

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Ribosoomi modifikatsiooniensoümide RlmB ja RlmN tähtsus

Bakalaureusetöö

12 EAP

Varvara Maksimtšuk

Juhendaja PhD Rya Ero

TARTU 2023

INFOLEHT

Ribosoomi modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN tähtsus

Varvara Maksimtšuk

Organismi valgusünteesi aparaat ehk ribosoom koosneb kahest subühikust: väike ja suur subühik, vastavalt 30S ja 50S bakterites. 50S subühiku koosseisu kuuluva 23S ribosomaalse RNA (rRNA) domeen V moodustab valgusünteesi ehk translatsiooni seisukohast kõige olulisema ribosoomi regiooni, peptidüültransferaasi keskuse (PTC), mis vastutab peptiidsideme sünteesimise eest valgusünteesil. Enamus rRNA modifikatsioone on koondunud PTC ümbrusesse ning need katalüüsitakse post-transkriptsiooniliselt spetsiaalsete ensüümide poolt. Individuaalsete modifikatsioonide funktsioon ja olulisus ei ole enamasti teada. Käesoleva töö raames hinnati *Escherichia coli* PTC regiooni modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN mõju rakkude kasvule, ribosoomide biogeneesile ja funktsioneerimisele kasutades tüvesid, millest on deleteeritud kõik PTC regiooni modifitseerivad ensüümid.

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees.

Märksõnad: *Escherichia coli* ribosoom, 23S rRNA modifikatsioonid, rRNA metüültransferaasid, PTC

Importance of ribosome modification enzymes RlmB and RlmN

Varvara Maksimtšuk

In every organism, protein synthesis is carried out by the ribosome, which is composed of two subunits, the small and the large subunit, in bacteria, 30S and 50S, respectively. Domain V of the 23S ribosomal RNA (rRNA) from the large subunit forms the most important region of the ribosome, the peptidyl transferase center (PTC). It is responsible for catalyzing the synthesis of peptide bonds between the amino acids of the nascent proteins. Most of the rRNA modifications are concentrated around the PTC and catalyzed post-transcriptionally by specific enzymes. In most cases, the importance of individual modifications is unknown. Within the scope of this work, the effects of *Escherichia coli* modification enzymes RlmB and RlmN on cell growth, ribosome biogenesis, and functioning were evaluated using multideletion strains, where the enzymes modifying the PTC region were deleted.

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis.

Keywords: *Escherichia coli* ribosome, 23S rRNA modifications, rRNA methyltransferases, PTC

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1. Bakteriaalse ribosoomi struktuur, funktsioon ja biosüntees.....	7
2. Ribosomaalse RNA modifikatsioonide süntees ja tähtsus bakteris.....	10
3. Ribosomaalse RNA metüültransferaasid.....	15
3.1 Metüültransferaas RlmB (Gm2251).....	15
3.2 Metüültransferaas RlmN (m ² A2503)	17
EKSPERIMENTAALOSA	20
1. Töö eesmärk	20
2. Materjal ja meetodika.....	20
2.1 <i>Escherichia coli</i> tüved ja plasmiidid	20
2.2 Praimerid	21
2.3 Söötmed ja puhvrid	21
2.4 RlmB ja RlmN mutagenees.....	22
2.5 Kemokompetentsete Δ 10 rakkude valmistamine	23
2.6 Bakterite kasvukõverate ja poolestusaja määramine.....	23
2.7 Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendis tsentrifuugimisega.....	24
2.8 rRNA nukleosiidse koostise analüüsimine RP-HPLC-ga	25
2.9 23S rRNA 5' otsa määramine praimer-ekstensiooniga	25
2.10 <i>In vivo</i> translatsioon	26
3. Tulemused ja arutelu	26
3.1 RlmB ja RlmN mutagenees.....	26
3.2 Mutageneesi mõju RlmB ja RlmN aktiivsusele	28
3.3 Modifikatsiooniensüüme RlmB ja RlmN mõju rakkude kasvule	30
3.4 Modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN mõju ribosoomide biogeneesile	34

