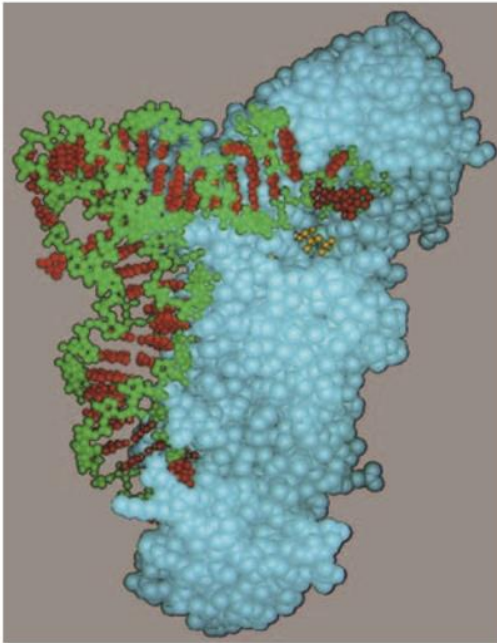




**Gambar 59 Pengeditan Hidrolitik.** (A) tRNA synthetases menghilangkan kesalahan kopling mereka sendiri melalui pengeditan hidrolitik asam amino yang salah pasang. Seperti yang dijelaskan dalam teks, asam amino yang benar ditolak oleh situs pengeditan. (B) Proses koreksi kesalahan yang dilakukan oleh DNA polimerase menunjukkan

beberapa kesamaan; Namun, ini berbeda sejauh proses penghapusan sangat bergantung pada kesalahan pemasangan dengan contohe (lihat Gambar 5-8).

TRNA synthetase juga harus mengenali set tRNA yang benar, dan komplementaritas struktural dan kimia yang luas antara synthetase dan tRNA memungkinkan synthetase untuk menyelidiki berbagai fitur tRNA (Gambar 60). Kebanyakan sintetik tRNA secara langsung mengenali antikodon tRNA yang cocok; sintetase ini mengandung tiga kantong pengikat nukleotida yang berdekatan, masing-masing bentuknya saling melengkapi dan mengisi ke nukleotida dalam antikodon. Untuk sintetase lain, urutan nukleotida batang akseptor adalah penentu utama pengenalan. Namun dalam banyak kasus, synthetase “membaca” nukleotida pada beberapa posisi berbeda pada tRNA

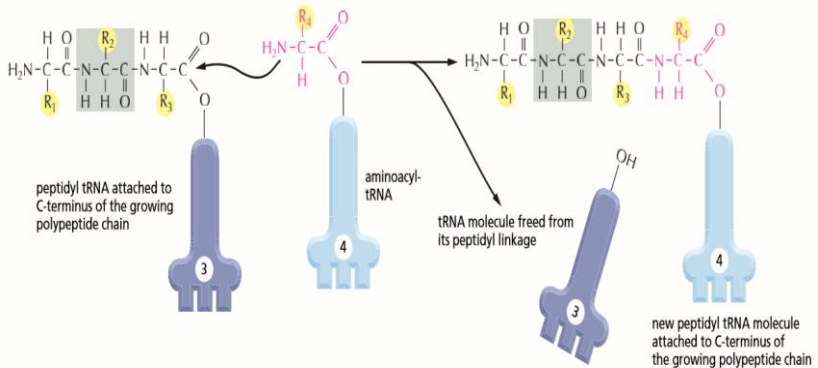


**Gambar 60 Pengakuan molekul tRNA oleh sintetase aminoasil-tRNA-nya.** Untuk tRNA ini (tRNAGln), nukleotida spesifik di antikodon (bawah) dan lengan penerima asam amino memungkinkan tRNA yang benar untuk dikenali oleh enzim sintetase (biru). Molekul ATP yang terikat berwarna kuning. (Atas perkenan Tom Steitz.)

## Asam Amino Ditambahkan ke Ujung Terminal-C dari Rantai Polipeptida Tumbuh

Setelah melihat bahwa asam amino pertama kali digabungkan ke molekul tRNA, kita sekarang beralih ke mekanisme yang menggabungkan asam amino bersama untuk membentuk protein. Reaksi mendasar dari sintesis protein adalah pembentukan ikatan peptida antara gugus karboksil pada akhir rantai polipeptida yang sedang tumbuh dan gugus amino bebas pada asam amino yang masuk. Akibatnya, protein disintesis secara bertahap dari ujung terminal N ke ujung terminal C. Sepanjang seluruh proses ujung karboksil yang tumbuh dari rantai polipeptida tetap diaktifkan oleh ikatan kovalennya dengan molekul tRNA (membentuk peptidil-tRNA). Setiap penambahan mengganggu hubungan kovalen berenergi tinggi ini, tetapi segera menggantinya dengan hubungan identik pada asam amino yang baru ditambahkan (Gambar 61). Dengan cara ini, setiap asam amino yang ditambahkan membawa energi aktivasi untuk penambahan asam amino berikutnya daripada energi untuk penambahannya sendiri sebuah contoh dari tipe

"pertumbuhan kepala" dari polimerisasi yang dijelaskan pada Gambar 2-68.



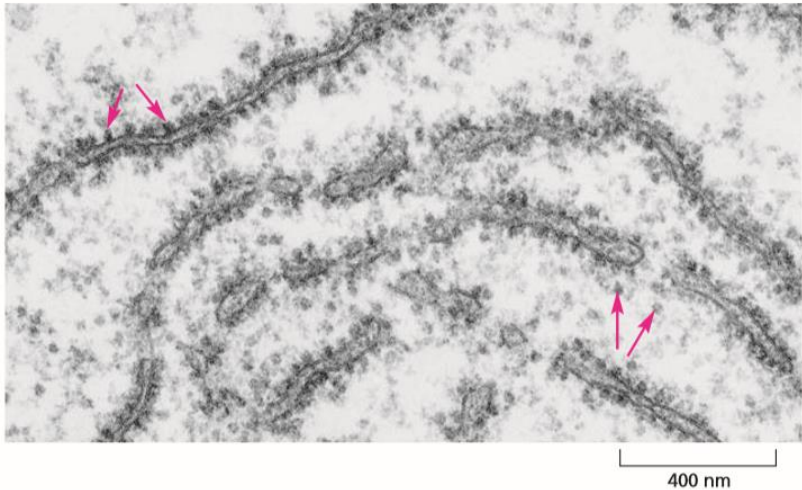
**Gambar 61 Penggabungan asam amino ke dalam protein.** Rantai polipeptida tumbuh dengan penambahan asam amino bertahap ke ujung terminal-C. Pembentukan setiap ikatan peptida sangat menguntungkan karena terminal-C yang sedang tumbuh telah diaktifkan oleh perlekatan kovalen dari molekul tRNA. Hubungan peptidil-tRNA yang mengaktifkan ujung tumbuh diregenerasi selama setiap penambahan. . Rantai samping asam amino telah disingkat sebagai R1, R2, R3, dan R4; sebagai titik referensi, semua atom dalam asam amino kedua dalam rantai polipeptida berwarna abu-abu. Gambar tersebut menunjukkan penambahan asam amino keempat (merah) ke rantai tumbuh.

## Pesan RNA diterjemahkan dalam Ribosom

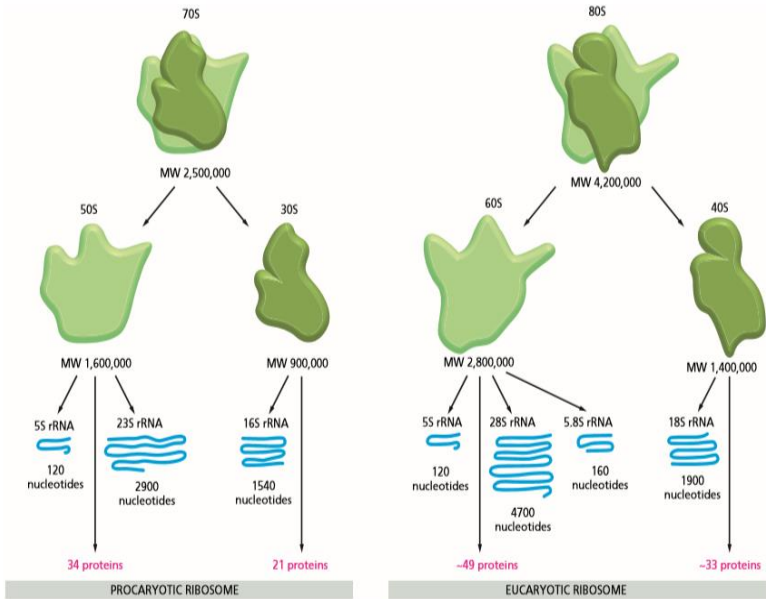
Sintesis protein dipandu oleh informasi yang dibawa oleh molekul mRNA. Untuk mempertahankan kerangka bacaan yang benar dan untuk memastikan keakuratan (sekitar 1 kesalahan setiap 10.000 asam amino), sintesis protein dilakukan dalam ribosom, mesin katalitik kompleks yang terbuat dari lebih dari 50 protein berbeda (protein ribosom) dan beberapa molekul RNA, yang RNA ribosom (rRNA). <CGCC> Sel eukariotik yang khas mengandung jutaan ribosom dalam sitoplasma (Gambar 62). Subunit ribosom eukariotik berkumpul di nukleolus, ketika rRNA yang baru ditranskripsi dan dimodifikasi berhubungan dengan protein ribosom, yang telah diangkut ke dalam nukleus setelah sintesisnya dalam sitoplasma. Dua subunit ribosom kemudian diekspor ke sitoplasma, di mana mereka bergabung bersama untuk mensintesis protein.

Ribosom eukariotik dan procaryotic memiliki desain dan fungsi yang serupa. Keduanya terdiri dari satu subunit besar dan satu kecil yang cocok bersama untuk membentuk ribosom lengkap dengan massa beberapa juta dalton (Gambar –63). Subunit kecil menyediakan kerangka kerja di

mana tRNA dapat akurat cocok dengan kodon mRNA (lihat Gambar 58), sedangkan subunit besar mengkatalisis pembentukan ikatan peptida yang menghubungkan asam amino bersama-sama menjadi rantai polipeptida (lihat Gambar 61).



**Gambar 62 Ramosom dalam sitoplasma sel eukariotik.** Mikrograf elektron ini menunjukkan bagian tipis dari daerah kecil sitoplasma. Ribosom muncul sebagai titik-titik hitam (panah merah). Beberapa bebas di sitosol; yang lain melekat pada membran retikulum endoplasma. (Atas perkenan Daniel S. Friend.)



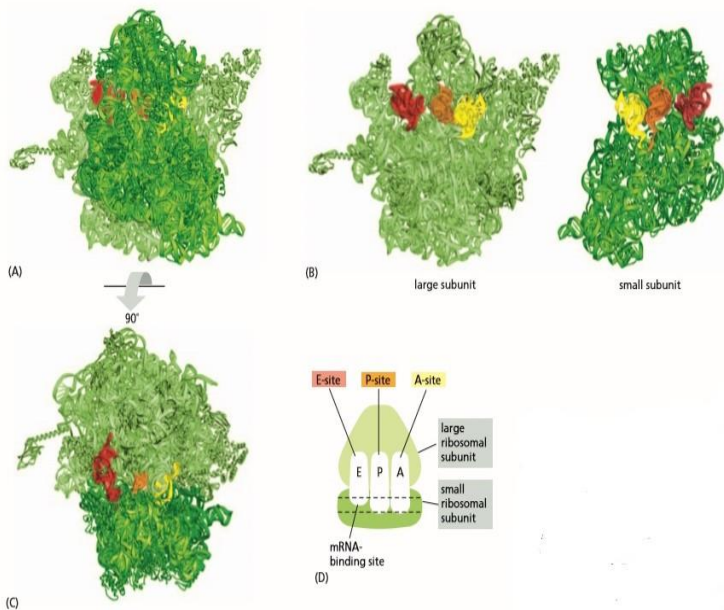
**Gambar 63A perbandingan ribosom procaryotic dan eukariotik.**

Meskipun terdapat perbedaan dalam jumlah dan ukuran komponen rRNA dan proteinnya, ribosom procaryotic dan eukariotik memiliki struktur yang hampir sama dan fungsinya sama. Meskipun rRNA 18S dan 28S dari ribosom eukariotik mengandung banyak nukleotida yang tidak ada dalam bakteri, nukleotida ini hadir sebagai beberapa insersi yang membentuk domain ekstra dan membuat struktur dasar masing-masing rRNA sebagian besar tidak berubah.

Ketika tidak secara aktif mensintesis protein, dua subunit dari ribosom terpisah. Mereka bergabung bersama pada molekul mRNA, biasanya mendekati ujung 5', untuk



memulai sintesis protein. mRNA kemudian ditarik melalui ribosom; ketika kodonnya memasuki inti ribosom, urutan nukleotida mRNA diterjemahkan menjadi sekuens asam amino menggunakan tRNA sebagai adaptor untuk menambahkan masing-masing asam amino dalam urutan yang benar ke ujung rantai polipeptida yang sedang tumbuh. Ketika berhenti kodon ditemukan, ribosom melepaskan protein jadi, dan dua subunitnya terpisah lagi. Subunit-subunit ini kemudian dapat digunakan untuk memulai sintesis protein lain pada molekul mRNA lain.



**Gambar 64 Situs pengikatan RNA di ribosom.** Setiap ribosom memiliki satu situs pengikatan untuk mRNA dan tiga situs pengikatan untuk tRNA: situs A-, P-, dan E (kependekan dari aminoasil-tRNA, peptidyl-tRNA, dan masing-masing keluar). (A) Ribosom bakteri dilihat dengan subunit kecil di depan (hijau gelap) dan subunit besar di belakang (hijau terang). Baik rRNA dan protein ribosom ditampilkan. tRNA ditampilkan terikat di situs-E (merah), situs-P (oranye) dan situs-A (kuning). Meskipun ketiga situs tRNA ditunjukkan ditempati di sini, selama proses sintesis protein tidak lebih dari dua situs ini dianggap mengandung molekul tRNA pada satu waktu (lihat Gambar 66). (B) Subunit ribosom besar dan kecil disusun seolah-olah ribosom dalam (A) dibuka seperti buku. (C) Ribosom dalam (A) diputar hingga 90° dan dilihat dengan subunit besar di atas dan subunit kecil di bagian bawah. (D) Representasi skematis dari ribosom (dalam orientasi yang sama dengan C), yang akan digunakan dalam gambar berikutnya. (A, B, dan C, diadaptasi dari M.M. Yusupov et al., *Sains* 292: 883-896, 2001. Dengan izin dari AAAS; milik Albion Baucom dan Harry Noller.)



**Gambar 65 Jalur mRNA (biru) melalui subunit ribosom kecil.** Orientasinya sama dengan yang ada di panel kanan Gambar 64B. (Atas perkenan Harry F. Noller, berdasarkan data dalam G.Z. Yusopova et al., *Sel* 106: 233–241, 2001. Dengan izin dari Elsevier.)

Ribosom beroperasi dengan efisiensi luar biasa: dalam satu detik, satu ribosom sel eukariotik menambahkan sekitar 2 asam amino ke rantai polipeptida; ribosom sel bakteri bekerja lebih cepat, dengan laju sekitar 20 asam amino per detik. Bagaimana koreografi ribosom yang banyak gerakan terkoordinasi diperlukan untuk terjemahan efisien? Ribosom mengandung empat situs pengikatan untuk molekul RNA: satu untuk mRNA dan tiga (disebut situs-A, situs-P, dan situs-E) adalah untuk tRNA (Gambar 64). Molekul tRNA dipegang erat di situs A- dan P hanya jika antikodonya membentuk pasangan basa dengan kodon komplementer (memungkinkan goyangan) pada molekul mRNA yang dijalin melalui ribosom (Gambar 65). Situs A- dan P-cukup berdekatan untuk dua molekul tRNA mereka dipaksa untuk membentuk pasangan basa dengan kodon yang berdekatan pada molekul mRNA. Fitur ribosom ini mempertahankan bingkai pembacaan yang benar pada mRNA. Setelah sintesis protein telah dimulai, setiap asam amino baru ditambahkan ke rantai memanjang dalam siklus reaksi yang mengandung empat langkah utama: pengikatan tRNA, pembentukan ikatan peptida, translokasi subunit besar dan subunit kecil. Sebagai hasil dari dua langkah translokasi, seluruh ribosom

menggerakkan tiga nukleotida di sepanjang mRNA dan diposisikan untuk memulai siklus berikutnya. (Gambar 66). Deskripsi kami tentang proses pemanjangan rantai dimulai pada titik di mana beberapa asam amino telah dihubungkan bersama dan ada molekul tRNA di situs-P pada ribosom, yang secara kovalen bergabung dengan ujung polipeptida yang tumbuh. Pada langkah 1, tRNA yang membawa asam amino berikutnya dalam rantai berikatan dengan situs A ribosom dengan membentuk pasangan basa dengan kodon mRNA yang diposisikan di sana, sehingga situs P dan situs A mengandung tRNA terikat yang berdekatan. Pada langkah 2, ujung karboksil dari rantai polipeptida dilepaskan dari tRNA di situs-P (dengan memecah ikatan energi tinggi antara tRNA dan asam amino-nya) dan bergabung dengan kelompok amino bebas dari asam amino yang terhubung ke tRNA di situs-A, membentuk ikatan peptida baru. Reaksi sentral sintesis protein ini dikatalisis oleh transferase peptidil yang terkandung dalam subunit ribosom besar. Pada langkah 3, subunit besar bergerak relatif terhadap mRNA yang dipegang oleh subunit kecil, sehingga menggeser batang akseptor dari dua tRNA ke E- dan Psites dari subunit besar. Pada langkah 4, serangkaian perubahan konformasi lainnya

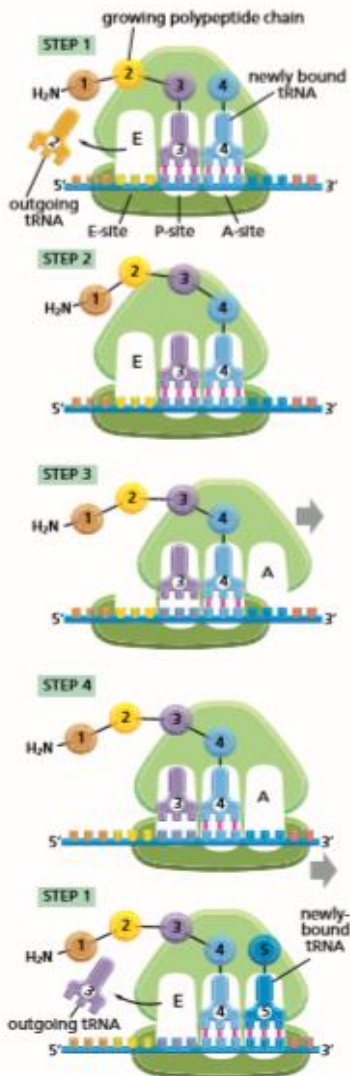
menggerakkan subunit kecil dan mRNA terikatnya tepat tiga nukleotida, mengatur ulang ribosom sehingga siap menerima aminoacyl-tRNA berikutnya. Langkah 1 kemudian diulangi dengan aminoacyl-tRNA masuk baru, dan seterusnya. <CGTT>.

Siklus empat langkah ini diulang setiap kali asam amino ditambahkan ke rantai polipeptida, ketika rantai tumbuh dari amino ke ujung karboksilnya.