3.5 Modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN mõju translatsioonile.....	40
KOKKUVÕTE	43
SUMMARY	45
KASUTATUD KIRJANDUS	47
LIHTLITSENTS.....	52

KASUTATUD LÜHENDID

30S – väike ribosoomi subühik bakteris

50S – suur ribosoomi subühik bakteris

70S – bakteriaalne ribosoom

CAM – klooramfenikool

DPM – lagunemine minutis (*decay per minute*)

HPLC – kõrgjõudlusega vedelkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*)

K_m – kanamütsiin

mRNA – informatsiooni ehk matriits RNA

nm – nanomeeter

OD – optiline tihedus (*optical density*)

PTC – peptüültransferaasi keskus (*peptidyltransferase center*)

RlmB – rRNA suure subühiku metüültransferaas B (*rRNA large subunit methyltransferase B*)

RlmN – rRNA suure subühiku metüültransferaas N (*rRNA large subunit methyltransferase N*)

rpm – pööret minutis (*rotations per minute*)

rRNA – ribosomaalne RNA

tRNA – transport RNA

U – ühik (*unit*)

WT – metsiktüüp (ingl. k *wildtype*)

Δ10 – delta 10; antud töös kasutatud *Escherichia coli* mitmikdeletsiooni tüvi

Δ9 – delta 9; antud töös kasutatud *Escherichia coli* mitmikdeletsiooni tüvi

SISSEJUHATUS

Ribosoomid mängivad tähtsat rolli kõikides elusorganismides. Nimelt dekodeerivad need kompleksid mRNA järjestuse valkude aminohappeliseks järjestuseks ja katalüüsivad peptiidideme moodustumist aminohapete vahel kasvavas valguahelas. Eelnimetatud funktsioone viivad läbi ribosoomi erinevad subühikud, bakterites vastavalt väike ehk 30S ja suur ehk 50S subühik. Kokku moodustavad kaks subühikut funktsionaalse terviku, 70S ribosoomi, mis vastutab valgusünteesi ehk translatsiooni läbiviimise eest. Bakteriaalse ribosoomi moodustavad kolm erinevat ribosomaalset RNA-d (rRNA) (23S rRNA ja 5S rRNA suure subühikus ning 16S rRNA väikses subühikus) ja 54 ribosomaalset valku (r-valku) (Ban *et al.*, 2000; Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). rRNA modifitseeritakse ribosoomide biogeneesi käigus spetsiaalsete modifikatsioonientsüümide poolt.

Escherichia coli (*E. coli*) 70S ribosoomist on leitud 36 rRNA modifikatsiooni, millest enamik on koondunud 23S rRNA V domeenis asuvasse peptidüültransferaasi keskuse (PTC) vahetuslähedusse. Kuigi individuaalsetel modifikatsioonidel on üldiselt väike mõju ribosoomidele, on nende summaarne mõju organismile suur. Ilma modifikatsioonideta on valkude süntees ja seeläbi organismi enda areng häiritud (Decatur & Fournier, 2002; Chow *et al.*, 2007).

Meie laboris on konstrueeritud *E. coli* $\Delta 10$ tüvi, millest on eemaldatud kõik 23S rRNA V domeeni modifikatsioonientsüümid (teadaolevate geenidega), mistõttu on antud tüvi heaks mudeliks üksikute modifikatsioonide uurimisel.

Antud bakalaureusetöö kirjanduse osas antakse ülevaade bakteriaalsest ribosoomist, täpsemalt räägitakse 23S rRNA-st ja seal esinevatest modifikatsioonidest ning vastavatest modifikatsioonientsüümidest. Keskendutakse metüültransferaaside RlmB ja RlmN tähtsusele *Escherichia coli*'s. Eksperimentaalselt analüüsitakse natiivsete ja katalüütiliselt inaktiivsete modifikatsioonientsüümide RlmB ja RlmN mõju rakkude kasvule erinevatel temperatuuridel, ribosoomide biogeneesile ja funktsioneerimisele *in vivo*.