### **Faktor Perpanjangan Mendorong Terjemahan Ke Depan dan Meningkatkan Akurasinya**

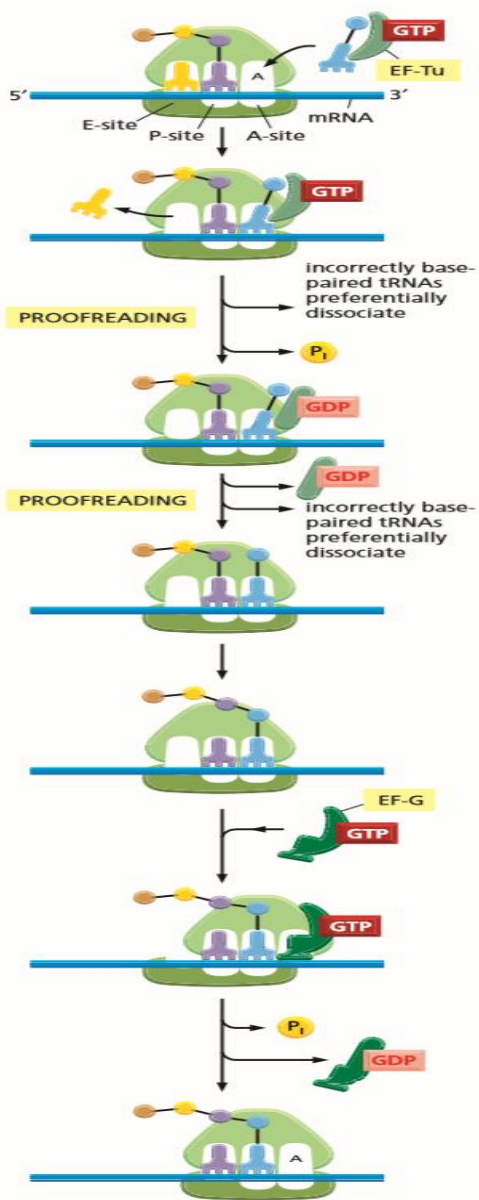
Siklus dasar perpanjangan polipeptida yang ditunjukkan dalam garis besar pada Gambar 66 memiliki fitur tambahan yang membuat terjemahan menjadi sangat efisien dan akurat. Dua faktor perpanjangan memasuki dan meninggalkan ribosom selama setiap siklus, masing-masing menghidrolisisasi GTP ke PDB dan mengalami perubahan konformasi dalam proses. Faktor-faktor ini disebut EF-Tu dan EF-G pada bakteri, dan EF1 dan EF2 pada eucaryotes. Dalam beberapa kondisi in vitro, ribosom dapat dipaksa untuk mensintesis protein tanpa bantuan faktor

perpanjangan ini dan hidrolisis GTP, tetapi sintesis ini sangat lambat, tidak efisien, dan tidak akurat. Menggabungkan perubahan-perubahan yang didorong oleh hidrolisis GTP dalam faktor pemanjangan untuk transisi antara berbagai kondisi ribosom mempercepat sintesis protein secara luar biasa. Meskipun keadaan ribosom ini belum dipahami secara rinci, mereka hampir pasti melibatkan penataan ulang struktur RNA di inti ribosom. Siklus asosiasi faktor perpanjangan, hidrolisis GTP, dan disosiasi memastikan bahwa semua perubahan tersebut terjadi dalam arah "maju" sehingga terjemahan dapat dilanjutkan secara efisien (Gambar 67).



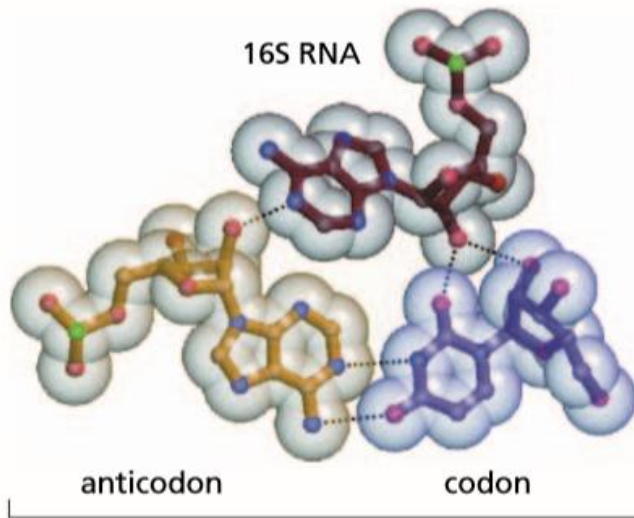
**Gambar 66 Menerjemahkan molekul mRNA.** Setiap asam amino ditambahkan ke ujung tumbuh rantai polipeptida dipilih oleh pasangan basa pelengkap antara antikodon pada molekul tRNA yang melekat dan kodon berikutnya pada rantai mRNA. Karena hanya satu dari banyak jenis molekul tRNA dalam sel yang dapat berpasangan dengan setiap kodon, kodon menentukan asam amino spesifik yang akan ditambahkan ke rantai polipeptida yang sedang tumbuh. . Siklus empat langkah yang ditunjukkan berulang-ulang selama sintesis protein. Pada langkah 1, molekul aminoasil-tRNA berikatan dengan situs-A yang kosong pada ribosom dan molekul tRNA yang dihabiskan berdisosiasi dari situs-E. Pada langkah 2, ikatan peptida baru terbentuk. Pada langkah 3, subunit besar mentranslokasi relatif terhadap subunit kecil, meninggalkan dua tRNA di situs hibrida: P pada subunit besar dan A pada yang kecil, untuk satu; E pada subunit besar dan P pada yang kecil, untuk yang lainnya. Pada langkah 4, subunit kecil mentranslokasi membawa mRNA-nya sejauh tiga nukleotida melalui ribosom. Ini "me-reset" ribosom dengan situs-A sepenuhnya kosong, siap untuk molekul aminoacyl-tRNA berikutnya untuk mengikat. Seperti ditunjukkan, mRNA diterjemahkan dalam arah 5' ke-3', dan ujung N-terminal protein dibuat terlebih dahulu, dengan setiap siklus menambahkan satu asam amino ke terminal-C dari rantai polipeptida.





Seperti yang ditunjukkan sebelumnya, EF-Tu secara bersamaan mengikat GTP dan aminoasil-tRNA (lihat Gambar 3–74). Selain membantu memajukan terjemahan, EF-Tu (EF1 dalam eucaryotes) meningkatkan akurasi terjemahan dalam beberapa cara. Pertama, saat mengawal masuknya aminoacyl-tRNA ke ribosom, EF-Tu memeriksa apakah kecocokan tRNA-asam amino sudah benar. Bagaimana tepatnya hal ini dicapai tidak dipahami dengan baik. Menurut satu ide, kecocokan tRNA-asam amino yang benar memiliki afinitas yang didefinisikan secara sempit untuk EF-Tu, yang memungkinkan EF-Tu untuk membedakan, meskipun secara kasar, di antara banyak kombinasi asam amino-tRNA yang berbeda, secara selektif membawa yang benar dengan itu ke dalam ribosom. Kedua, EF-Tu memonitor interaksi awal antara antikodon dari aminoasil-tRNA yang masuk dan kodon mRNA di lokasi-A. Aminoacyl-tRNA adalah "bengkok" ketika terikat dengan bentuk GTP dari EF-Tu; konformasi yang bengkok ini memungkinkan pasangan kodon tetapi mencegah penggabungan asam amino ke dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh. Namun, jika kecocokan kodon-antikodon benar, ribosom dengan cepat memicu hidrolisis molekul

GTP, di mana EF-Tu melepaskan cengkeramannya pada tRNA dan terlepas dari ribosom, memungkinkan tRNA menyumbangkan asam amino untuk sintesis protein. Tetapi bagaimana "kebenaran" dari pertandingan kodon-antikodon dinilai? Prestasi ini dilakukan oleh ribosom itu sendiri melalui mekanisme berbasis RNA. rRNA dalam subunit kecil ribosom membentuk serangkaian ikatan hidrogen dengan pasangan kodon-antikodon yang memungkinkan penentuan kebenarannya (Gambar 68). Pada intinya, rRNA terlipat di sekitar pasangan kodon-antikodon, dan penutupan akhirnya yang terjadi hanya ketika antikodon yang benar ada memicu hidrolisis GTP. Hebatnya, mekanisme kecocokan yang diinduksi ini dapat membedakan interaksi kodon-antikodon yang salah meskipun ada aturan untuk pemasangan pasangan goyangan yang dirangkum dalam Gambar 53. Dari contoh ini, seperti untuk penyambungan RNA, seseorang dapat merasakan bentuk-bentuk pengakuan molekuler yang sangat canggih yang hanya dapat dicapai oleh RNA.



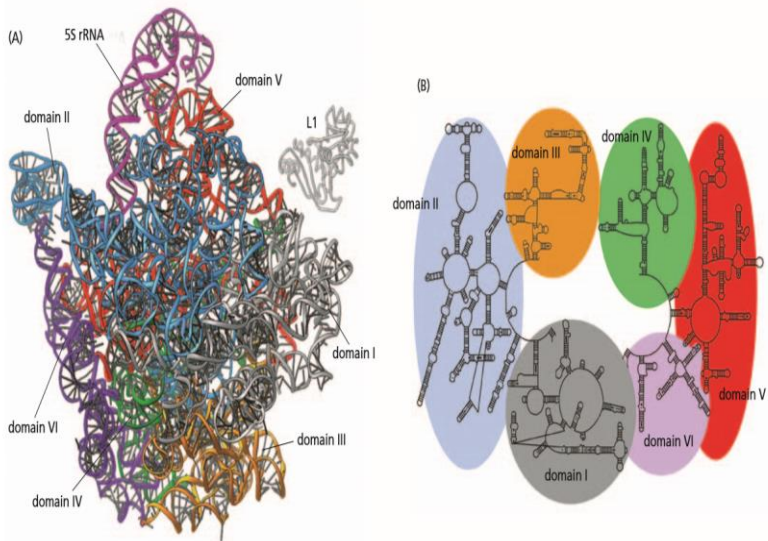
**Gambar 68 Pengakuan cocok kodon-antikodon yang benar oleh rRNA subunit kecil dari ribosom.** Yang ditunjukkan adalah interaksi antara nukleotida dari rRNA subunit kecil dan pasangan nukleotida pertama dari kodon-antikodon yang dipasangkan dengan benar; interaksi serupa terjadi antara nukleotida lain dari rRNA dan posisi kedua dan ketiga dari pasangan kodon-antikodon. RRNA smallsubunit dapat membentuk jaringan ikatan hidrogen ini hanya dengan pasangan kodon-antikodon yang cocok dengan benar. Seperti dijelaskan dalam teks, pemantauan kodon-antikodon oleh rRNA smallsubunit ini meningkatkan akurasi sintesis protein. (Dari J.M. Ogle et al., Science 292: 897–902, 2001. Dengan izin dari AAAS.)

Interaksi EF-Tu, tRNA, dan ribosom yang baru saja dijelaskan memperkenalkan langkah-langkah proofreading

kritis ke dalam sintesis protein pada tahap seleksi tRNA awal. Tetapi setelah GTP dihidrolisis dan EF-Tu terlepas dari ribosom, ada peluang tambahan untuk ribosom untuk mencegah asam amino yang tidak ditambahkan ke rantai tumbuh. Setelah hidrolisis GTP, ada penundaan waktu singkat karena asam amino yang dibawa oleh tRNA bergerak ke posisi pada ribosom. Waktu tunda ini lebih pendek untuk pasangan kodon – antikodon yang salah. Selain itu, tRNA yang dicocokkan secara salah terdisosiasi lebih cepat daripada yang terikat dengan benar karena interaksinya dengan kodon lebih lemah. Dengan demikian, sebagian besar molekul tRNA yang terikat secara tidak benar (serta sejumlah besar molekul yang terikat dengan benar) akan meninggalkan ribosom tanpa digunakan untuk sintesis protein. Semua langkah-langkah proofreading ini, diambil bersama-sama, sebagian besar bertanggung jawab untuk akurasi 99,99% dari ribosom dalam menerjemahkan RNA menjadi protein.

## Ribosome adalah Ribozyme

Ribosom adalah kompleks besar yang terdiri dari dua pertiga RNA dan sepertiga protein. Penentuan, pada tahun 2000, dari keseluruhan konformasi tiga dimensi dari subunit besar dan kecilnya adalah kemenangan utama biologi struktural modern. Temuan ini mengkonfirmasi bukti sebelumnya bahwa rRNA — dan bukan protein — yang bertanggung jawab atas keseluruhan struktur ribosom, kemampuannya untuk memposisikan tRNA pada mRNA, dan aktivitas katalitiknya dalam membentuk ikatan peptida kovalen. RNA ribosom dilipat menjadi struktur tiga dimensi yang sangat kompak, tepat yang membentuk inti kompak dari ribosom dan menentukan bentuk keseluruhannya (Gambar 69).

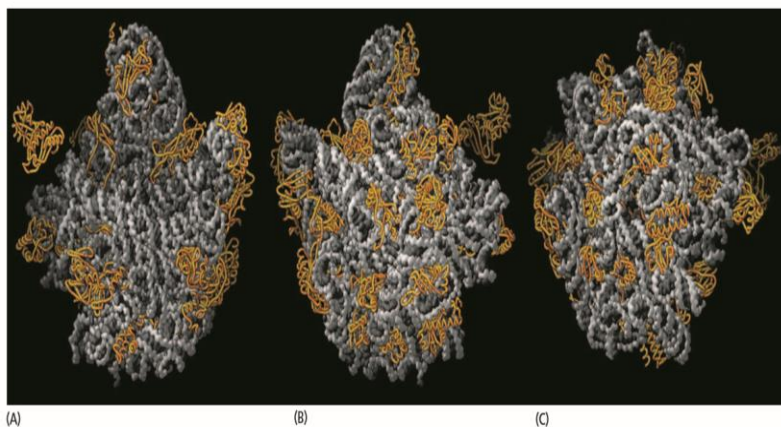


**Gambar 69 Struktur rRNA dalam subunit besar ribosom bakteri, sebagaimana ditentukan oleh kristalografi x-ray.** (A) Konformasi tiga dimensi dari rRNA subunit besar (5S dan 23S) seperti yang muncul dalam ribosom. Salah satu subunit protein dari ribosom (L1) juga ditunjukkan sebagai titik referensi, karena membentuk tonjolan khas pada ribosom. (B) Diagram skematis dari struktur sekunder rRNA 23S, menunjukkan jaringan basepairing yang luas. Struktur ini telah dibagi menjadi enam "domain" yang warnanya sesuai dengan yang ada di (A). Diagram struktur sekunder sangat terencana untuk mewakili sebanyak mungkin struktur dalam dua dimensi. Untuk melakukan ini, beberapa diskontinuitas dalam rantai RNA telah diperkenalkan, meskipun pada kenyataannya RNA 23S adalah molekul RNA tunggal. Misalnya, pangkalan Domain III kontinu dengan pangkalan Domain IV meskipun ada celah di diagram. (Diadaptasi dari N. Ban et al., *Sains* 289: 905-920, 2000. Dengan izin dari AAAS.)

Berbeda sekali dengan posisi sentral rRNA, protein ribosom umumnya terletak di permukaan dan mengisi celah dan celah RNA yang terlipat (Gambar 70). Beberapa protein ini mengirimkan daerah panjang rantai polipeptida yang menembus jarak pendek ke dalam lubang di inti RNA (Gambar 71). Peran utama protein ribosom tampaknya untuk menstabilkan inti RNA, sementara memungkinkan perubahan konformasi rRNA yang diperlukan untuk RNA ini untuk mengkatalisis sintesis protein yang efisien. Protein mungkin juga membantu dalam perakitan awal rRNA yang membentuk inti dari ribosom. Tidak hanya situs A-, P-, dan E-binding untuk tRNA dibentuk terutama oleh RNA ribosom, tetapi situs katalitik untuk pembentukan ikatan peptida juga dibentuk oleh RNA, karena asam amino terdekat terletak lebih dari 1,8 nm jauhnya. Penemuan ini mengejutkan para ahli biologi karena, tidak seperti protein, RNA tidak mengandung gugus fungsi yang mudah terionisasi yang dapat digunakan untuk mengkatalisis reaksi canggih seperti pembentukan ikatan peptida. Selain itu, ion logam, yang sering digunakan oleh molekul RNA untuk mengkatalisis reaksi kimia (seperti yang dibahas kemudian dalam bab ini), tidak diamati di situs aktif ribosom. Alih-

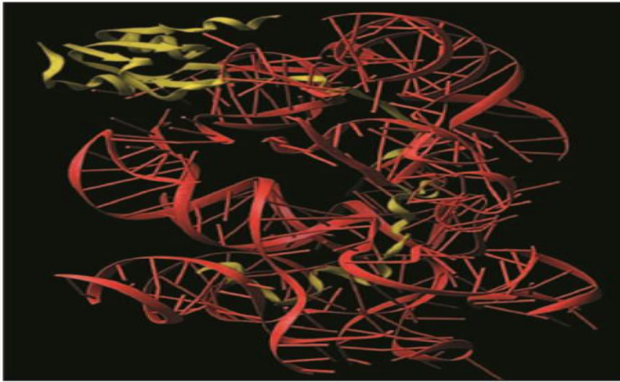


alih, diyakini bahwa 23S rRNA membentuk kantung yang sangat terstruktur yang, melalui jaringan ikatan hidrogen, secara tepat mengarahkan kedua reaktan (rantai peptida yang sedang tumbuh dan aminoacyl-tRNA) dan dengan demikian sangat mempercepat kovalen mereka bergabung. Selain itu, tRNA di situs P berkontribusi ke situs aktif, mungkin memasok gugus OH fungsional yang berpartisipasi langsung dalam katalisis. Mekanisme ini dapat memastikan bahwa katalisis hanya terjadi ketika tRNA diposisikan dengan benar dalam ribosom.



**Gambar 70 Lokasi komponen protein bakteri subunit ribosom besar.** RRNA (5S dan 23S) ditampilkan dalam warna abu-abu dan protein subunit besar (27 dari total 31) dalam emas. Untuk kenyamanan, struktur protein hanya menggambarkan tulang punggung polipeptida. (A) Antarmuka dengan subunit kecil, tampilan yang sama ditunjukkan pada

Gambar 64B. (B) Sisi yang berlawanan dengan yang ditunjukkan pada (A), diperoleh dengan memutar (A) sebesar  $180^\circ$  di sekitar sumbu vertikal. (C) Selanjutnya sedikit rotasi (B) melalui sumbu diagonal, memungkinkan pandangan ke saluran keluar peptida di tengah struktur. (Dari N. Ban et al., *Sains* 289: 905-920, 2000. Dengan izin dari AAAS.)



**Gambar 71 Struktur protein L15 dalam subunit besar ribosom bakteri.** Domain globular protein terletak pada permukaan ribosom dan daerah yang luas menembus jauh ke dalam inti RNA ribosom. Protein L15 ditunjukkan dengan warna kuning dan sebagian dari inti RNA ribosom ditampilkan dalam warna merah. (Dari D. Klein, P.B. Moore dan T. Steitz, *J. Mol. Biol.* 340: 141–147, 2004. Dengan izin dari Academic Press.)

Molekul RNA yang memiliki aktivitas katalitik dikenal sebagai ribozim. Kita telah melihat sebelumnya dalam bab ini bagaimana ribozim lain berfungsi dalam reaksi

penyambungan sendiri (misalnya, lihat Gambar 36). Pada bagian akhir bab ini, kami mempertimbangkan apa kemampuan molekul RNA berfungsi sebagai katalis untuk berbagai macam reaksi yang berbeda mungkin berarti bagi evolusi awal sel hidup. Untuk saat ini, kami hanya mencatat bahwa ada alasan bagus untuk mencurigai bahwa RNA daripada molekul protein berfungsi sebagai katalis pertama untuk sel hidup. Jika demikian, ribosom, dengan inti RNA-nya, mungkin merupakan peninggalan masa lalu dalam sejarah kehidupan ketika sintesis protein berevolusi dalam sel yang dijalankan hampir seluruhnya oleh ribozim.

### **Urutan Nukleotida dalam Sinyal mRNA Di mana Mulai Sintesis Protein**

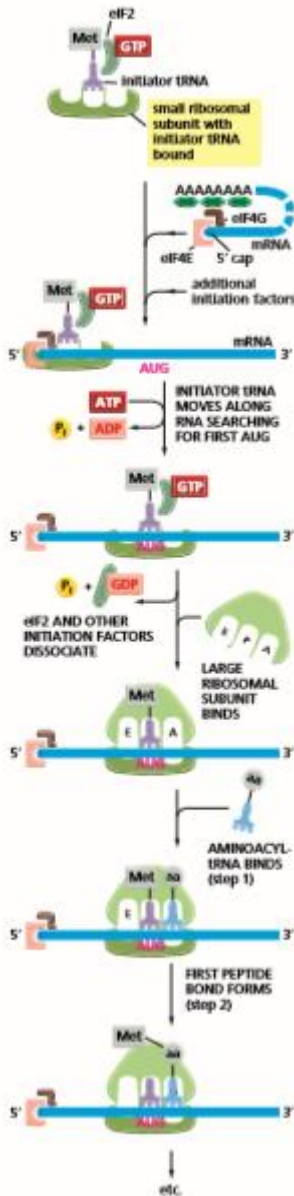
Inisiasi dan penghentian fitur berbagi terjemahan dari siklus perpanjangan terjemahan yang dijelaskan di atas. Situs di mana sintesis protein dimulai pada mRNA sangat penting, karena ia menetapkan kerangka pembacaan untuk seluruh panjang pesan. Kesalahan salah satu nukleotida pada tahap ini akan menyebabkan setiap kodon berikutnya dalam pesan salah dibaca, menghasilkan protein

nonfungsional dengan urutan asam amino yang kacau. Langkah inisiasi juga penting karena bagi sebagian besar gen itu adalah titik terakhir di mana sel dapat memutuskan apakah mRNA harus diterjemahkan dan protein disintesis; tingkat inisiasi dengan demikian merupakan salah satu penentu dari tingkat di mana setiap protein disintesis. Kita akan melihat di Bab 7 bahwa sel menggunakan beberapa mekanisme untuk mengatur inisiasi terjemahan.

Terjemahan mRNA dimulai dengan kodon AUG, dan tRNA khusus diperlukan untuk memulai terjemahan. Inisiator ini tRNA selalu membawa asam amino metionin (pada bakteri, bentuk metionin yang dimodifikasi — formylmethionine — digunakan), dengan hasil bahwa semua protein yang baru dibuat memiliki metionin sebagai asam amino pertama pada N-terminus mereka, akhir protein yang disintesis terlebih dahulu. Metionin ini biasanya dihilangkan kemudian dengan protease spesifik. Inisiator tRNA dapat dikenali secara khusus oleh faktor inisiasi karena memiliki urutan nukleotida yang berbeda dari tRNA yang biasanya membawa metionin.

Dalam eucaryotes, inisiator tRNA-methionine complex (Met-tRNA<sub>i</sub>) pertama kali dimuat ke dalam subunit ribosom kecil bersama dengan protein tambahan yang disebut faktor inisiasi eukariotik, atau eIFs (Gambar 72). Dari semua aminoasil-tRNA di dalam sel, hanya inisiator bermuatan metionin tRNA yang mampu mengikat subunit ribosom kecil dengan erat tanpa ada ribosom lengkap dan mengikat langsung ke situs-P. Selanjutnya, subunit ribosom kecil berikatan dengan ujung 5' molekul mRNA, yang dikenali berdasarkan tutup 5' dan dua faktor inisiasi terikatnya, eIF4E (yang secara langsung mengikat tutup) dan eIF4G (lihat Gambar 40 ). Subunit ribosom kecil kemudian bergerak maju (5' hingga 3') di sepanjang mRNA, mencari AUG pertama. Faktor inisiasi tambahan yang bertindak sebagai helikopter yang didukung ATP memfasilitasi pergerakan ribosom melalui struktur sekunder RNA. Dalam 90% mRNA, terjemahan dimulai pada AUG pertama yang ditemui oleh subunit kecil. Pada titik ini, faktor inisiasi terdisosiasi, memungkinkan subunit ribosom besar untuk berkumpul dengan kompleks dan menyelesaikan ribosom. Inisiator tRNA masih terikat ke situs-P, meninggalkan Asite

kosong. Sintesis protein karenanya siap untuk dimulai (lihat Gambar 72).



**Gambar 72 Inisiasi sintesis protein pada eucaryotes.** Hanya tiga dari banyak faktor inisiasi terjemahan yang diperlukan untuk proses ini ditampilkan. Inisiasi terjemahan yang efisien juga membutuhkan ekor poli-A dari mRNA yang diikat oleh protein pengikat poli-A yang, pada gilirannya, berinteraksi dengan eIF4G. Dengan cara ini, alat terjemahan memastikan bahwa kedua ujung mRNA masih utuh sebelum memulai sintesis protein (lihat Gambar 40). Meskipun hanya satu peristiwa hidrolisis GTP ditunjukkan pada gambar, yang kedua diketahui terjadi tepat sebelum subunit ribosom besar dan kecil bergabung.

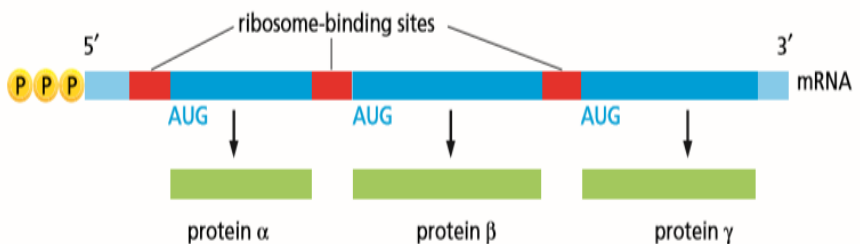
Nukleotida yang mengelilingi lokasi awal dalam mRNA eukariotik mempengaruhi efisiensi pengenalan AUG selama proses pemindaian di atas. Jika situs pengenalan ini berbeda secara substansial dari urutan pengakuan konsensus (5' -ACCAUGG-3'), pemindaian subunit ribosom terkadang akan mengabaikan kodon AUG pertama dalam mRNA dan sebagai gantinya beralih ke kodon AUG kedua atau ketiga. Sel sering menggunakan fenomena ini, yang dikenal sebagai "pemindaian bocor," untuk menghasilkan dua atau lebih protein, berbeda dalam N-termini mereka, dari molekul mRNA yang sama. Ini memungkinkan beberapa gen untuk menghasilkan protein yang sama dengan dan tanpa urutan sinyal yang terpasang pada N-terminusnya, misalnya, sehingga protein diarahkan ke dua kompartemen berbeda di dalam sel.

Mekanisme untuk memilih kodon awal pada bakteri berbeda. Bakteri mRNA tidak memiliki tutup 5' untuk memberi sinyal ribosom tempat untuk mulai mencari awal terjemahan. Sebaliknya, setiap mRNA bakteri mengandung situs ribosomebinding spesifik (disebut urutan Shine-Dalgarno, dinamai menurut penemunya) yang terletak



beberapa nukleotida di hulu AUG di mana terjemahan akan dimulai. Urutan nukleotida ini, dengan konsensus 5' - AGGAGGU-3', membentuk pasangan basa dengan 16S rRNA dari subunit ribosom kecil untuk memposisikan kodon AUG awal dalam ribosom. Seperangkat faktor inisiasi terjemahan mengatur interaksi ini, serta perakitan subunit ribosom besar berikutnya untuk melengkapi ribosom.

Tidak seperti ribosom eukariotik, ribosom bakteri dapat dengan mudah berkumpul langsung pada kodon awal yang terletak di bagian dalam molekul mRNA, selama situs pengikatan ribosom mendahului oleh beberapa nukleotida. Akibatnya, mRNA bakteri sering bersifat polisistronik yaitu, mereka mengkode beberapa protein berbeda, yang masing-masing diterjemahkan dari molekul mRNA yang sama (Gambar 73). Sebaliknya, mRNA eukariotik umumnya hanya mengkode protein tunggal.

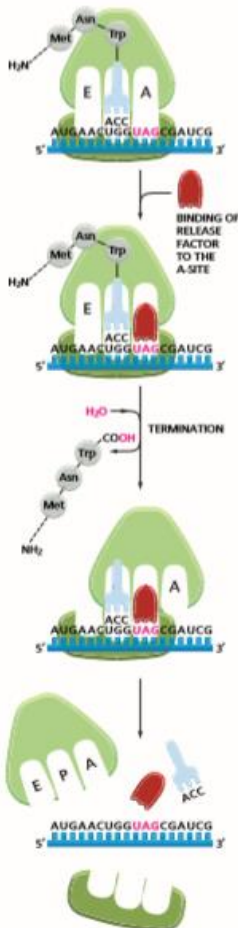


**Gambar 73 Struktur molekul mRNA bakteri khas.** Tidak seperti ribosom eukariotik, yang biasanya membutuhkan ujung 5' capped, ribosom procaryotic memulai transkripsi di situs pengikatan ribosom (urutan Shine-Dalgarno), yang dapat ditemukan di mana saja di sepanjang molekul mRNA. Sifat ribosom ini memungkinkan bakteri untuk mensintesis lebih dari satu jenis protein dari molekul mRNA tunggal.

### Stop Codons Tanda Akhir Terjemahan

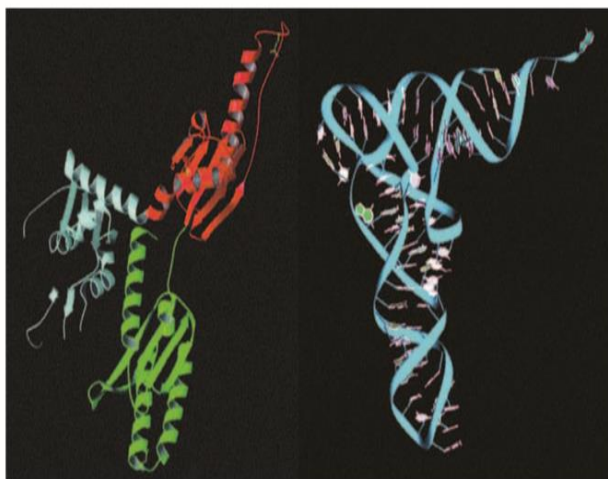
Akhir dari pesan pengkodean protein ditandai oleh kehadiran satu dari tiga kodon stop (UAA, UAG, atau UGA) (lihat Gambar 50). Ini tidak dikenali oleh tRNA dan tidak menentukan asam amino, melainkan sinyal ke ribosom untuk menghentikan terjemahan. Protein yang dikenal sebagai faktor pelepas mengikat ribosom dengan kodon stop yang diposisikan di situs A, memaksa peptidil transferase dalam ribosom untuk mengkatalisasi penambahan molekul air alih-alih asam amino ke peptidyl-tRNA (Gambar 74). Reaksi ini membebaskan ujung karboksil dari rantai polipeptida yang tumbuh dari perlekatannya pada molekul tRNA, dan karena hanya perlekatan ini yang biasanya menahan polipeptida yang tumbuh pada ribosom, rantai protein yang lengkap segera dilepaskan ke dalam sitoplasma. Ribosom kemudian melepaskan mRNA dan berpisah

menjadi subunit besar dan kecil, yang dapat berkumpul pada molekul mRNA ini atau yang lain untuk memulai putaran baru sintesis protein.



**Gambar 74 Fase akhir sintesis protein.** Pengikatan faktor rilis ke situs-A yang mengandung kodon berhenti menghentikan terjemahan. Polipeptida lengkap dilepaskan dan, dalam serangkaian reaksi yang membutuhkan protein tambahan dan hidrolisis GTP (tidak ditunjukkan), ribosom berdisosiasi menjadi dua subunit yang

Faktor rilis adalah contoh dari mimikri molekuler, di mana satu jenis makromolekul menyerupai bentuk molekul yang tidak berhubungan secara kimiawi. Dalam hal ini, struktur tiga dimensi faktor pelepasan (seluruhnya terbuat dari protein) menyerupai bentuk dan distribusi muatan molekul tRNA (Gambar 75). Bentuk dan mimikri muatan ini membantu mereka memasuki situs-A pada ribosom dan menyebabkan penghentian terjemahan.

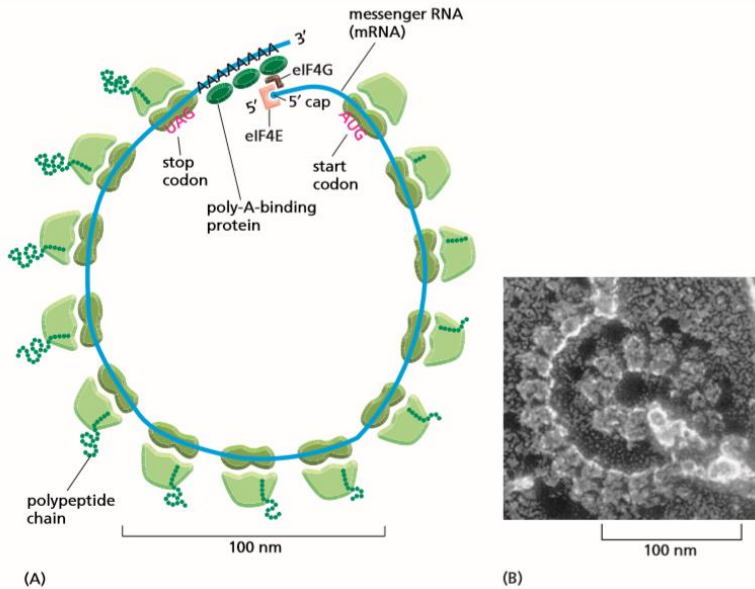


**Gambar 75 Struktur faktor pelepasan terjemahan manusia (eRF1) dan kemiripannya dengan molekul tRNA.** Protein ada di sebelah kiri dan tRNA di sebelah kanan. (Dari H. Song et al., *Cell* 100: 311-321, 2000. Dengan izin dari Elsevier.)

Selama penerjemahan, polipeptida yang baru lahir bergerak melalui terowongan besar berisi air (sekitar 10 nm x 1,5 nm) di subunit besar ribosom (lihat Gambar 70C). Dinding terowongan ini, terutama terbuat dari 23S rRNA, adalah tambalan permukaan hidrofobik kecil yang tertanam di permukaan hidrofilik yang lebih luas. Struktur ini tidak melengkapi peptida apa pun, dan karenanya memberikan lapisan "Teflon" di mana rantai polipeptida dapat dengan mudah meluncur. Dimensi terowongan menunjukkan bahwa protein yang baru lahir sebagian besar tidak terstruktur ketika mereka melewati ribosom, meskipun beberapa daerah heliks protein dapat terbentuk sebelum meninggalkan terowongan ribosom. Saat daun ribosom, protein yang baru disintesis harus dilipat menjadi konformasi tiga dimensi yang tepat untuk berguna bagi sel, dan kemudian dalam bab ini kita membahas bagaimana lipatan ini terjadi. Namun, pertama-tama, kami menggambarkan beberapa aspek tambahan dari proses penerjemahan itu sendiri.

## Protein Dibuat dari Polyribosomes

Sintesis sebagian besar molekul protein membutuhkan waktu antara 20 detik dan beberapa menit. Namun, selama periode yang sangat singkat ini, biasanya inisiasi berganda terjadi pada setiap molekul mRNA yang sedang diterjemahkan. Segera setelah ribosom sebelumnya telah menerjemahkan cukup dari urutan nukleotida untuk bergerak keluar, ujung 5' mRNA dijalin menjadi ribosom baru. Karenanya, molekul mRNA yang diterjemahkan biasanya ditemukan dalam bentuk polyribosom (atau polisom): rakitan sitoplasma besar yang terdiri dari beberapa ribosom yang berjarak hampir 80 nukleotida yang terpisah sepanjang molekul mRNA tunggal (**Gambar 76**). Inisiasi berganda ini memungkinkan sel untuk membuat lebih banyak molekul protein dalam waktu tertentu daripada yang mungkin jika masing-masing harus diselesaikan sebelum berikutnya dapat dimulai. <GAAG>



**Gambar 76A polyribosome.** (A) Gambar skematik yang menunjukkan bagaimana serangkaian ribosom dapat secara bersamaan menerjemahkan molekul mRNA eukariotik yang sama. (B) Mikrograf elektron dari polyribosome dari sel eukariotik. (B, milik John Heuser.)

Bakteri dan eukariota menggunakan polisom, dan keduanya menggunakan strategi tambahan untuk mempercepat laju keseluruhan sintesis protein lebih jauh. Karena mRNA bakteri tidak perlu diproses dan dapat diakses oleh ribosom saat sedang dibuat, ribosom dapat menempel pada ujung bebas molekul mRNA bakteri dan mulai menerjemahkannya bahkan sebelum transkripsi RNA

selesai, mengikuti persis di belakang RNA polimerase saat bergerak di sepanjang DNA. Dalam eucaryotes, seperti yang telah kita lihat, ujung 5' dan 3' dari mRNA berinteraksi (lihat Gambar 40 dan 6-76A); oleh karena itu, segera setelah ribosom terdisosiasi, kedua subunitnya berada dalam posisi optimal untuk memulai kembali terjemahan pada molekul mRNA yang sama.

### **Ada Variasi Kecil dalam Kode Genetika Standar**

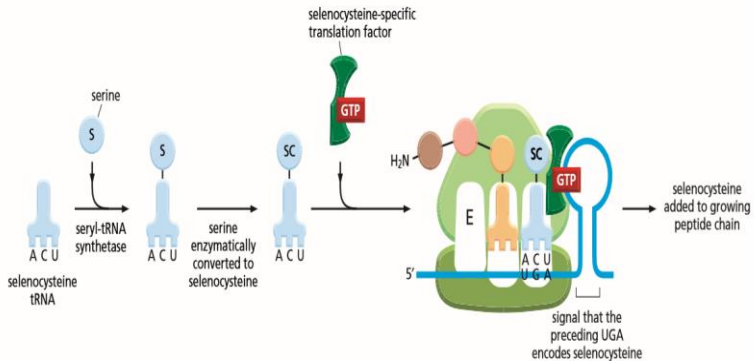
Seperti dibahas dalam Bab 1, kode genetik (ditunjukkan pada Gambar 50) berlaku untuk ketiga cabang utama kehidupan, memberikan bukti penting bagi leluhur bersama semua kehidupan di Bumi. Meskipun jarang, ada pengecualian untuk kode ini. Misalnya, *Candida albicans*, patogen jamur manusia yang paling umum, menerjemahkan CUG kodon sebagai serin, sedangkan hampir semua organisme lain menerjemahkannya sebagai leusin. Mitokondria (yang memiliki genomnya sendiri dan menyandikan banyak alat terjemahannya) sering menyimpang dari kode standar. Sebagai contoh, dalam mitokondria mamalia AUA diterjemahkan sebagai metionin,



sedangkan dalam sitosol sel diterjemahkan sebagai isoleusin (lihat Tabel 14-3, hal. 862). Jenis penyimpangan dalam kode genetik ini "tertanam" ke dalam organisme atau organel tempat terjadinya.