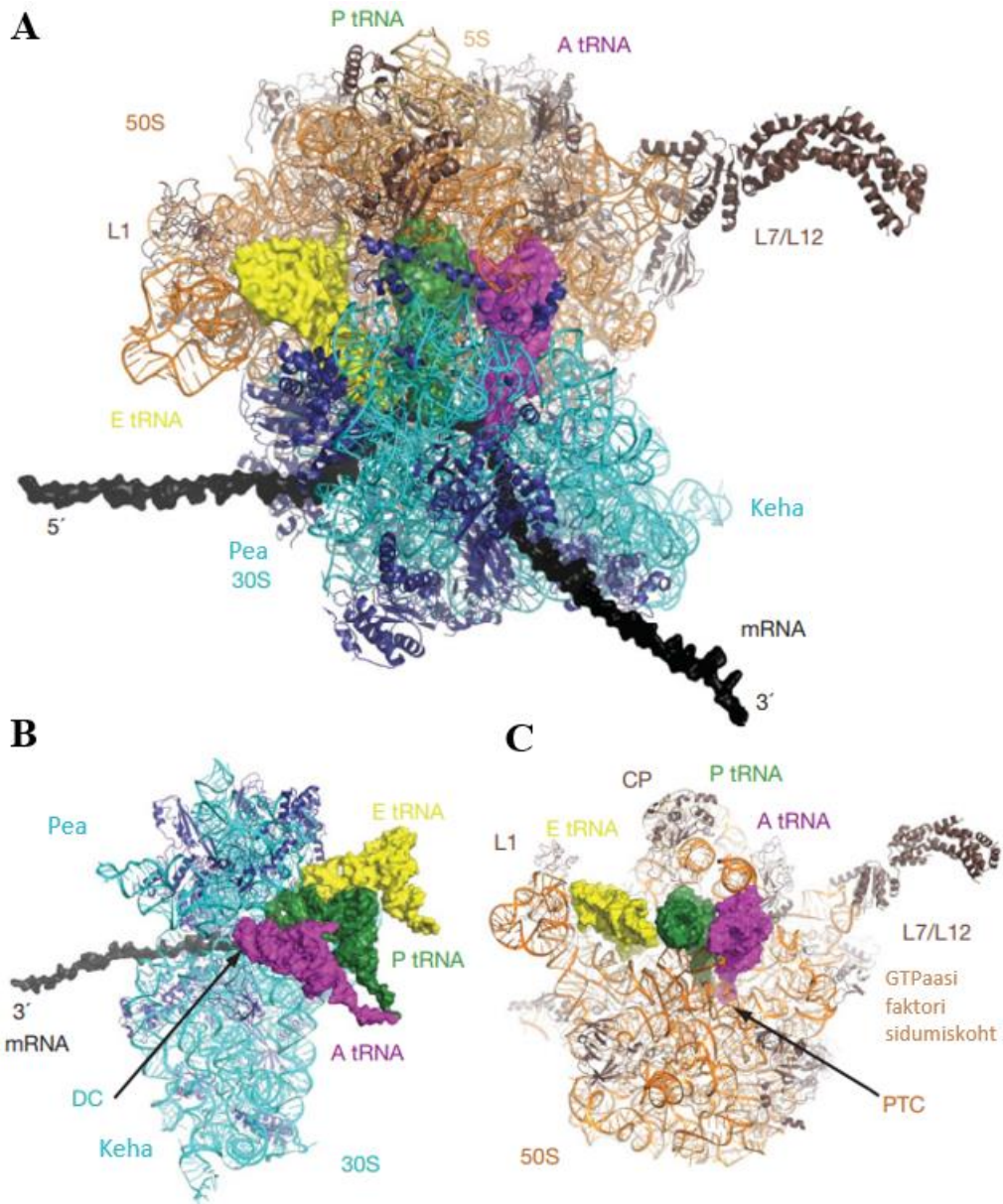
Uurimistöö üldeesmärgiks on hinnata modifikatsioonientsüümide RlmN ja RlmB ning nende poolt sünteesitud modifikatsioonide olulisust bakteri elulemusele.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Bakteriaalse ribosoomi struktuur, funktsioon ja biosüntees