Jenis variasi yang berbeda, kadang-kadang disebut pengkodean terjemahan, terjadi di banyak sel. Dalam hal ini, informasi sekuens nukleotida lain yang ada dalam mRNA dapat mengubah makna kode genetik di lokasi tertentu dalam molekul mRNA. Kode standar memungkinkan sel untuk memproduksi protein hanya menggunakan 20 asam amino. Namun, bakteri, archaea, dan eucaryotes memiliki asam amino dua puluh satu yang dapat dimasukkan secara langsung ke dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh melalui pengkodean ulang terjemahan. Selenocysteine, yang sangat penting untuk fungsi efisien berbagai enzim, mengandung atom selenium menggantikan atom sulfur sistein. Selenocysteine diproduksi secara enzimatik dari serin yang melekat pada molekul tRNA khusus yang berpasangan dengan kodon UGA, kodon yang biasanya digunakan untuk memberi sinyal penghentian terjemahan. MRNA untuk protein di mana selenocysteine harus dimasukkan pada

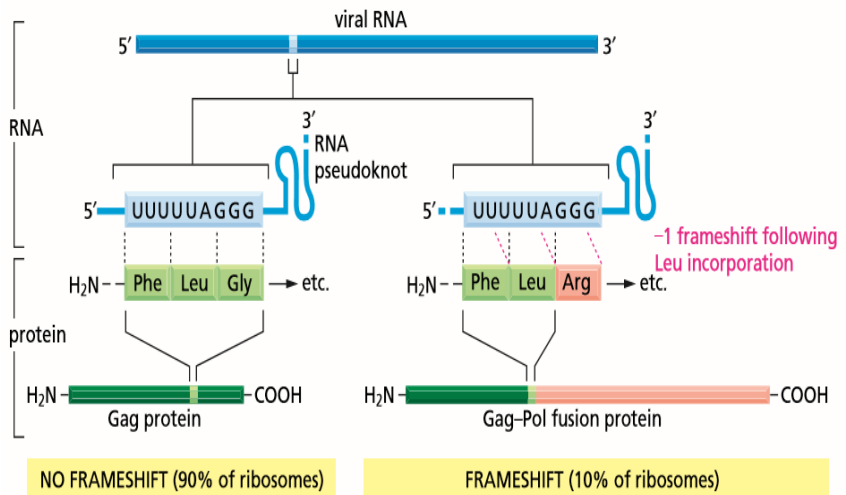
kodon UGA membawa urutan nukleotida tambahan di mRNA terdekat yang menyebabkan peristiwa pengkodean ulang ini (Gambar 77).



**Gambar 77. Penyatuan selenosistein menjadi rantai polipeptida yang sedang tumbuh.** Sebuah tRNA khusus diisi dengan serin oleh seret sintetik normal, dan serin selanjutnya diubah secara enzimatik menjadi selenosistein. Struktur RNA spesifik dalam mRNA (struktur batang dan loop dengan urutan nukleotida tertentu) menandakan bahwa selenocysteine harus dimasukkan pada kodon UGA yang berdekatan. Sebagaimana ditunjukkan, acara ini membutuhkan partisipasi dari faktor terjemahan spesifik-selenocysteine.

Bentuk pengkodean ulang lainnya, transleshifting translasi, memungkinkan lebih dari satu protein disintesis dari mRNA tunggal. Retrovirus, anggota kelompok besar patogen yang menginfeksi eukariotik, umumnya menggunakan frameshifting translasi untuk membuat protein

kapsid (protein Gag) dan transkriptase balik virus dan integrase (protein Pol) dari transkrip RNA yang sama (lihat Gambar 5–73). Virus membutuhkan lebih banyak salinan protein Gag daripada protein Pol. Penyesuaian kuantitatif ini dicapai dengan menyandikan gen Pol tepat setelah gen Gag tetapi dalam kerangka bacaan yang berbeda. Sejumlah kecil produk gen Pol dibuat karena, kadang-kadang, frameshift translasi hulu memungkinkan protein Gag menghentikan kodon untuk dilewati. Frameshift ini terjadi pada kodon tertentu dalam mRNA dan membutuhkan sinyal pengkodean ulang yang spesifik, yang tampaknya merupakan fitur struktural dari urutan RNA di bagian bawah situs ini (Gambar 78).



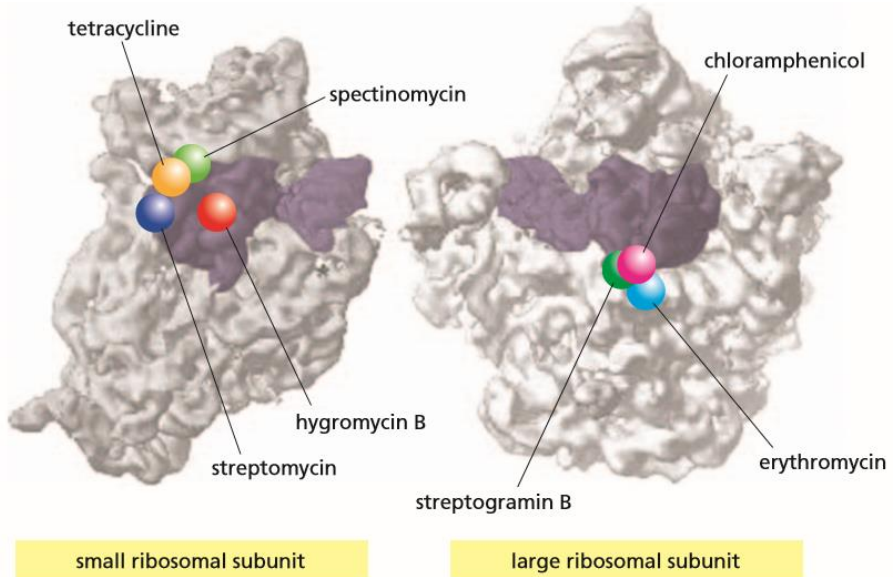
**Gambar 78 Frameshifting translasional yang menghasilkan reverse transcriptase dan integrase dari retrovirus** Transcriptase balik virus dan integrase diproduksi oleh pemrosesan proteolitik dari protein besar (protein fusi Gag-Pol) yang terdiri dari urutan asam amino Gag dan Pol. Pemrosesan proteinolitik dari protein Gag yang lebih banyak menghasilkan protein kapsid virus. Baik protein fusi Gag dan Pol mulai dengan mRNA yang identik, tetapi sementara protein Gag berakhir pada kodon berhenti di hilir dari urutan yang ditunjukkan, terjemahan protein fusi Gag-Pol memintas kodon berhenti ini, memungkinkan sintesis yang lebih lama Protein fusi Gag – Pol. Stop-codon-bypass dimungkinkan oleh frameshift translasi yang terkontrol, seperti yang diilustrasikan. Fitur dalam struktur RNA lokal (termasuk loop RNA yang ditunjukkan) menyebabkan tRNA<sup>Leu</sup> yang melekat pada terminal-C dari rantai polipeptida yang sedang tumbuh kadang-kadang tergelincir ke belakang oleh satu nukleotida pada ribosom. sehingga berpasangan dengan kodon UUU dan bukan kodon UUA yang pada awalnya menentukan penggabungannya; kodon berikutnya (AGG) dalam bingkai bacaan baru

menentukan arginin daripada glisin. Selip terkendali ini sebagian disebabkan oleh pseudoknot yang terbentuk dalam viral mRNA (lihat Gambar 102). Urutan yang ditunjukkan adalah dari virus AIDS manusia, HIV. (Diadaptasi dari T. Jacks et al., Nature 331: 280–283, 1988. Dengan izin dari Macmillan Publishers Ltd.)

## **Inhibitor dari Sintesis Protein Procaryotic Berguna sebagai Antibiotik**

Banyak antibiotik yang paling efektif digunakan dalam pengobatan modern adalah senyawa yang dibuat oleh jamur yang menghambat sintesis protein bakteri. Jamur dan bakteri bersaing untuk banyak relung lingkungan yang sama, dan jutaan tahun evolusi bersama telah menghasilkan jamur yang menghasilkan inhibitor bakteri kuat. Beberapa obat ini mengeksploitasi perbedaan struktural dan fungsional antara ribosom bakteri dan eukariotik sehingga dapat mengganggu fungsi ribosom bakteri. Dengan demikian manusia dapat mengambil dosis tinggi dari beberapa senyawa ini tanpa toksisitas yang tidak semestinya. Banyak antibiotik dimasukkan ke dalam kantong di RNA ribosom dan hanya mengganggu operasi ribosom yang lancar (Gambar 79). Tabel-4 daftar beberapa antibiotik yang lebih umum dari jenis ini bersama dengan beberapa inhibitor lain dari sintesis

protein, beberapa di antaranya bertindak pada sel eukariotik dan karenanya tidak dapat digunakan sebagai antibiotik.



**Gambar 79 Situs pengikatan untuk antibiotik pada ribosom bakteri.** Subunit ribosom kecil (kiri) dan besar (kanan) disusun seolah-olah ribosom telah dibuka seperti buku; molekul tRNA terikat ditunjukkan dengan warna ungu (lihat Gambar 64). Sebagian besar antibiotik menunjukkan ikatan langsung ke kantong yang dibentuk oleh molekul RNA ribosom. Hygromycin B menginduksi kesalahan dalam terjemahan, spectinomycin memblokir translokasi peptidyl-tRNA dari situs-A ke situs-P, dan streptogramin B mencegah pemanjangan peptida yang baru lahir. Tabel-4 mencantumkan mekanisme penghambatan antibiotik lain yang ditunjukkan pada gambar. (Diadaptasi dari J. Poehlsaard dan S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol* 3: 870-881, 2005. Dengan izin dari Macmillan Publishers Ltd.)

Karena mereka memblokir langkah-langkah spesifik dalam proses yang mengarah dari DNA ke protein, banyak senyawa yang tercantum dalam Tabel-4 berguna untuk studi biologi sel. Di antara obat yang paling umum digunakan dalam penyelidikan tersebut adalah kloramfenikol, sikloheksimid, dan puromisin, yang semuanya secara spesifik menghambat sintesis protein. Dalam sel eukariotik, misalnya, kloramfenikol menghambat sintesis protein pada ribosom hanya di mitokondria (dan dalam kloroplas pada tanaman), mungkin mencerminkan asal-usul prokariotik dari organel-organel ini (dibahas pada Bab 14). Cycloheximide, sebaliknya, hanya mempengaruhi ribosom dalam sitosol. Puromisin sangat menarik karena merupakan analog struktural dari molekul tRNA yang dihubungkan dengan asam amino dan karenanya merupakan contoh lain dari mimikri molekuler; ribosom salah mengartikannya sebagai asam amino otentik dan secara kovalen menggabungkannya pada terminal-C dari rantai peptida yang sedang tumbuh, sehingga menyebabkan terminasi dini dan pelepasan polipeptida. Seperti yang mungkin diharapkan, puromisin

menghambat sintesis protein baik pada procaryote maupun eucaryotes.

**Tabel–4 Penghambat Protein atau Sintesis RNA**

<b>INHIBITOR</b>	<b>EFEK SPESIFIK</b>
Hanya bertindak pada bakteri	
Tetrasiklin	Menghambat pengikatan aminoasil-tRNA ke situs-A ribosom
Streptomycine	Mencegah transisi dari inisiasi terjemahan ke perpanjangan rantai dan juga menyebabkan kesalahan kode
Chloramphenico	Memblokir reaksi peptidil transferase pada ribosom (langkah 2 pada Gambar –66)
Erythromycin	Mengikat di saluran keluar ribosom dan dengan demikian menghambat perpanjangan rantai peptida
Rifamycin	Menghambat inisiasi rantai RNA dengan mengikat RNA polimerase (mencegah sintesis RNA)
Bertindak pada bakteri dan eucaryotes	
Puromycin	Menyebabkan pelepasan prematur rantai polipeptida yang baru lahir dengan penambahannya ke ujung rantai yang tumbuh
Actinomycin D	Mengikat DNA dan menghalangi pergerakan RNA polimerase (mencegah sintesis RNA)



Bertindak pada eucaryotes tetapi bukan bakteri	
Cycloheximide	Memblokir reaksi translokasi pada ribosom (langkah 3 pada Gambar –66)
Anisomycin	Memblokir reaksi peptidil transferase pada ribosom (langkah 2 pada Gambar –66)
a-Amanitin	Menghambat sintesis mRNA dengan mengikat secara istimewa ke RNA polimerase II

Ribosom mitokondria eukariotik (dan kloroplas) sering menyerupai bakteri dalam sensitivitasnya terhadap inhibitor. Oleh karena itu, beberapa antibiotik ini dapat memiliki efek buruk pada mitokondria manusia.

## Keakuratan dalam Penerjemahan Membutuhkan Pengeluaran Energi Gratis

Terjemahan oleh ribosom adalah kompromi antara kendala yang bertentangan antara akurasi dan kecepatan. Kita telah melihat, misalnya, bahwa keakuratan terjemahan (1 kesalahan per 104 asam amino bergabung) membutuhkan waktu tunda setiap kali asam amino baru ditambahkan ke rantai polipeptida yang sedang tumbuh, menghasilkan kecepatan terjemahan keseluruhan 20 asam amino yang dimasukkan per kedua pada bakteri. Bakteri mutan dengan perubahan spesifik pada subunit ribosom kecil memiliki

penundaan lebih lama dan menerjemahkan mRNA menjadi protein dengan akurasi yang jauh lebih tinggi dari ini; Namun, sintesis protein sangat lambat pada mutan-mutan ini sehingga bakteri hampir tidak dapat bertahan hidup.

Kita juga telah melihat bahwa untuk mencapai keakuratan yang diamati dari sintesis protein membutuhkan pengeluaran banyak energi bebas; ini diharapkan, karena, sebagaimana dibahas dalam Bab 2, ada harga yang harus dibayar untuk setiap kenaikan urutan dalam sel. Dalam kebanyakan sel, sintesis protein mengkonsumsi lebih banyak energi daripada proses biosintesis lainnya. Setidaknya empat ikatan fosfat berenergi tinggi terpecah untuk membuat setiap ikatan peptida baru: dua dikonsumsi dalam pengisian molekul tRNA dengan asam amino (lihat Gambar 56), dan dua langkah penggerak lainnya dalam siklus reaksi yang terjadi pada ribosom selama sintesis itu sendiri (lihat Gambar 67). Selain itu, energi tambahan dikonsumsi setiap kali hubungan asam amino yang salah dihidrolisis oleh tRNA synthetase (lihat Gambar 59) dan setiap kali tRNA yang salah memasuki ribosom, memicu hidrolisis GTP, dan ditolak (lihat Gambar 67). Agar efektif, mekanisme

proofreading ini juga harus memungkinkan sebagian kecil interaksi yang benar untuk dihapus; untuk alasan ini, proofreading bahkan lebih mahal dalam energi daripada yang terlihat.

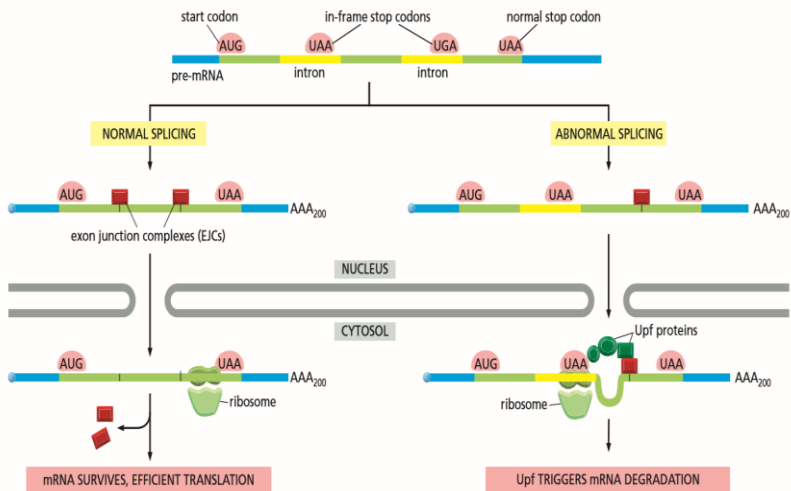
### **Mekanisme Kontrol Kualitas Bertindak untuk Mencegah Penerjemahan mRNA yang Rusak**

Dalam eucaryotes, produksi mRNA melibatkan transkripsi dan serangkaian langkah pemrosesan RNA yang rumit; ini terjadi di nukleus, dipisahkan dari ribosom, dan hanya ketika pemrosesan selesai mRNA diangkut ke sitoplasma untuk diterjemahkan (lihat Gambar 40). Namun, skema ini tidak aman, dan beberapa mRNA yang salah diproses secara tidak sengaja dikirim ke sitoplasma. Selain itu, mRNA yang sempurna saat meninggalkan nukleus dapat menjadi rusak atau rusak dalam sitosol. Bahaya menerjemahkan mRNA yang rusak atau diproses secara tidak lengkap (yang akan menghasilkan protein terpotong atau menyimpang) tampaknya sangat besar sehingga sel memiliki beberapa langkah cadangan untuk mencegah hal ini terjadi.

Untuk menghindari penerjemahan mRNA yang rusak, tutup 5' dan ujung poli-A keduanya dikenali oleh mesin inisiasi penerjemahan sebelum penerjemahan dimulai (lihat Gambar 72). Untuk membantu memastikan bahwa mRNA disambung dengan benar sebelum diterjemahkan, kompleks ekson junction (EJC), yang disimpan pada mRNA setelah penyambungan (lihat Gambar 40), merangsang terjemahan mRNA selanjutnya.

Tetapi sistem penjagaan mRNA yang paling kuat, yang disebut peluruhan mRNA yang dimediasi nonsens, menghilangkan mRNA yang rusak sebelum dapat diterjemahkan secara efisien menjadi protein. Mekanisme ini berperan ketika sel menentukan bahwa molekul mRNA memiliki kodon (stop) omong kosong (UAA, UAG, atau UGA) di tempat yang "salah" situasi yang kemungkinan muncul dalam molekul mRNA yang telah disambungkan secara tidak tepat. Splicing yang menyimpang biasanya akan menghasilkan pengenalan acak kodon yang tidak masuk akal ke dalam kerangka pembacaan mRNA, terutama pada organisme, seperti manusia, yang memiliki ukuran intron rata-rata yang besar (lihat Gambar 32B).

Mekanisme pengawasan ini dimulai ketika molekul mRNA diangkut dari nukleus ke sitosol. Saat ujung 5' keluar dari pori nuklir, mRNA dipenuhi oleh ribosom, yang mulai menerjemahkannya. Sebagai hasil terjemahan, kompleks persimpangan ekson (EJC) terikat ke mRNA di setiap splicesite tampaknya digantikan oleh ribosom bergerak. Codon stop normal akan berada dalam ekson terakhir, sehingga pada saat ribosom mencapai dan berhenti, EJC tidak lagi harus terikat pada mRNA. Jika demikian, mRNA “lolos inspeksi” dan dilepaskan ke sitosol di mana ia dapat diterjemahkan dengan sungguh-sungguh (Gambar 80). Namun, jika ribosom mencapai kodon berhenti dini dan kiosk, ia merasakan bahwa EJC tetap dan molekul mRNA terikat cepat terdegradasi. Dengan cara ini, terjemahan putaran pertama memungkinkan sel untuk menguji kesesuaian setiap molekul mRNA ketika ia keluar dari nukleus.