Ribosoom on üks tähtsamaid raku makromolekulaarseid komplekse, mille ülesandeks on valgusüntees ehk translatsioon. Kõikides organismides koosneb translatsiooni läbiviiv kompleks (70S ribosoom bakteris) (joonis 1A) kahest ebavõrdsest subühikust, bakterites on nendeks väike ehk 30S ja suur ehk 50S subühik (Ban *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001). S täht subühikute nimetuses on Svedbergi sedimentatsiooni ühik, mis näitab partikli sadestumise kiirust ja seeläbi annab ettekujutuse osakese suurusest. Ribosoomi subühikud koosnevad ribosomaalsest RNA-st (rRNA), mis moodustab ligikaudu 2/3 kogu ribosoomi massist, ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud). Peptidüültransferaasne aktiivsus on rRNA-l ning r-valkudel on pigem struktuurne funktsioon (Ban *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001).

Väike subühik (30S) koosneb 16S rRNA-st ning 21 r-valgust. Ribosomaalseid valke väikeses subühikus nimetatakse S-valkudeks (S1-S21) (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007; Wilson & Nierhaus, 2007). Tertsiaarstruktuuri põhjal jaotub 30S subühik kolmeks regiooniks, milleks on pea, keha ja platvorm (joonis 1B), kusjuures valgud ja rRNA ei jaotu ribosoomi väikeses subühikus ühtlaselt (Wimberly *et al.*, 2000). Valgud on koondunud pigem subühiku välispinnale ning rRNA paikneb pigem tsentraalselt ja moodustab subühikutevahelise pinna. 30S subühikut moodustav 16S rRNA jaotub oma sekundaarstruktuuri põhjal neljaks domeeniks (5', tsentraalne, 3' mažoorne ja 3' minoorne) ja vastutab geneetilise informatsiooni dekodeerimise eest. (Melnikov *et al.*, 2012; Noller & Woese, 1981; Wimberly *et al.*, 2000) Dekodeerimiskeskus asub 30S pea ja keha vahel olevas regioonis, mis interakteerub 50S subühikuga (Wimberly *et al.*, 2000). Translatsiooni initsiatsiooni käigus 16S rRNA 3' otsas paiknev anti Shine-Dalgarno järjestus interakteerub mRNA Shine-Dalgarno järjestusega (Shine & Dalgarno, 1974). Translatsiooni elongatsiooni käigus vastutab 30S dekodeeriv keskus korrektse paardumise eest mRNA koodonite ja tRNA anti-koodonite vahel ning tagab seeläbi valgusünteesi täpsuse (Wimberly *et al.*, 2000).



Joonis 1. *Escherichia coli* 70S ribosoomi ning 50S ja 30S subühikute tertsiarsed struktuurid. Paneelil A on 70S ribosoom. Paneelil B on 30S subühik, kus tumesinisega on märgistatud r-valgud ja helesinisega rRNA. Paneelil C on 50S subühik. Pruuniga on märgistatud r-valgud ja oranžiga rRNA. Roosaga on välja toodud A-saidis asuv aminoatsüül-tRNA. Rohelisega on märgistatud P-saidis asuv peptidüül-tRNA. Kollasega on märgistatud E-saidi deatsetüleeritud-tRNA. mRNA on märgistatud halli ja mustaga. Lisaks on tähistatud struktuursed regioonid ja dekodeeriv (DC) ning peptidüültransferaasi keskus (PTC). Joonis kohandatud (Schmeing & Ramakrishnan, 2009).