**Gambar 80** Peluruhan mRNA yang dimediasi oleh akal. Seperti yang ditunjukkan di sebelah kanan, kegagalan untuk menyambungkan pre-mRNA dengan benar sering memasukkan kodon penghentian prematur ke dalam kerangka pembacaan protein. Pengenalan kodon stop “dalam-bingkai” seperti itu sangat mungkin terjadi pada mamalia, di mana intronnya cenderung sangat panjang. Ketika diterjemahkan, mRNA abnormal ini menghasilkan protein yang menyimpang, yang dapat merusak sel. Namun, seperti yang ditunjukkan di kanan bawah gambar, RNA abnormal ini dihancurkan oleh mekanisme peluruhan yang dimediasi oleh omong kosong. Menurut salah satu model, molekul mRNA, yang mengandung kompleks sambungan ekson (EJC) untuk menandai sambungan yang berhasil diselesaikan, pertama kali bertemu oleh ribosom yang melakukan putaran terjemahan “uji”. Ketika mRNA melewati saluran ketat ribosom, EJC dilucuti, dan mRNA yang berhasil dilepaskan untuk menjalani beberapa putaran terjemahan (sisi kiri). Namun, jika kodon in-frame stop ditemukan sebelum kompleks persimpangan ekson akhir tercapai (sisi kanan), mRNA mengalami peluruhan nonsensemediated, yang dipicu oleh protein Upf (hijau) yang

mengikat masing-masing EJC. Perhatikan bahwa, untuk memicu peluruhan nonsensemediasi, kodon penghentian prematur harus berada dalam bingkai pembacaan yang sama dengan protein normal. (Diadaptasi dari J. Lykke-Andersen et al., *Sel* 103: 1121–1131, 2000. Dengan izin dari Elsevier.)

Peluruhan yang dimediasi nonsense mungkin sangat penting dalam evolusi, memungkinkan sel eukariotik untuk lebih mudah mengeksplorasi gen baru yang dibentuk oleh penataan ulang DNA, mutasi, atau pola alternatif penyambungan dengan memilih hanya mRNA untuk terjemahan yang dapat menghasilkan protein berdurasi penuh. Peluruhan yang dimediasi nonsense juga penting dalam sel-sel sistem kekebalan tubuh yang sedang berkembang, di mana penataan ulang DNA luas yang terjadi (lihat Gambar 25-36) sering menghasilkan kodon terminasi prematur. Sistem pengawasan mendegradasi mRNA yang dihasilkan dari gen yang disusun ulang, sehingga menghindari efek toksik potensial dari protein terpotong.

Akhirnya, jalur pengawasan yang dimediasi omong kosong memainkan peran penting dalam mengurangi gejala dari banyak penyakit manusia yang diwariskan. Seperti yang telah kita lihat, penyakit bawaan biasanya disebabkan oleh

mutasi yang merusak fungsi protein utama, seperti hemoglobin atau salah satu faktor pembekuan darah. Sekitar sepertiga dari semua kelainan genetik pada manusia merupakan hasil dari mutasi atau mutasi yang tidak masuk akal (seperti mutasi perubahan bingkai atau mutasi situs splice) yang menempatkan mutasi yang tidak masuk akal ke dalam kerangka pembacaan gen. Pada individu yang membawa satu gen mutan dan satu fungsional, peluruhan yang dimediasi nonsense menghilangkan mRNA yang menyimpang dan dengan demikian mencegah protein yang berpotensi toksik dibuat. Tanpa perlindungan ini, individu dengan satu "gen penyakit" fungsional dan satu mutan kemungkinan akan menderita gejala yang jauh lebih parah.

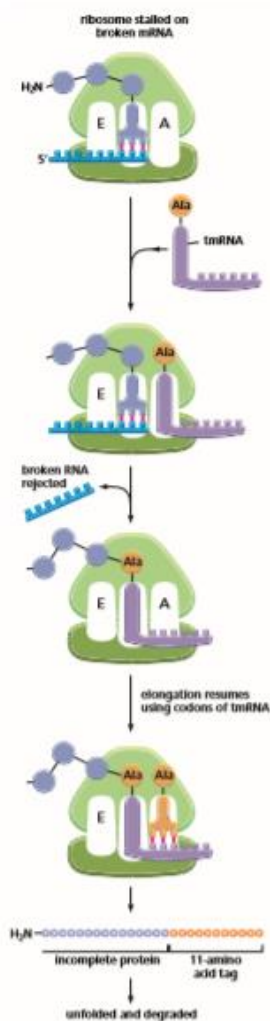
Kami telah melihat sebelumnya dalam bab ini bahwa bakteri tidak memiliki pemrosesan mRNA rumit yang ditemukan pada eucaryotes dan bahwa terjemahan sering dimulai sebelum sintesis molekul RNA selesai. Namun bakteri juga memiliki mekanisme kontrol kualitas untuk menangani mRNA yang tidak sepenuhnya disintesis dan rusak. Ketika ribosom bakteri diterjemahkan ke akhir RNA yang tidak lengkap, ia terhenti dan tidak melepaskan RNA



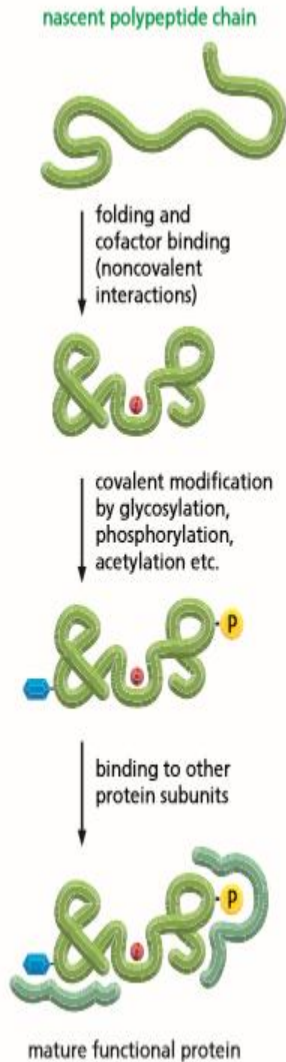
Penyelamatan datang dalam bentuk RNA khusus (disebut tmRNA), yang memasuki situs-A ribosom dan diterjemahkan dengan sendirinya, melepaskan ribosom. Dengan demikian, tag asam amino 11 khusus ditambahkan ke terminal-C dari sinyal protein terpotong untuk protease bahwa seluruh protein harus terdegradasi (Gambar 81).

### **Beberapa Protein Mulai Melipat Sementara Masih Disintesis**

Proses ekspresi gen belum berakhir ketika kode genetik telah digunakan untuk membuat urutan asam amino yang membentuk protein. Agar bermanfaat bagi sel, rantai polipeptida baru ini harus dilipat menjadi konformasi tiga dimensi yang unik, mengikat setiap kofaktor molekul kecil yang diperlukan untuk aktivitasnya, dimodifikasi secara tepat oleh protein kinase atau enzim pengubah protein lainnya, dan berkumpul dengan benar dengan subunit protein lainnya yang berfungsi (Gambar 82).



**Gambar 81. Penyelamatan ribosom bakteri terhenti pada molekul mRNA yang tidak lengkap.** TmRNA yang ditampilkan adalah RNA 363-nukleotida dengan fungsi tRNA dan mRNA, karenanya namanya. Ia membawa alanin dan dapat memasuki situs-A yang kosong dari ribosom yang macet untuk menambahkan alanin ini ke rantai polipeptida, meniru tRNA meskipun tidak ada kodon yang hadir untuk memandunya. Ribosom kemudian menerjemahkan 10 kodon dari tmRNA, melengkapinya dengan 11 tag asam amino pada protein. Protease mengenali tanda ini dan menurunkan seluruh protein. Meskipun contoh yang ditunjukkan pada gambar adalah dari bakteri, eucaryotes dapat menggunakan strategi yang sama.

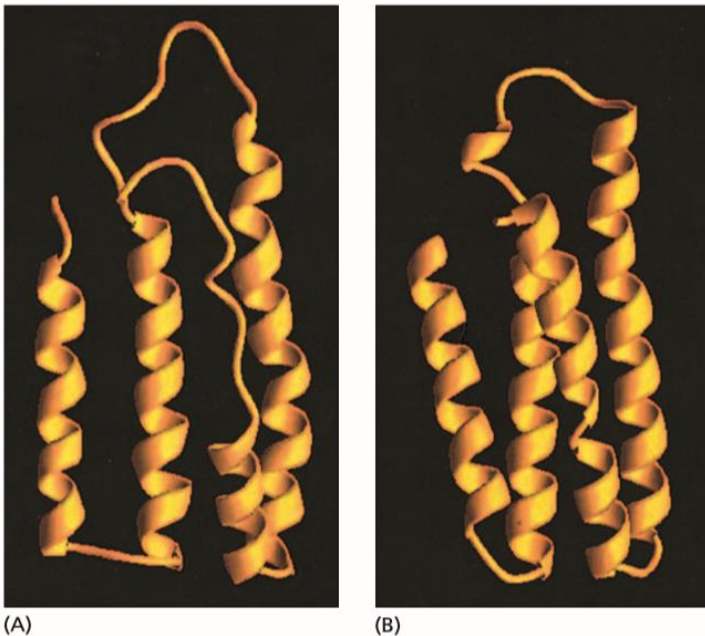


**Gambar 82 Langkah-langkah dalam penciptaan protein fungsional.** Seperti yang ditunjukkan, terjemahan urutan mRNA menjadi urutan asam amino pada ribosom bukanlah akhir dari proses pembentukan protein. Agar berfungsi, rantai polipeptida yang telah selesai harus dilipat dengan benar menjadi konformasi tiga dimensi, mengikat kofaktor yang diperlukan, dan berkumpul dengan rantai protein mitranya (jika ada). Pembentukan ikatan nonkovalen mendorong perubahan ini. Seperti yang ditunjukkan, banyak protein juga memerlukan modifikasi kovalen dari asam amino terpilih. Meskipun modifikasi yang paling sering adalah glikosilasi protein dan fosforilasi protein, lebih dari 100 jenis modifikasi kovalen diketahui (lihat, misalnya, Gambar 3–81).

Informasi yang diperlukan untuk semua langkah yang tercantum di atas pada akhirnya terkandung dalam urutan asam amino terkait yang diproduksi ribosom ketika menerjemahkan molekul mRNA menjadi rantai polipeptida. Seperti dibahas dalam Bab 3, ketika protein terlipat ke dalam struktur yang kompak, ia mengubur sebagian besar residu hidrofobiknya dalam inti interior. Selain itu, sejumlah besar interaksi nonkovalen terbentuk antara berbagai bagian molekul. Ini adalah jumlah dari semua pengaturan yang menguntungkan secara energetik ini yang menentukan pola lipatan akhir dari rantai polipeptida sebagai konformasi dari energi bebas terendah (lihat hal. 130).

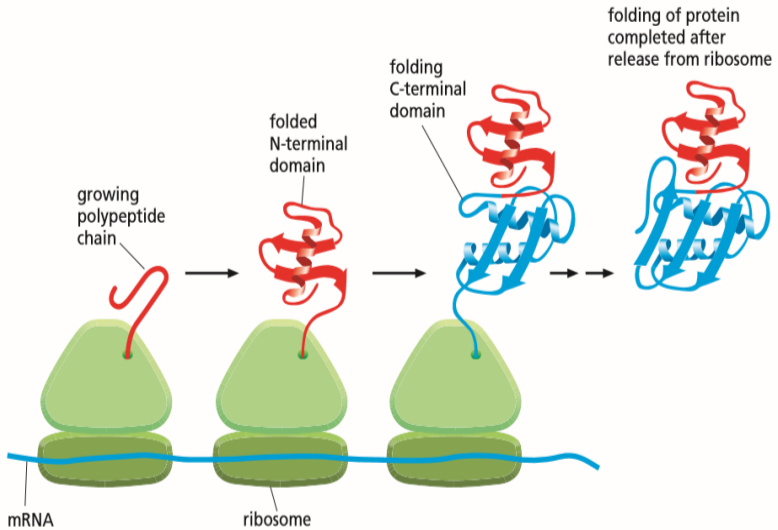
Melalui jutaan tahun evolusi, urutan asam amino dari setiap protein telah dipilih tidak hanya untuk konformasi yang diadopsi tetapi juga untuk kemampuan untuk melipat dengan cepat. Untuk beberapa protein, lipatan ini dimulai segera, ketika protein berputar keluar dari ribosom, mulai dari ujung terminal-N. Dalam kasus ini, karena setiap domain protein muncul dari ribosom, dalam beberapa detik ia membentuk struktur padat yang berisi sebagian besar fitur sekunder akhir (ahelices dan bsheets) yang disejajarkan

dengan konformasi yang kira-kira tepat (Gambar 83). struktur. Butuh beberapa menit untuk mensintesis protein dengan ukuran rata-rata, dan untuk beberapa protein, sebagian besar proses pelipatan selesai pada saat ribosom melepaskan ujung terminal-C dari protein (Gambar 84).



**Gambar 83 Struktur gumpalan cair.** (A) Suatu bentuk gumpalan cair dari sitokrom b562 lebih terbuka dan kurang teratur dibandingkan bentuk akhir protein terlipat, seperti yang ditunjukkan dalam (B). Perhatikan bahwa gumpalan cair mengandung sebagian besar struktur sekunder dari bentuk akhir, meskipun ujung-ujung dari ahelices terurai dan salah satu heliks hanya sebagian yang terbentuk. (Atas perkenan Joshua Wand, dari

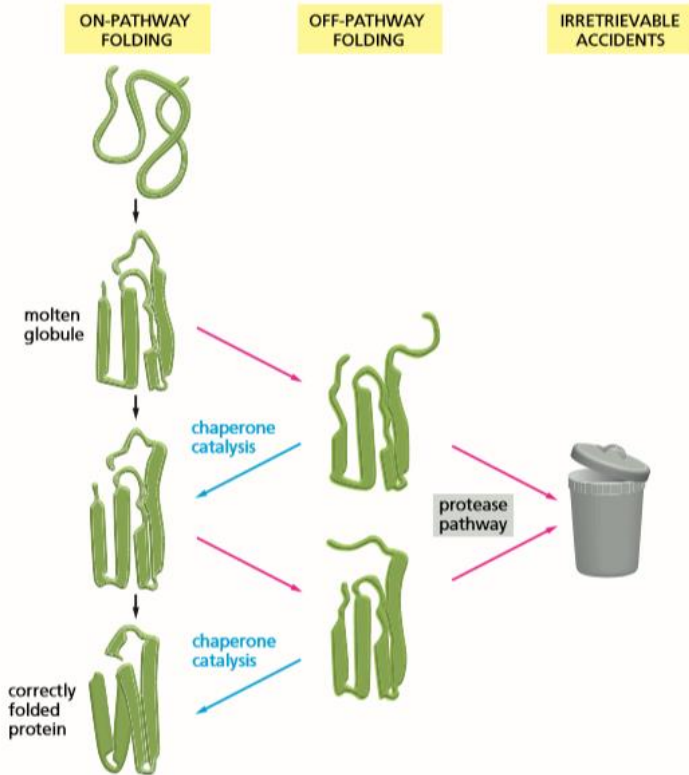
Y. Feng et al., Nat. Struct. Biol. 1: 30–35, 1994. Dengan izin dari Macmillan Publishers Ltd.)



**Gambar 84 Lipat protein trans-translasi.** Rantai polipeptida yang tumbuh ditunjukkan memperoleh struktur sekunder dan tersiernya saat muncul dari ribosom. Domain N-terminal terlipat pertama, sedangkan domain C-terminal masih disintesis. Protein ini belum mencapai konformasi akhir pada saat dilepaskan dari ribosom. (Dimodifikasi dari A.N. Federov dan T.O. Baldwin, *J. Biol. Chem.* 272: 32715–32718, 1997.)

## **Molecular Chaperones Bantu Panduan Melipat Sebagian Besar Protein**

Sebagian besar protein mungkin tidak mulai terlipat selama sintesisnya. Sebaliknya, mereka bertemu di ribosom oleh kelas khusus protein yang disebut pendamping molekuler. Chaperone molekuler berguna untuk sel karena ada banyak jalur berbeda yang dapat diambil untuk mengubah protein yang tidak terlipat atau terlipat sebagian menjadi konformasi kompak akhir. Untuk banyak protein, beberapa zat antara yang terbentuk di sepanjang jalan akan teragregasi dan dibiarkan sebagai jalan buntu di luar jalur tanpa intervensi pendamping (Gambar 85).



**Gambar 85A** pandangan terkini tentang pelipatan protein. Setiap domain dari protein yang baru disintesis dengan cepat mencapai keadaan "gumpalan cair". Pelipatan berikutnya terjadi lebih lambat dan melalui banyak jalur, seringkali melibatkan bantuan pendamping molekuler. Beberapa molekul mungkin masih gagal melipat dengan benar; seperti yang dijelaskan dalam teks, protease spesifik mengenali dan menurunkan molekul-molekul ini

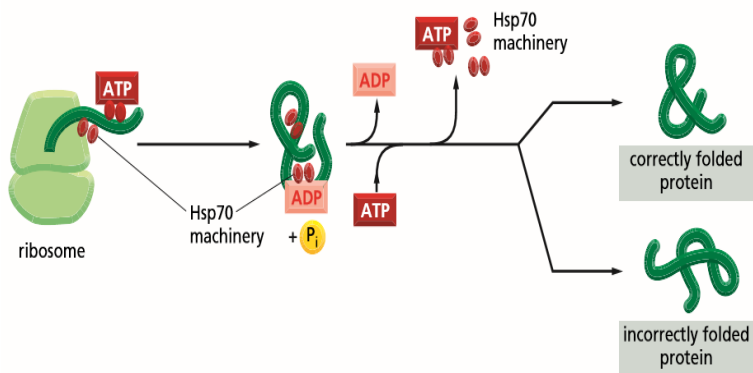


Banyak molekul chaperone disebut protein heat-shock (ditunjuk sebagai Hsp), karena mereka disintesis dalam jumlah yang meningkat secara dramatis setelah paparan sel yang singkat pada suhu yang tinggi (misalnya, 42 ° C untuk sel yang biasanya hidup pada suhu 37 ° C). Ini mencerminkan pengoperasian sistem umpan balik yang merespons peningkatan protein yang salah lipat (seperti yang dihasilkan oleh suhu tinggi) dengan meningkatkan sintesis chaperone yang membantu protein ini melipat kembali.

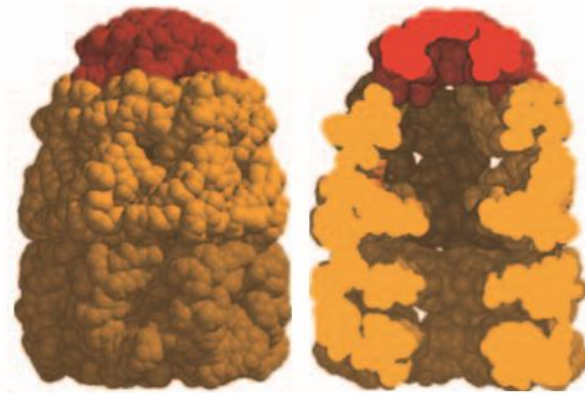
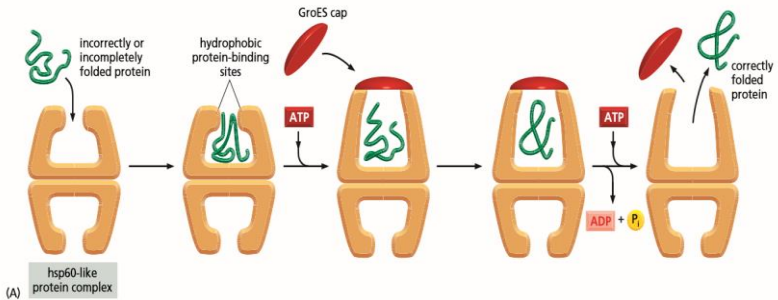
Ada beberapa keluarga besar pendamping molekul eukariotik, termasuk protein Hsp60 dan Hsp70. Anggota keluarga yang berbeda berfungsi dalam organel yang berbeda. Jadi, seperti yang dibahas pada Bab 12, mitokondria mengandung molekul Hsp60 dan Hsp70 mereka sendiri yang berbeda dari yang berfungsi dalam sitosol; dan Hsp70 khusus (disebut BIP) membantu melipat protein dalam retikulum endoplasma.

Protein Hsp60 dan Hsp70 masing-masing bekerja dengan set kecil protein terkait ketika mereka membantu protein lain terlipat. Hsps memiliki afinitas untuk tambalan hidrofobik yang terpapar pada protein yang tidak terlipat

sempurna, dan mereka menghidrolisis ATP, sering mengikat dan melepaskan substrat protein mereka dengan setiap siklus hidrolisis ATP. Dalam hal lain, kedua jenis protein Hsp berfungsi secara berbeda. Mesin Hsp70 bertindak awal dalam kehidupan banyak protein, mengikat untai sekitar tujuh asam amino hidrofobik sebelum protein meninggalkan ribosom (Gambar 86). Sebaliknya, protein mirip-Hsp60 membentuk struktur besar yang terbentuk setelah protein disintesis sepenuhnya. Jenis pendamping, kadang-kadang disebut chaperonin, membentuk "ruang isolasi" di mana protein yang gagal melipat diberi makan, mencegah agregasi mereka dan memberi mereka lingkungan yang menguntungkan untuk mencoba melakukan pelapisan ulang (Gambar 87).



**Gambar 86 Keluarga molekul pendamping molekul Hsp70.** Protein-protein ini bekerja sejak dini, mengenali hamparan kecil asam amino hidrofob pada permukaan protein. Dibantu oleh satu set protein Hsp40 yang lebih kecil (tidak diperlihatkan), molekul Hsp70 yang terikat ATP menangkap protein target mereka dan kemudian menghidrolisis ATP menjadi ADP, mengalami perubahan konformasi yang menyebabkan molekul Hsp70 untuk berasosiasi lebih erat dengan target. Setelah Hsp40 terdisosiasi, rebinding cepat ATP menginduksi disosiasi protein Hsp70 setelah rilis ADP. Pada kenyataannya, siklus berulang dari pengikatan dan pelepasan protein Hsp membantu protein target untuk dilipat kembali, seperti yang secara skematis diilustrasikan pada Gambar 85.



(B)

**Gambar 87 Struktur dan fungsi keluarga Hsp60 dari molekul pendamping.** (A) Katalisis pemurnian protein. Protein yang salah lipatan pada awalnya ditangkap oleh interaksi hidrofobik di sepanjang tepi laras. Ikatan ATP berikutnya ditambah penutup protein meningkatkan diameter laras barel, yang dapat secara sementara meregang (sebagian membuka) protein klien. Ini juga membatasi protein dalam ruang tertutup, di mana ia memiliki peluang baru untuk dilipat. Setelah sekitar 15 detik, hidrolisis ATP terjadi, melemahkan kompleks. Ikatan berikutnya dari molekul ATP lain mengeluarkan protein, baik dilipat atau tidak, dan siklus berulang. Jenis pendamping molekuler ini juga dikenal sebagai chaperonin; itu ditetapkan sebagai Hsp60 dalam

mitokondria, TCP1 dalam sitosol sel vertebrata, dan GroEL pada bakteri. Seperti yang ditunjukkan, hanya setengah dari barel simetris yang beroperasi pada protein klien pada suatu waktu. (B) Struktur GroEL terikat pada tutup GroES-nya, sebagaimana ditentukan oleh kristalografi sinar-X. Di sebelah kiri diperlihatkan bagian luar struktur seperti laras dan di sebelah kanan ada penampang melintang di tengahnya. (B, diadaptasi dari B. Bukau dan A.L. Horwich, *Cell* 92: 351-366, 1998. Dengan izin dari Elsevier.)

Para pendamping yang ditunjukkan pada Gambar 86 dan 87 sering menggunakan banyak siklus hidrolisis ATP untuk melipat rantai polipeptida tunggal dengan benar. Meskipun sebagian dari pengeluaran energi ini digunakan untuk melakukan pekerjaan mekanis, mungkin lebih banyak yang dikeluarkan untuk memastikan bahwa lipatan protein akurat. Sama seperti yang kita lihat untuk transkripsi, splicing, dan terjemahan, pengeluaran energi bebas dapat digunakan oleh sel untuk meningkatkan akurasi proses biologis. Dalam hal pelipatan protein, hidrolisis ATP memungkinkan chaperone mengenali berbagai struktur yang salah lipatan, untuk menghentikan pelipatan lebih lanjut dan memulai kembali pelipatan protein dengan cara yang teratur.

Meskipun diskusi kami hanya berfokus pada dua jenis pendamping, sel memiliki variasi yang lain. Keragaman

yang sangat besar dari protein dalam sel mungkin membutuhkan berbagai chaperone dengan pengawasan serbaguna dan kemampuan koreksi.

### **Daerah Hidrofobik Terkena Memberikan Sinyal Kritis untuk Kontrol Kualitas Protein**

Jika asam amino radioaktif ditambahkan ke sel untuk waktu yang singkat, protein yang baru disintesis dapat diikuti saat mereka matang dalam bentuk fungsional terakhirnya. Jenis percobaan ini menunjukkan bahwa protein Hsp70 bertindak pertama kali, dimulai ketika protein masih disintesis pada ribosom, dan protein seperti Hsp60 hanya bertindak kemudian untuk membantu melipat protein lengkap. Tetapi bagaimana sel membedakan protein yang gagal melipat, yang membutuhkan putaran tambahan pengerasan yang dikatalisis ATP, dari yang dengan struktur yang benar?

Sebelum menjawab, kita perlu berhenti sejenak untuk mempertimbangkan nasib protein pasca-translasi secara lebih luas. Biasanya, jika sebuah protein memiliki bercak asam hidrofobik terpapar yang cukup besar di permukaannya, itu

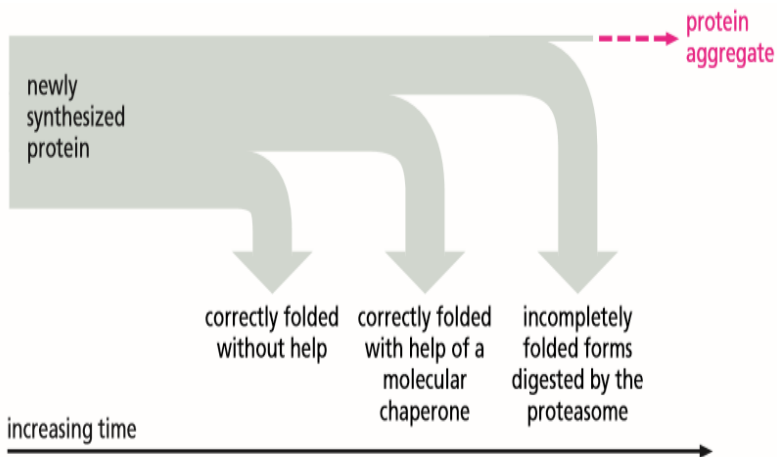
tidak normal: ia gagal melipat dengan benar setelah meninggalkan ribosom, mengalami kecelakaan yang sebagian membuka lipatnya di lain waktu, atau gagal menemukan mitra normalnya subunit dalam kompleks protein yang lebih besar. Protein seperti itu tidak hanya berguna bagi sel, tetapi juga bisa berbahaya. Banyak protein dengan daerah hidrofobik yang tidak normal dapat membentuk agregat besar di dalam sel. Kita akan melihat bahwa, dalam kasus yang jarang, agregat seperti itu memang terbentuk dan menyebabkan penyakit manusia yang parah. Namun, biasanya, mekanisme kontrol kualitas protein yang kuat mencegah bencana semacam itu.

Dengan latar belakang ini, tidak mengherankan bahwa sel-sel telah mengembangkan mekanisme rumit yang mengenali tambalan hidrofobik pada protein dan meminimalkan kerusakan yang disebabkan. Dua dari mekanisme ini tergantung pada pendamping molekuler yang baru saja dibahas, yang berikatan dengan patch dan berupaya memperbaiki protein yang rusak dengan memberikannya kesempatan lain untuk melipat. Pada saat yang sama, dengan menutupi bercak hidrofobik,

pendamping ini secara sementara mencegah agregasi protein. Protein yang sangat cepat terlipat dengan sendirinya tidak menampilkan tambalan seperti itu dan pendamping memotongnya.

Gambar 88 menguraikan semua pilihan kontrol kualitas yang dibuat sel untuk protein baru yang sulit disintesis. Seperti yang ditunjukkan, ketika upaya untuk melipatgandakan protein gagal, mekanisme ketiga dipanggil ke dalam permainan yang benar-benar menghancurkan protein oleh proteolisis. Jalur proteolitik dimulai dengan pengenalan patch hidrofobik abnormal pada permukaan protein, dan berakhir dengan pengiriman seluruh protein ke mesin penghancur protein, sebuah protease kompleks yang dikenal sebagai proteasome. Seperti dijelaskan selanjutnya, proses ini tergantung pada sistem penandaan protein yang rumit yang juga menjalankan fungsi sentral lainnya dalam sel dengan menghancurkan protein normal yang dipilih.





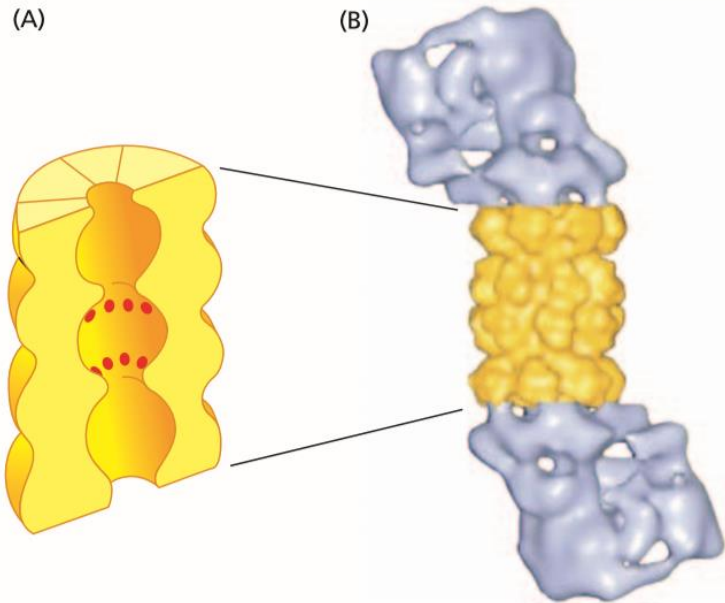
**Gambar 88 Proses yang memantau kualitas protein setelah sintesis protein.** Protein yang baru disintesis kadang-kadang terlipat dengan benar dan berkumpul sendiri dengan protein mitranya, dalam hal ini mekanisme kontrol kualitas membiarkannya sendiri. Protein yang terlipat sempurna dibantu untuk dilipat kembali oleh molekul pendamping: pertama oleh keluarga protein Hsp70, dan kemudian dalam beberapa kasus, oleh protein seperti Hsp60. Untuk kedua jenis chaperone, protein klien dikenali dari tambalan asam amino hidrofobik yang tidak normal pada permukaannya. Proses "penyelamatan protein" ini bersaing dengan mekanisme lain yang, setelah mengenali tambalan yang tidak normal, menandai protein untuk dihancurkan oleh proteasome. Aktivitas gabungan dari semua proses ini diperlukan untuk mencegah agregasi protein masif dalam sel, yang dapat terjadi ketika banyak daerah hidrofobik pada protein berkumpul bersama secara tidak spesifik.

## Proteasome adalah Protease Terkompartemen dengan Situs Aktif yang Diasingkan

Mesin proteolitik dan chaperone bersaing satu sama lain untuk menata ulang protein yang gagal melipat. Jika protein yang baru disintesis terlipat dengan cepat, paling banyak hanya sebagian kecil saja yang terdegradasi. Sebaliknya, protein yang terlipat perlahan rentan terhadap mesin proteolitik untuk waktu yang lebih lama, dan banyak lagi molekulnya dihancurkan sebelum sisanya mencapai keadaan terlipat yang tepat. Karena mutasi atau kesalahan dalam transkripsi, splicing RNA, dan terjemahan, beberapa protein tidak pernah terlipat dengan benar. Sangat penting bahwa sel menghancurkan protein yang berpotensi berbahaya ini.

Peralatan yang secara sengaja menghancurkan protein yang menyimpang adalah proteasome, protease yang bergantung pada ATP yang melimpah yang merupakan hampir 1% dari protein sel. Hadir dalam banyak salinan yang tersebar di seluruh sitosol dan nukleus, proteasome juga menghancurkan protein menyimpang dari endoplasma retikulum (ER). Sistem pengawasan berbasis ER mendeteksi

protein yang gagal melipat atau berkumpul dengan benar setelah mereka memasuki ER, dan retrotranslokasi kembali ke sitosol untuk degradasi (dibahas dalam Bab 12).

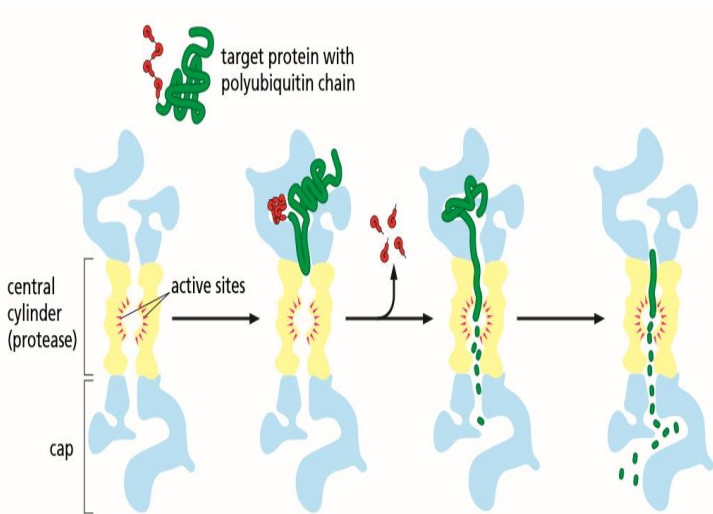


**Gambar 89 Proteasome.** (A) Pandangan potongan struktur silinder 20S pusat, sebagaimana ditentukan oleh kristalografi sinar-x, dengan situs aktif protease ditunjukkan oleh titik merah. (B) Seluruh proteasome, di mana silinder tengah (kuning) dilengkapi dengan tutup 19S (biru) di setiap ujung. Struktur tutup telah ditentukan oleh pemrosesan komputer dari gambar mikroskop elektron. Tutup kompleks (juga disebut partikel pengatur) secara selektif mengikat protein yang telah ditandai oleh ubiquitin untuk dihancurkan; kemudian menggunakan hidrolisis ATP untuk membuka rantai polipeptida mereka dan memberi mereka makan melalui saluran sempit (lihat Gambar -91) ke dalam ruang dalam silinder

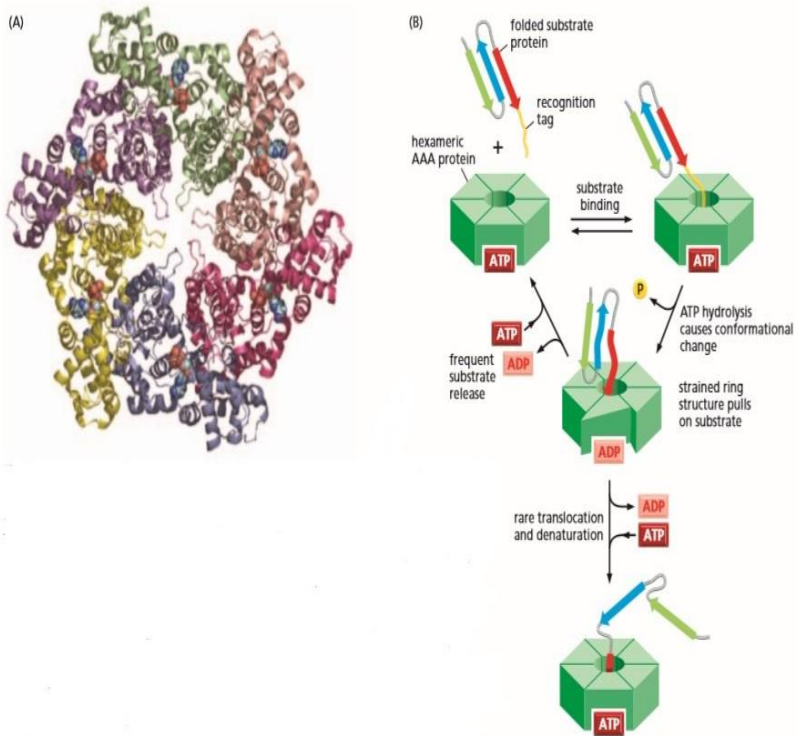
20S untuk pencernaan ke peptida pendek. (B, dari W. Baumeister et al., *Sel* 92: 367–380, 1998. Dengan izin dari Elsevier.)

Setiap proteasome terdiri dari silinder berongga pusat (proteasome inti 20S) yang dibentuk dari beberapa subunit protein yang berkumpul sebagai tumpukan kuasi-silinder dari empat cincin heptamerik (Gambar 89). Beberapa subunit adalah protease berbeda yang situs aktifnya berhadapan dengan ruang dalam silinder. Desain mencegah protease yang sangat efisien ini merajalela melalui sel. Setiap ujung silinder biasanya dikaitkan dengan kompleks protein besar (tutup 19S), yang berisi cincin protein enam-subunit, yang melaluinya protein target dimasukkan ke dalam inti proteasome di mana mereka terdegradasi (Gambar 90). Reaksi threading, didorong oleh hidrolisis ATP, membuka protein target saat mereka bergerak melalui topi, memaparkannya pada protease yang melapisi inti proteasome (Gambar 91). Protein yang membentuk struktur cincin di tutup proteasome termasuk dalam kelas besar protein "tidak terbuka" yang dikenal sebagai protein AAA. Banyak dari mereka berfungsi sebagai hexamers, dan ada kemungkinan bahwa mereka berbagi fitur mekanistik dengan

ATP yang bergantung pada DNA oleh helicases DNA (lihat Gambar 5-15).



**Gambar 90 Pencernaan protein progresif oleh proteasome.** Tutup proteasome mengenali protein substrat, dalam hal ini ditandai oleh rantai poli- poliquitin (lihat Gambar 92), dan kemudian mentranslasikannya ke dalam inti proteasome, tempat dicerna. Pada tahap awal, ubiquitin terbelah dari protein substrat dan didaur ulang. Translokasi ke dalam inti proteasome dimediasi oleh cincin protein yang bergantung pada ATP yang membuka protein substrat saat diulir melalui ring dan ke dalam inti proteasome (lihat Gambar 91). (Dari S. Prakash dan A. Matouschek, *Tren Biochem. Sci.* 29: 593-600, 2004. Dengan izin dari Elsevier.)