Suur subühik (50S) koosneb 23S ja 5S rRNA-st ning 33 r-valgust (joonis 1C). Suures subühikus nimetatakse ribosomaalseid valke L-valkudeks (L1-L36) (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007; Wilson & Nierhaus, 2007). Valgud paiknevad pigem 50S subühiku välispinnal ning subühikutevaheline regioon koosneb peamiselt rRNA-st. 50S subühiku saab jaotada struktuuri järgi erinevateks regioonideks: L1 kühmüks, L7/L12 kühmüks ja tsentraalseks protuberantsiks (joonis 1C) (Melnikov *et al.*, 2012; Noller, 2005). Suure subühiku moodustav 23S rRNA jaotub

sekundaarstruktuuri põhjal seitsmeks domeeniks (0-VI), kusjuures 5S rRNA-d peetakse kaheksandaks (Noller, 2005; Petrov *et al.*, 2013). 23S rRNA domeen V moodustab funktsionaalselt olulise regiooni, peptidüültransferaasi keskuse (PTC). Olulised 23S rRNA domeen V komponendid PTC moodustumisel on A-ling (vastutab aminoatsüül-tRNA 3' CCA otsa korrektse seondumise eest PTC-s), P-ling (vastutab peptidüül-tRNA 3' CCA otsa korrektse seondumise eest PTC-s) ning adenosiin-2451 (A2451, oluline nukleosiid peptidüültransferaasi reaktsiooni toimumiseks) (Brimacombe & Stiege, 1985; Yusupov *et al.*, 2001).

70S ribosoomi funktsiooniks on valkude sünteesimine ehk translatsioon (Selmer *et al.*, 2006; Voorhees *et al.*, 2009; Yusupov *et al.*, 2001). Ribosoomil on subühikutevahelises regioonis kolm tRNA seondumise saiti, mis on nimetatud vastavalt seal paikneva tRNA järgi, ning mRNA tunnel (joonis 1A). A-saiti seondub aminohappega laetud aminoatsüül-tRNA (A-tRNA), P-saidis paikneb kasvavat valguaahelat kandev peptidüül-tRNA (P-tRNA) ning E-saidi kaudu väljub pärast peptiidsideme sünteesi deatsüleeritud-tRNA (Ramakrishnan, 2002; Yusupov *et al.*, 2001). Translatsioonil kasutatakse matriitsiks mRNA-d, mille DNA-lt kopeeritud informatsiooni transleerib ribosoom valkude aminohappeliseks järjestuseks. Ribosoomi kasutab transleerimiseks adaptormolekulidena transpordi RNA-sid (tRNA-sid), mis on laetud nende anti-koodonitele vastavate aminohapetega aminoatsüül-tRNA süntetaaside poolt. Seega, tRNA abil tuuakse ribosoomi kohale mRNA kolmele nukleotiidile ehk ühele koodonile vastav aminohape (R. Green & Noller, 1997; Ramakrishnan, 2002). Translatsioon jaguneb kolmeks etapiks: initsatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Translatsiooni initsiatsiooni käigus seondub mRNA 30S subühikuga Shine-Dalgarno järjestuse vahendusel ning initsiaatorkoodoni tunneb ära formüülmetioniiniga (fMet) laetud initsiaator-tRNA (Schmeing & Ramakrishnan, 2009). Seejärel liitub 50S subühik moodustades 70S ribosoomi, kus fMet-tRNA paikneb P-saidis, ning translatsioon saab alata. Translatsiooni elongatsiooni käigus seondub A-saiti koodonile vastava aminohappega laetud aminoatsüül-tRNA (R. Green & Noller, 1997; Ramakrishnan, 2002; Schmeing & Ramakrishnan, 2009). 50S subühiku PTC regioon vastutab P- ja A-saidis paiknevate tRNA-de 3' CCA otsade korrektse positsioneerimise eest üksteise suhtes, mis on hädavalik peptiidsideme sünteesiks (Brimacombe & Stiege, 1985; Kim & Green, 1999). Kasvav peptiidahel kantakse üle P-saidis paiknevalt tRNA-lt A-saidis paiknevale, samaaegselt toimub tRNA-de ja mRNA liikumine ribosoomi suhtes ühe koodoni võrra (translokatsioon) paljastades A-saidis järgmise koodoni. Deatsüleeritud-tRNA väljub E-saidi kaudu ribosoomist. Seejärel protsess kordub järgmisele koodonile vastava aminoatsüleeritud-tRNA-ga (Ramakrishnan, 2002; Schmeing & Ramakrishnan, 2009). Sünteesitava valguga väljumine toimub läbi peptiidi väljumistunneli, mis asub PTC kõrval.