**Gambar 91 Protein heksamerik tanpa lipatan.** (A) Struktur ini terbentuk dari enam subunit yang masing-masing milik keluarga protein AAA. (B) Model untuk aktivitas unfoldase yang bergantung pada ATP dari protein AAA. Bentuk ATP-terikat dari cincin heksamerik protein AAA mengikat protein substrat terlipat yang telah ditandai untuk membuka (dan akhirnya dihancurkan) dengan tag pengakuan seperti rantai polibiquitin (lihat di bawah) atau peptida yang ditambahkan untuk menandai protein yang disintesis secara tidak lengkap (lihat Gambar 81). Perubahan konformasi, dibuat ireversibel oleh hidrolisis ATP, menarik substrat ke inti pusat dan meregangkan struktur cincin. Pada titik ini, protein substrat, yang sedang diseret, sebagian dapat dibuka dan masuk lebih jauh ke dalam pori-pori atau dapat mempertahankan strukturnya dan

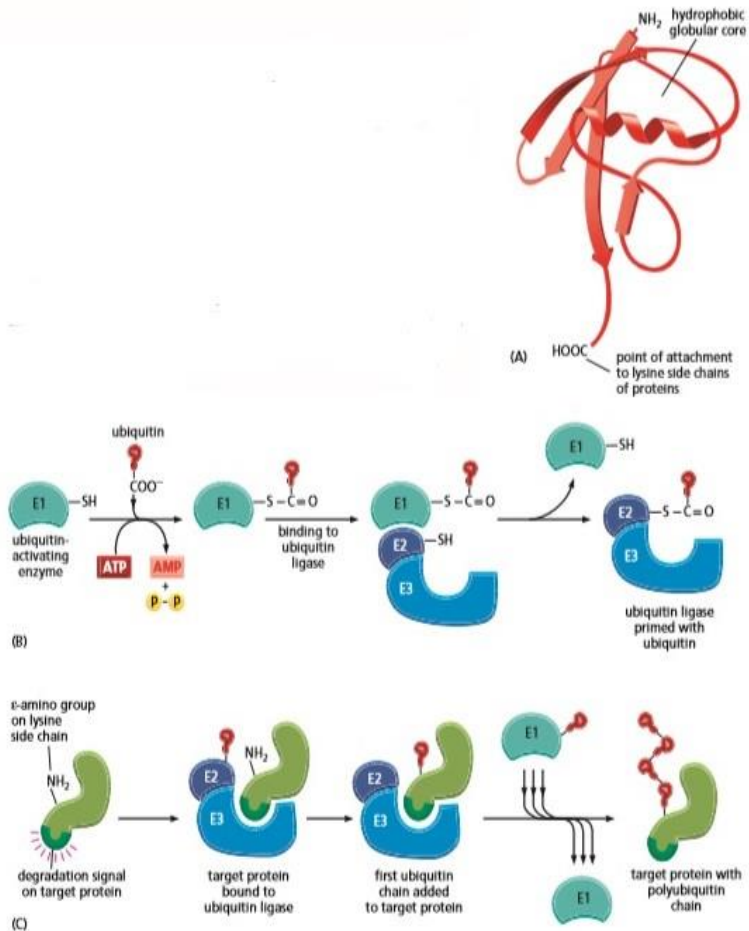
berdisosiasi. Substrat protein yang sangat stabil mungkin memerlukan ratusan siklus hidrolisis dan disosiasi ATP sebelum berhasil ditarik ke dalam cincin AAA. Setelah dibuka, protein substrat bergerak relatif cepat melalui pori oleh putaran hidrolisis ATP berturut-turut. (A, dari X. Zhang et al., *Mol. Sel* 6: 1473–1484, 2000, dan AN Lupas dan J. Martin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 746–753, 2002; B, dari RT Sauer et al., *Cell* 119: 9–18, 2004. Semua dengan izin dari Elsevier.)

Sifat penting dari proteasome, dan satu alasan untuk kompleksitas desainnya, adalah prosesitas mekanismenya: berbeda dengan protease "sederhana" yang memotong rantai polipeptida substrat hanya sekali sebelum dipisahkan, proteasom menjaga seluruh substrat terikat sampai semua itu diubah menjadi peptida pendek.

Tutup 19S juga bertindak sebagai "gerbang" yang diatur di pintu masuk ke ruang proteolitik bagian dalam, dan mereka bertanggung jawab untuk mengikat substrat protein yang ditargetkan ke proteasome. Dengan beberapa pengecualian, proteasom bekerja pada protein yang secara khusus ditandai untuk dihancurkan oleh perlekatan kovalen dari tag pengenalan yang terbentuk dari protein kecil yang disebut ubiquitin (Gambar 92A). Ubiquitin ada dalam sel baik yang bebas atau yang secara kovalen terkait dengan banyak protein intraseluler yang berbeda. Bagi banyak

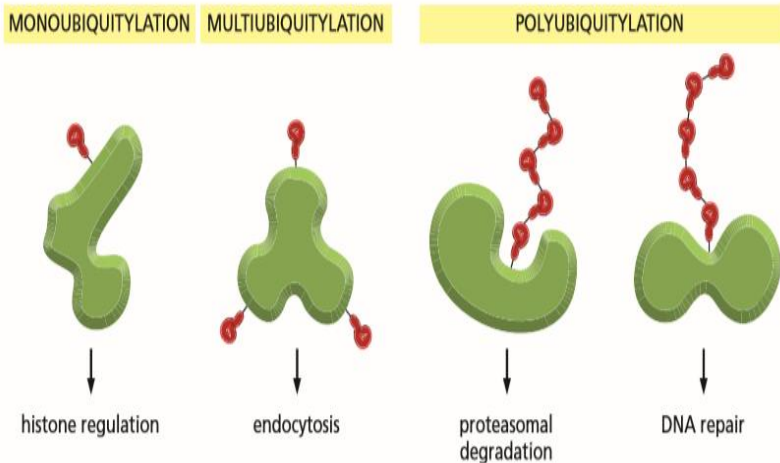
protein, penandaan oleh ubiquitin menghasilkan kehancurannya oleh proteasome. Namun, dalam kasus lain, penandaan ubiquitin memiliki arti yang sama sekali berbeda. Pada akhirnya, jumlah molekul ubiquitin yang ditambahkan dan cara mereka saling terkait yang menentukan bagaimana sel menginterpretasikan pesan ubiquitin (Gambar 93). Pada bagian berikut ini, kami menekankan peran ubiquitylation dalam menandakan degradasi protein





**Gambar 92 Ubiquitin dan penandaan protein dengan rantai polyubiquitin.** (A) Struktur tiga dimensi ubiquitin; protein yang relatif kecil ini mengandung 76 asam amino. (B) C-terminus ubiquitin awalnya diaktifkan melalui hubungan thioester berenergi tinggi dengan rantai samping sistein pada protein E1. Reaksi ini membutuhkan ATP, dan berlangsung melalui perantara AMP-ubiquitin kovalen. Ubiquitin

teraktivasi pada E1, juga dikenal sebagai enzim pengaktivasi ubiquitin, kemudian ditransfer ke sistein pada seperangkat molekul E2. E2 ini ada sebagai kompleks dengan molekul E3 yang bahkan lebih besar. (C) Penambahan rantai polyubiquitin ke protein target. Dalam sel mamalia ada beberapa ratus kompleks E2-E3 yang berbeda, banyak di antaranya mengenali sinyal degradasi spesifik pada protein target melalui komponen E3. E2 disebut enzim konjugasi ubiquitin. E3 telah disebut secara tradisional sebagai ligase ubiquitin, tetapi lebih akurat untuk memesan nama ini untuk kompleks E2-E3 fungsional. Struktur terperinci dari kompleks semacam itu disajikan pada Gambar 3-79.



**Gambar 93 Penandaan protein oleh ubiquitin.** Setiap pola modifikasi yang ditampilkan dapat memiliki arti spesifik bagi sel. Dua jenis poliasinflasi berbeda dalam cara molekul ubiquitin dihubungkan bersama. Keterkaitan melalui Lys48 menandakan degradasi oleh proteasome sedangkan yang melalui Lys63 memiliki arti lain. Tanda-tanda Ubiquitin “dibaca” oleh protein yang secara khusus mengenali setiap jenis modifikasi.

## **Sistem Konjugasi Ubiquitin yang rumit menandai protein untuk kehancuran**

Ubiquitin disiapkan untuk konjugasi dengan protein lain oleh enzim pengaktif ubiquitin-dependent (E1) yang bergantung pada ATP, yang menciptakan ubiquitin teraktivasi, E1 yang selanjutnya ditransfer ke salah satu dari serangkaian enzim ubiquitin-conjugating (E2) (Gambar – 92B). Enzim E2 bekerja bersama dengan protein aksesori (E3). Dalam kompleks E2-E3, yang disebut ubiquitin ligase, komponen E3 berikatan dengan sinyal degradasi spesifik, yang disebut degradasi, dalam substrat protein, membantu E2 untuk membentuk rantai polyubiquitin yang terhubung ke lisin protein substrat. Dalam rantai ini, residu terminal-C dari setiap ubiquitin terkait dengan lisin spesifik dari molekul ubiquitin sebelumnya (lihat Gambar –93), menghasilkan serangkaian linear konjugat ubiquitin-ubiquitin (Gambar – 92C). Rantai polyubiquitin pada protein target inilah yang dikenali oleh reseptor spesifik dalam proteasome. Ada sekitar 30 enzim E2 yang secara struktural serupa tetapi berbeda pada mamalia, dan ratusan protein E3 berbeda yang membentuk kompleks dengan enzim E2 spesifik. Sistem

ubiquitin-proteasome dengan demikian terdiri dari banyak jalur proteolitik yang terorganisir tetapi serupa, yang memiliki kesamaan baik enzim E1 di "atas" dan proteasome di "bawah," dan berbeda dengan komposisi ligases ubiquitin E2-E3 mereka. dan faktor aksesori. Ligase ubiquitin yang berbeda mengenali sinyal degradasi yang berbeda, dan karenanya menargetkan subset berbeda dari protein intraseluler untuk penghancuran

Protein terdenaturasi atau salah lipatan, serta protein yang mengandung asam amino abnormal teroksidasi atau lainnya, diakui dan dimusnahkan karena protein abnormal cenderung hadir pada sekuens asam amino permukaan atau motif konformasi yang dikenal sebagai sinyal degradasi oleh seperangkat molekul E3 di sistem ubiquitin-proteasome; tentu saja urutan ini harus dikubur dan karena itu tidak dapat diakses di bagian normal dari protein ini. Namun, jalur proteolitik yang mengenali dan menghancurkan protein abnormal harus dapat membedakan antara protein lengkap yang memiliki konformasi "salah" dan banyak polipeptida yang tumbuh pada ribosom (serta polipeptida yang baru saja dilepaskan dari ribosom) yang belum mencapai lipatan

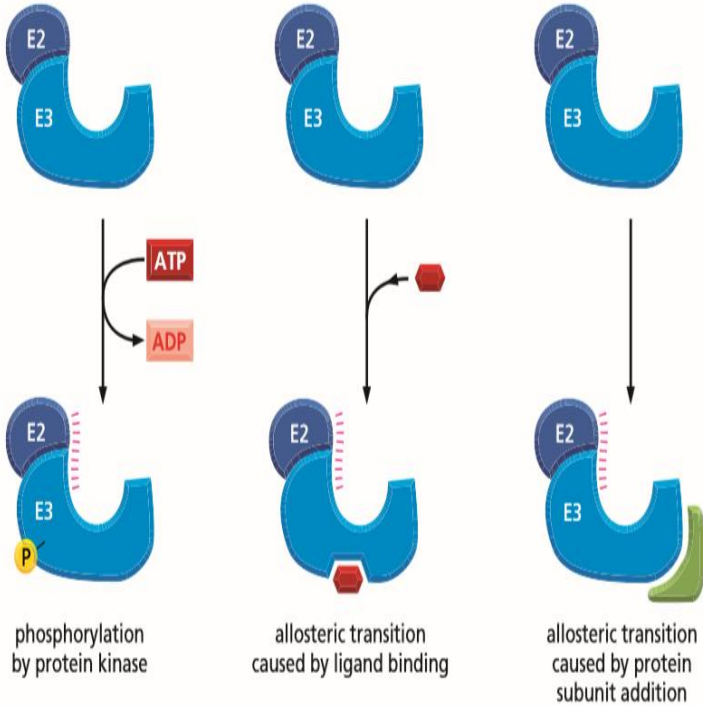
normalnya konformasi. Ini bukan masalah sepele; sistem ubiquitin-proteasome dianggap menghancurkan banyak molekul protein yang baru lahir dan terbentuk bukan karena protein-protein ini tidak normal, tetapi karena mereka secara sementara mengekspos sinyal degradasi yang terkubur dalam keadaan matang (terlipat).

### **Banyak Protein Dikendalikan oleh Penghancuran Teratur**

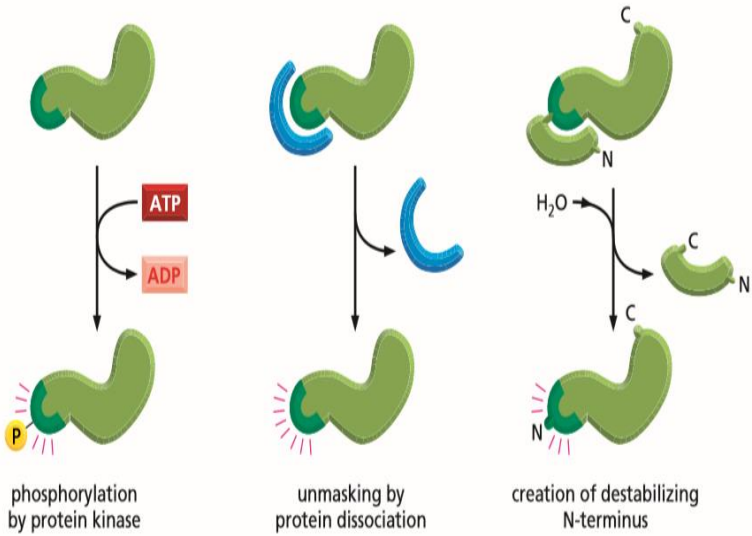
Salah satu fungsi mekanisme proteolitik intraseluler adalah untuk mengenali dan menghilangkan protein yang salah lipatan atau abnormal, seperti yang baru saja dijelaskan. Namun fungsi lain dari jalur proteolitik ini adalah untuk memberikan masa hidup pendek pada protein normal spesifik yang konsentrasinya harus segera berubah dengan perubahan keadaan sel. Beberapa dari protein yang berumur pendek ini terdegradasi dengan cepat setiap saat, sementara banyak yang lainnya berumur pendek secara kondisional, yaitu, mereka stabil secara metabolik dalam beberapa kondisi tetapi menjadi tidak stabil pada perubahan keadaan sel. Sebagai contoh, cyclins mitosis berumur panjang di seluruh siklus sel sampai degradasi mendadak pada akhir

mitosis, seperti dijelaskan dalam Bab 17. Bagaimana penghancuran yang diatur secara teratur terhadap protein dikendalikan? Beberapa mekanisme diilustrasikan melalui contoh spesifik yang muncul kemudian dalam buku ini. Dalam satu kelas umum mekanisme (Gambar 94A), aktivitas ligase ubiquitin diaktifkan baik oleh fosforilasi E3 atau oleh transisi alosterik dalam protein E3 yang disebabkan oleh pengikatannya pada molekul kecil atau besar tertentu. Sebagai contoh, anaphase-promotesive complex (APC) adalah ligase ubiquitin multisubunit yang diaktifkan oleh penambahan subunit yang diatur oleh siklus sel pada mitosis. APC yang teraktivasi kemudian menyebabkan degradasi cyclins mitosis dan beberapa regulator lainnya dari transisi metafase-anafase (lihat Gambar 17-44).

(A) ACTIVATION OF A UBIQUITIN LIGASE



(B) ACTIVATION OF A DEGRADATION SIGNAL



**Gambar 94. Dua cara umum menginduksi degradasi protein tertentu.**

(A) Aktivasi molekul E3 spesifik menciptakan ligase ubiquitin baru. (B) Pembuatan sinyal degradasi terpapar dalam protein yang akan terdegradasi. Sinyal ini mengikat ligase ubiquitin, menyebabkan penambahan rantai polyubiquitin ke lisin terdekat pada protein target. Keenam jalur yang ditunjukkan diketahui digunakan oleh sel untuk menginduksi pergerakan protein terpilih ke dalam proteasome.

Sebagai alternatif, sebagai respons terhadap sinyal intraseluler atau sinyal dari lingkungan, sinyal degradasi dapat dibuat dalam protein, yang menyebabkan ubiquitylation dan penghancurannya yang cepat oleh proteasome. Salah satu cara umum untuk membuat sinyal



seperti itu adalah memfosforilasi situs spesifik pada protein yang membuka kedok sinyal degradasi yang biasanya tersembunyi. Cara lain untuk membuka kedok sinyal tersebut adalah dengan pemisahan subunit protein yang diatur. Akhirnya, sinyal degradasi yang kuat dapat dibuat dengan membelah ikatan peptida tunggal, asalkan belahan ini menciptakan terminal-N baru yang dikenali oleh E3 spesifik sebagai residu terminal-N “destabilisasi” (Gambar 94B).

Jenis sinyal degradasi terminal-N muncul karena “aturan ujung-N,” yang menghubungkan umur protein *in vivo* dengan identitas residu terminal-N-nya. Ada 12 residu destabilisasi dalam aturan N-end dari ragi *S. cerevisiae* (Arg, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Trp, Ile, Asp, Glu, Asn, dan Gln), dari 20 amino standar asam. Residu N-terminal yang tidak stabil dikenali oleh ligase ubiquitin khusus yang dilestarikan dari ragi ke manusia

Seperti yang telah kita lihat, semua protein pada awalnya disintesis mengandung metionin (atau formylmethionine pada bakteri), sebagai residu N-terminalnya, yang merupakan residu penstabil dalam aturan

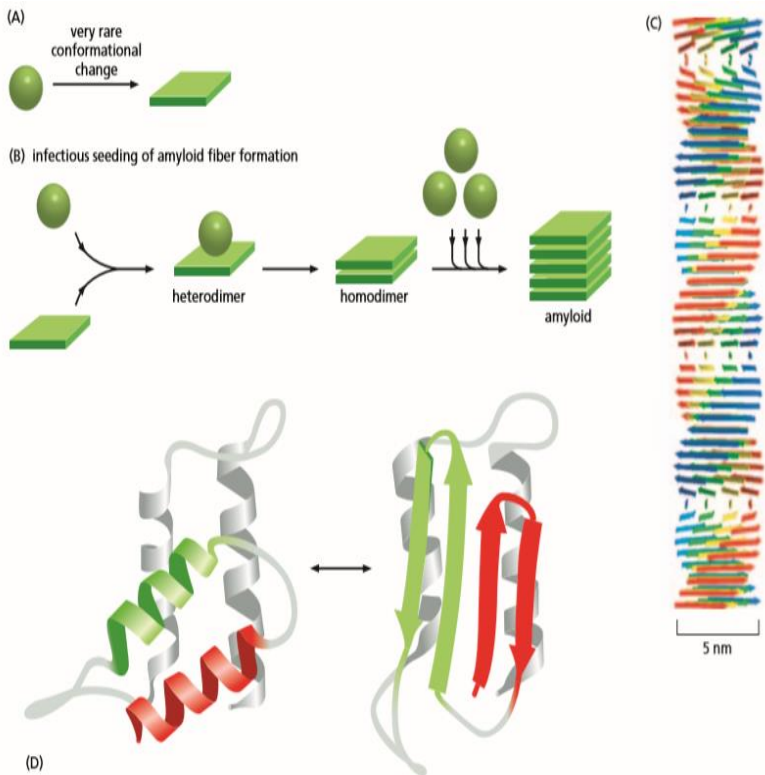
ujung-N. Protease khusus, yang disebut metionin aminopeptidase, akan sering menghilangkan metionin pertama dari protein yang baru lahir, tetapi mereka akan melakukannya hanya jika residu kedua juga stabil menurut aturan ujung N. Oleh karena itu, pada awalnya tidak jelas bagaimana aturan N-end substrat terbentuk *in vivo*. Namun, sekarang dipahami bahwa substrat ini dibentuk oleh protease spesifik situs. Sebagai contoh, suatu subunit kohesin, suatu kompleks protein yang menyatukan kromatid saudara, dibelah oleh protease yang sangat spesifik selama transisi metafase-anafase. Pembelahan yang diatur oleh siklus sel ini memungkinkan pemisahan kromatid saudara perempuan dan mengarah pada penyelesaian mitosis (lihat Gambar 17-44). Fragmen C-terminal dari subunit yang dibelah menghasilkan arginin N-terminal, residu yang tidak stabil dalam aturan ujung-N. Sel mutan yang tidak memiliki jalur aturan ujung-N menunjukkan frekuensi kehilangan kromosom yang sangat meningkat, mungkin karena kegagalan untuk mendegradasi fragmen subunit kohesin ini mengganggu pembentukan kompleks kohesin terkait kromatid baru dalam siklus sel berikutnya.