Elongatsioonitsükli korralduseks kuni A-saiti ilmub stopp-koodon ning valgusüntees termineeritakse (Noller, 2005; Ramakrishnan, 2002). Igat translatsiooni etappi aitavad läbi viia valgulised translatsioonifaktorid (Melnikov *et al.*, 2012; Noller, 2005).

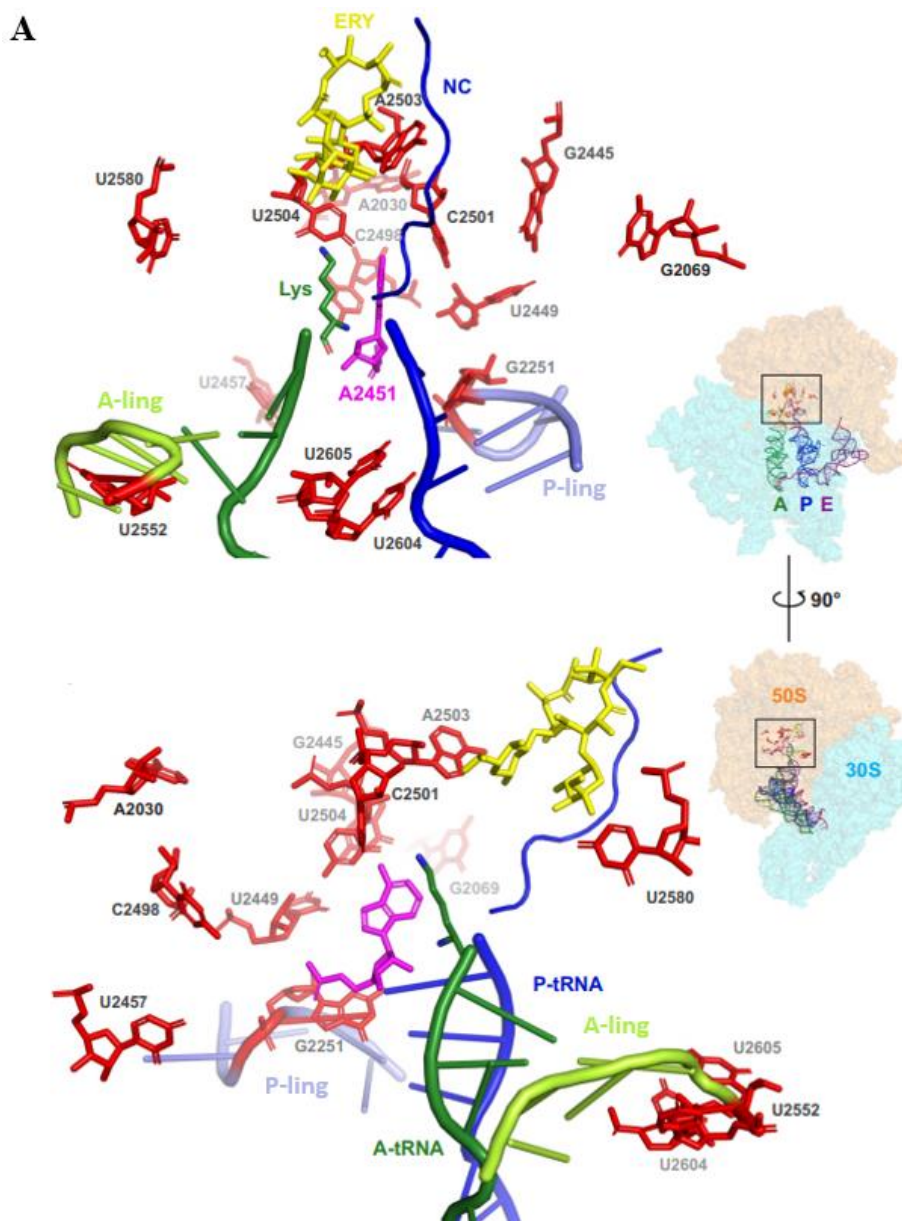
Ribosoomi biosüntees on protsess, mille jooksul sünteesitakse 30S ja 50S subühikuid ning lõpuks assotsieeritakse terviklik 70S ribosoom. Selleks peavad rRNA ja r-valgud järk-järgult üksteisega seonduma, mille käigus toimuvad konformatsioonilised muutused ning subühikud saavutavad iseloomuliku kuju ja suuruse. Mõlema subühiku rRNA sünteesitakse ühtse primaarse transkriptina ja assambleerimine r-valkudega algab juba transkriptsiooni käigus (Besançon & Wagner, 1999; Lewicki *et al.*, 1993; Srivastava & Schlessinger, 1990). Ribosomaalsed valgud tunnevad ära ja seonduvad transkribeeritava rRNA sekundaarstruktuuridega. Lisaks vajab rRNA korrektse struktuuri saavutamiseks teisi valgulisi faktoreid nagu RNA šaperonid ja helikaasid ning ribosoom-sõltuvad GTPaasid (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). Paralleelselt toimub rRNA otste protsessimine RNAaside poolt ning kindlate positsioonide modifitseerimine spetsiaalsete modifikatsiooniensüümide poolt, nii rRNA protsessimine kui modifitseerimine jõuavad lõpuni alles 70S partiklites (ribosoomide lõplik "küpsemine") (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). Funktsionaalse 70S ribosoomi moodustamiseks translatsiooni initsiatsiooni käigus on vajalik, et mõlemad subühikud assotseeruks korrektselt, see tagatakse molekulisevaheliste interaktsioonide ehk subühikutevaheliste sildade moodustamisega (Yusupov *et al.*, 2001). Lisaks on 70S subühiku moodustumisel olulised erinevad initsiatsiooni faktorid ning mRNA (*messenger RNA*) ja initsiaator-tRNA (transport RNA) (Wilson & Nierhaus, 2007). Samuti on subühikute kooshoidmiseks olulised metallioonid, mis neutraliseerivad RNA negatiivse laengu ja stabiliseerivad seeläbi 70S ribosoomi struktuuri. Kahevalentse magneesiumi iooni (Mg^{2+}) defitsiit põhjustab subühikute dissotseerumist (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007; Klein *et al.*, 2004).