## **Protein yang Berlipat Tidak Normal Dapat Menyatu untuk Menyebabkan Penyakit Manusia yang Merusak**

Banyak penyakit manusia yang diturunkan (misalnya, anemia sel sabit (lihat hal. 1495) dan defisiensi  $\alpha$ -1-antitripsin, suatu kondisi yang sering mengarah pada penyakit hati dan emfisema) hasil dari protein mutan yang lolos dari kontrol kualitas sel, terlipat secara tidak normal, dan membentuk agregat. Dengan menyerap makromolekul kritis, agregat ini dapat sangat merusak sel dan bahkan menyebabkan kematian sel. Seringkali, pewarisan alel mutan tunggal dari suatu gen dapat menyebabkan penyakit, karena salinan normal gen tidak dapat melindungi sel dari sifat merusak agregat.

Pada manusia normal, penurunan bertahap kontrol kualitas protein sel juga dapat menyebabkan penyakit dengan membiarkan protein normal membentuk agregat (Gambar 95). Dalam beberapa kasus, agregat protein dilepaskan dari sel-sel mati dan menumpuk dalam matriks ekstraseluler yang mengelilingi sel-sel dalam suatu jaringan, dan dalam kasus-kasus ekstrem mereka juga dapat merusak

jaringan. Karena otak terdiri dari kumpulan sel-sel saraf yang sangat terorganisir, maka otak ini sangat rentan. Tidak mengherankan, karena itu, agregat protein terutama menyebabkan penyakit neurodegeneratif. Yang menonjol di antara ini adalah penyakit Huntington dan penyakit Alzheimer — yang terakhir menyebabkan demensia terkait usia pada lebih dari 20 juta orang di dunia saat ini.



**Gambar 95 Agregat Protein yang menyebabkan penyakit pada manusia.** (A) Ilustrasi skematis tentang jenis perubahan konformasi pada protein yang menghasilkan bahan untuk filamen cross-beta. (B) Diagram yang menggambarkan sifat menular diri dari agregasi protein yang merupakan pusat penyakit prion. PrP (protein prion) sangat tidak biasa karena versi protein yang salah lipat, yang disebut PrP \*, menginduksi protein PrP normal yang dihubungi untuk mengubah konformasi, seperti yang ditunjukkan. Sebagian besar penyakit manusia yang disebabkan oleh agregasi protein disebabkan oleh kelebihan protein varian yang cenderung rentan terhadap agregasi, tetapi agregat protein tidak dapat menyebar dari satu hewan ke hewan lain. (C) Menggambar filamen cross-beta, tipe umum dari agregat protein resisten-proteaser yang ditemukan pada banyak penyakit neurologis manusia. Karena interaksi ikatan hidrogen dalam bentuk lembaran antara atom backbone polipeptida (lihat Gambar 3–9), sejumlah protein berlipat yang berbeda dapat menghasilkan struktur ini. (D) Salah satu dari beberapa model yang mungkin untuk konversi PrP ke PrP \*, menunjukkan kemungkinan perubahan dari dua ahelice menjadi empat bstrand. Meskipun struktur protein normal telah ditentukan secara akurat, struktur bentuk infeksi belum diketahui dengan pasti karena agregasi telah mencegah penggunaan teknik struktur standar. (C, milik Louise Serpell, diadaptasi dari M. Sunde et al., *J. Mol. Biol.* 273: 729-739, 1997. Dengan izin dari Academic Press; D, diadaptasi dari SB Prusiner, *Trends Biochem. Sci.* 21 : 482–487, 1996. Dengan izin dari Elsevier.)

Agar suatu jenis agregat protein tertentu dapat bertahan hidup, tumbuh, dan merusak suatu organisme, ia harus sangat tahan terhadap proteolisis baik di dalam maupun di luar sel. Banyak agregat protein yang menyebabkan masalah membentuk fibril yang dibangun dari

serangkaian rantai polipeptida yang berlapis-lapis sebagai tumpukan b lembar terus menerus. Ini disebut cross-beta filament (Gambar 95C), struktur yang sangat resisten terhadap proteolisis, diamati pada banyak gangguan neurologis yang disebabkan oleh agregat protein, di mana ia menghasilkan endapan pewarnaan yang dikenal sebagai amiloid.

Satu variasi khusus dari patologi ini telah mencapai ketenaran khusus. Ini adalah penyakit prion. Tidak seperti Huntington atau Alzheimer, penyakit prion dapat menyebar dari satu organisme ke organisme lain, asalkan organisme kedua memakan jaringan yang mengandung agregat protein. Serangkaian penyakit - disebut scrapie pada domba, Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) pada manusia, dan bovine spongiform encephalopathy (BSE) pada sapi - disebabkan oleh bentuk protein yang disebut protein PrP (untuk prion protein). PrP biasanya terletak di permukaan luar membran plasma, paling menonjol di neuron.

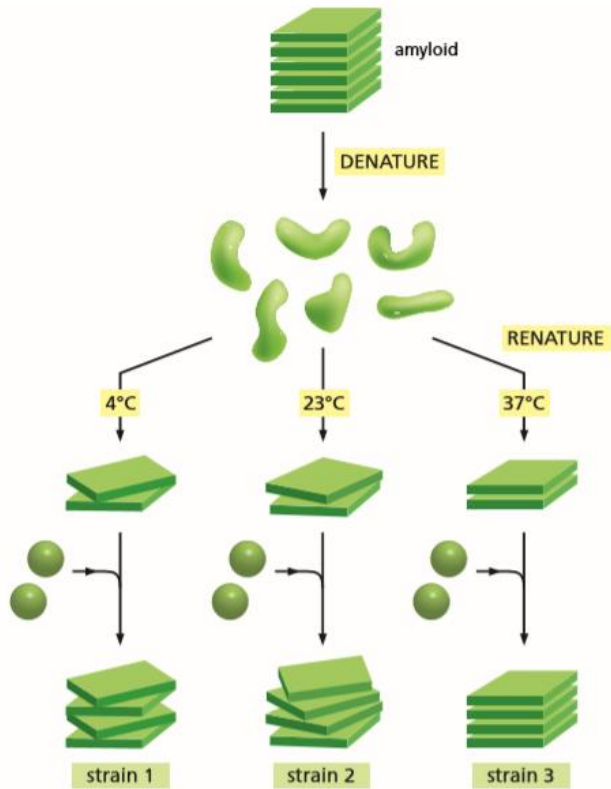
Fungsi normalnya tidak diketahui. Namun, PrP memiliki sifat malang yang dapat dikonversi menjadi konformasi abnormal yang sangat khusus (lihat Gambar

95A). Konformasi ini tidak hanya membentuk filamen cross-beta yang resistan terhadap protease; itu juga “menular” karena mengubah molekul PrP yang biasanya terlipat menjadi bentuk patologis yang sama. Properti ini menciptakan loop umpan balik positif yang menyebarkan bentuk PrP yang abnormal, yang disebut PrP\* (lihat Gambar 95B) dan dengan demikian memungkinkan konformasi patologis menyebar dengan cepat dari sel ke sel di otak, akhirnya menyebabkan kematian pada hewan dan manusia. . Bisa berbahaya memakan jaringan hewan yang mengandung PrP\*, seperti yang disaksikan oleh penyebaran BSE (umumnya disebut sebagai "penyakit sapi gila") dari sapi ke manusia di Inggris Raya. Untungnya, dengan tidak adanya PrP\*, PrP sangat sulit untuk dikonversi ke bentuk abnormal.

Meskipun sangat sedikit protein yang berpotensi meleset menjadi konformasi infeksius, contoh lain menyebabkan “pewarisan khusus protein” yang dinyatakan misterius dalam sel ragi. Kemampuan untuk mempelajari protein menular dalam ragi telah mengklarifikasi fitur prion yang luar biasa lainnya. Molekul protein ini dapat

membentuk beberapa jenis agregat yang berbeda dari rantai polipeptida yang sama. Selain itu, setiap jenis agregat dapat menular, memaksa molekul protein normal untuk mengadopsi jenis struktur abnormal yang sama. Dengan demikian, beberapa “strain” partikel infeksi yang berbeda dapat muncul dari rantai polipeptida yang sama (Gambar 96). Bagaimana urutan polipeptida tunggal dapat mengadopsi berbagai bentuk agregat tidak sepenuhnya dipahami; adalah mungkin bahwa semua agregat prion menyerupai filamen cross-beta (lihat Gambar 95C) di mana struktur disatukan terutama dengan interaksi rantai peptida utama. Ini akan membuat rantai samping asam amino bebas untuk mengadopsi konformasi yang berbeda dan, jika struktur berkembang biak sendiri, keberadaan strain yang berbeda dapat dijelaskan.





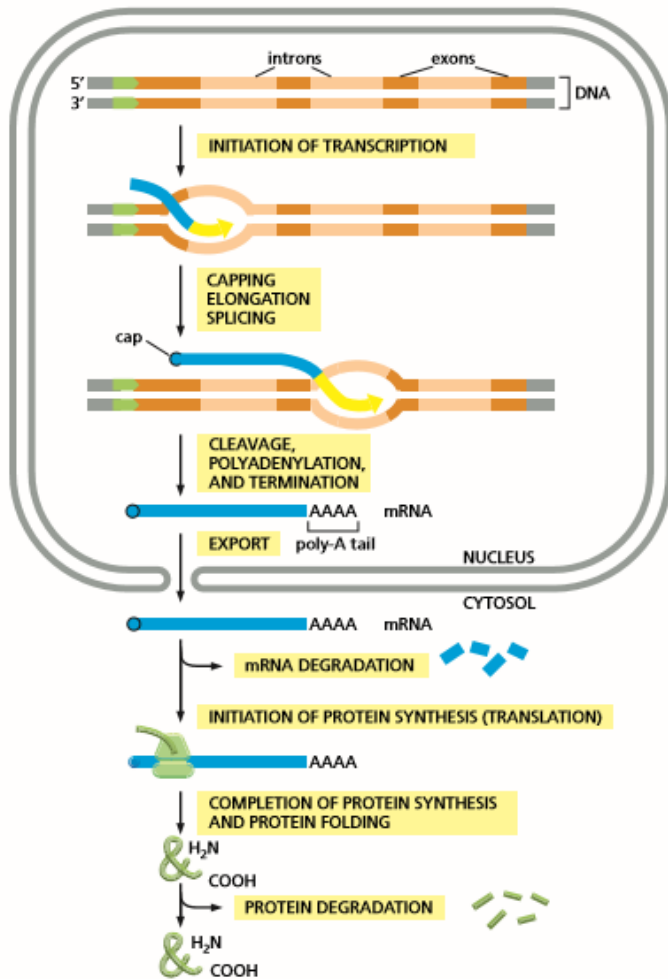
**Gambar 96 Pembuatan berbagai prion strainsin vitro.** Dalam percobaan ini, serat amiloid didenaturasi dan komponennya dinenaturasi pada suhu yang berbeda. Perawatan ini menghasilkan tiga jenis amiloid yang berbeda, yang masing-masingnya dapat berkembang biak sendiri ketika subunit baru ditambahkan.

Akhirnya, meskipun prion ditemukan karena menyebabkan penyakit, mereka juga tampaknya memiliki beberapa peran positif dalam sel. Sebagai contoh, beberapa

spesies jamur menggunakan transformasi prion untuk membangun berbagai jenis sel. Meskipun idenya kontroversial, bahkan telah diusulkan bahwa prion memiliki peran dalam mengkonsolidasikan ingatan dalam organisme multiseluler yang kompleks seperti kita.

### **Ada Banyak Langkah Dari DNA ke Protein**

Kita telah melihat sejauh ini dalam bab ini bahwa berbagai jenis reaksi kimia diperlukan untuk menghasilkan protein yang terlipat dengan baik dari informasi yang terkandung dalam gen (Gambar 97). Tingkat terakhir dari protein yang terlipat dengan baik dalam sel karena itu tergantung pada efisiensi yang dilakukan masing-masing dari banyak langkah yang dilakukan.



**Gambar 97 Produksi protein oleh sel eukariotik.** Tingkat akhir dari setiap protein dalam sel eukariotik tergantung pada efisiensi setiap langkah yang digambarkan

Dalam bab berikut, kita akan melihat bahwa sel memiliki kemampuan untuk mengubah kadar protein mereka sesuai dengan kebutuhan mereka. Pada prinsipnya, setiap atau semua langkah pada Gambar 97 dapat diatur untuk setiap protein individu. Seperti yang akan kita lihat di Bab 7, ada contoh regulasi di setiap langkah dari gen menjadi protein. Namun, inisiasi transkripsi adalah titik paling umum bagi sel untuk mengatur ekspresi masing-masing gennya. Ini masuk akal, karena cara yang paling efisien untuk menjaga agar gen tidak diekspresikan adalah dengan memblokir langkah pertama — transkripsi urutan DNA-nya menjadi molekul RNA

### *Ringkasan*

*Penerjemahan urutan nukleotida molekul mRNA menjadi protein berlangsung di sitoplasma pada rakitan ribonukleoprotein besar yang disebut ribosom. Asam amino yang digunakan untuk sintesis protein pertama kali melekat pada keluarga molekul tRNA, yang masing-masing mengakui, melalui interaksi pasangan-basa komplementer, set khusus tiga nukleotida dalam mRNA (kodon).*

*Urutan nukleotida dalam mRNA kemudian dibaca dari satu ujung ke ujung lainnya dalam set tiga sesuai dengan kode genetik.*

*Untuk memulai penerjemahan, subunit ribosom kecil berikatan dengan molekul mRNA pada kodon awal (AUG) yang dikenali oleh molekul inisiator tRNA yang unik. Subunit ribosom yang besar mengikat untuk melengkapi ribosom dan memulai sintesis protein. Selama fase ini, aminoasil-tRNA — masing-masing mengandung asam amino spesifik — berikatan dengan kodon yang sesuai dalam mRNA melalui pasangan basa pelengkap antara antikodon tRNA dan kodon mRNA. Setiap asam amino ditambahkan ke ujung terminal-C polipeptida yang tumbuh dalam empat langkah berurutan: ikatan aminoasil-tRNA, diikuti oleh pembentukan ikatan peptida, diikuti oleh dua langkah translokasi ribosom. Faktor perpanjangan menggunakan hidrolisis GTP untuk mendorong reaksi ini ke depan dan untuk meningkatkan akurasi pemilihan asam amino. Molekul mRNA memajukan kodon demi kodon melalui ribosom dalam arah 5' ke-3' hingga mencapai salah satu dari tiga kodon stop. Faktor pelepasan kemudian mengikat ke ribosom, mengakhiri terjemahan dan melepaskan polipeptida yang telah selesai.*

*Ribosom eukariotik dan bakteri terkait erat, meskipun terdapat perbedaan dalam jumlah dan ukuran rRNA dan komponen proteinnya. RRNA memiliki peran dominan dalam penerjemahan, menentukan struktur keseluruhan ribosom, membentuk situs pengikatan tRNA, mencocokkan tRNA untuk kodon dalam mRNA, dan menciptakan situs aktif enzim peptidil transferase yang menghubungkan asam amino bersama selama penerjemahan.*

*Dalam langkah-langkah akhir sintesis protein, dua tipe pendamping molekul yang berbeda memandu lipatan rantai polipeptida. Chaperone ini, yang dikenal sebagai Hsp60 dan Hsp70, mengenali bercak hidrofobik yang terpapar pada protein dan berfungsi untuk mencegah agregasi protein yang sebaliknya akan bersaing dengan pelipatan protein yang baru disintesis menjadi konformasi tiga dimensi yang benar. Proses pelipatan protein ini juga harus bersaing dengan mekanisme kontrol kualitas yang rumit yang menghancurkan protein dengan tambalan hidrofobik yang tidak normal. Dalam hal ini, ubiquitin secara kovalen ditambahkan ke protein yang dilipat oleh ligase ubiquitin, dan rantai polyubiquitin yang dihasilkan dikenali oleh tutup pada proteasome yang menggerakkan seluruh protein ke bagian dalam*

*proteasome untuk degradasi proteolitik. Mekanisme proteolitik yang terkait erat, berdasarkan sinyal degradasi khusus yang dikenali oleh ligase ubiquitin, digunakan untuk menentukan masa hidup banyak protein yang biasanya terlipat. Dengan metode ini, protein normal yang dipilih dikeluarkan dari sel sebagai respons terhadap sinyal tertentu*

## **Referensi**

1. Core LJ, Waterfall JJ, Gilchrist DA, et al. Defining the status of RNA polymerase at promoters. *Cell Rep.* 2012;2(4):1025–1035. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.034. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138–163. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature.* 1970;227(5258):561–563. doi: 10.1038/227561a0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Davis R, Shi Y. The polyadenylation code: a unified model for the regulation of mRNA alternative polyadenylation. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2014;15(5):429–

437. doi: 10.1631/jzus.B1400076. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Guertin MJ, Lis JT. Mechanisms by which transcription factors gain access to target sequence elements in chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(2):116–123. doi: 10.1016/j.gde.2012.11.008. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Guo J, Garrett M, Micklem G, et al. Poly(A) signals located near the 5' end of genes are silenced by a general mechanism that prevents premature 3'-end processing. *Mol Cell Biol.* 2011;31(4):639–651. doi: 10.1128/MCB.00919-10. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Guo J, Price DH. RNA polymerase II transcription elongation control. *Chem Rev.* 2013;113(11):8583–8603. doi: 10.1021/cr400105n. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Houseley J, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell.* 2009;136(4):763–776. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.019. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Kornberg RD. The molecular basis of eukaryotic transcription. *PNAS.* 2007;104(32):12955–12961. doi:



10.1073/pnas.0704138104. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

10. Kwak H, Fuda NJ, Core LJ, et al. Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science*. 2013;339(6122):950–953.

doi: 10.1126/science.1229386. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

11. Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 2013;152(6):1237–1251. doi:

10.1016/j.cell.2013.02.014. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

12. Liu H, Luo M, Wen JK. mRNA stability in the nucleus. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2014;15(5):444–

454. doi: 10.1631/jzus.B1400088.[[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

13. Liu RD, Wu J, Shao R, et al. Mechanism and factors that control HIV-1 transcription and latency activation. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2014;15(5):455–465. doi:

10.1631/jzus.B1400059. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

14. Ma RG, Zhang Y, Sun TT, et al. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *J*

- Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 2014;15(5):412–428. doi: 10.1631/jzus.B1400077. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell*. 2009;138(4):673–684. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.016. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Proudfoot N. Poly(A) signals. *Cell*. 1991;64(4):671–674. doi: 10.1016/0092-8674(91)90495-K. [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Richard P, Manley JL. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev*. 2009;23(11):1247–1269. doi: 10.1101/gad.1792809. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Shatkin AJ. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*. 1976;9(4):645–653. doi: 10.1016/0092-8674(76)90128-8. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Tian B, Manley JL. Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(6):312–320. doi: 10.1016/j.tibs.2013.03.005. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

20. Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 2011;144(6):940–954. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.032. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Zhai LT, Xiang S. mRNA quality control at the 5' end. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2014;15(5):438–443. doi: 10.1631/jzus.B1400070. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Zhou Q, Li T, Price DH. RNA polymerase II elongation control. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):119–143. doi: 10.1146/annurev-biochem-052610-095910. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

## **Pertanyaan**

1. Apa yang dimaksud Central Dogma ?
2. Apa yang dimaksud transkripsi dan translasi ?
3. Sebutkan tahapan proses transkripsi dan translasi ?
4. Sebutkan Contoh proses transkripsi dan translasi ?
5. Apa yang dimaksud potensi central dogma dalam penerapan bioteknologi ?