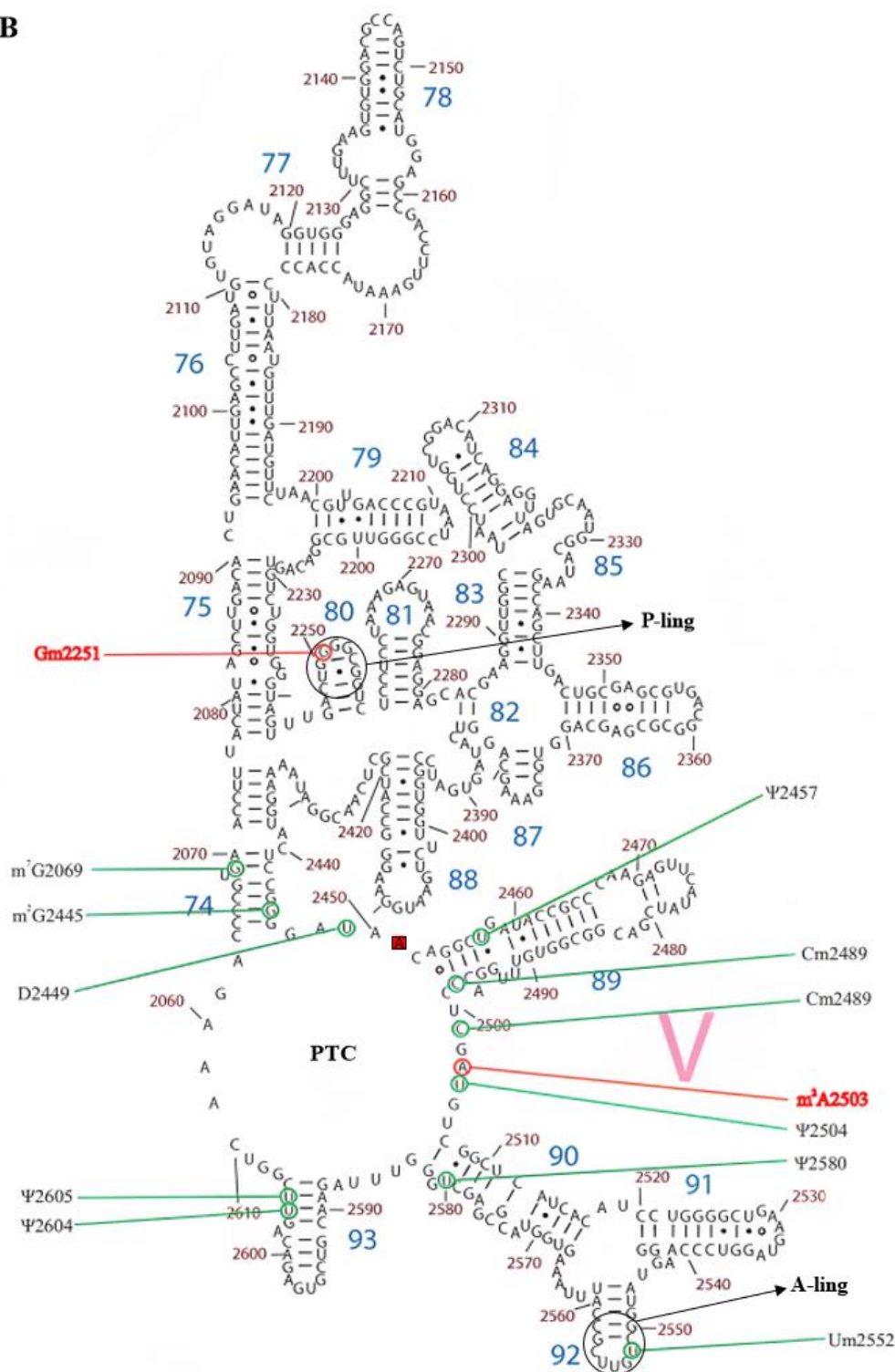
2. Ribosomaalse RNA modifikatsioonide süntees ja tähtsus bakteris

Ribosoomide biosünteesi käigus leiab kõikides organismides aset osade rRNA positsioonide post-transkriptsiooniline modifitseerimine. Teatud modifitseeritavad positsioonid on universaalselt konserveerunud, teised jälle spetsiifilised mingitele kitsamatele evolutsioonilistele harudele. Kusjuures, mida keerulisema organismiga on tegu, seda rohkem on ribosoomides modifikatsioone (Polikanov *et al.*, 2015; Sergiev *et al.*, 2018). Sellele vaatamata on leitud, et modifikatsioonid koonduvad ribosoomile tähtsate funktsionaalsete keskuste nagu 30S subühikus paiknev dekodeerimiskeskuse, 50S subühikus paiknev peptidüültransferaasi keskuse (PTC) ning mRNA ja tRNA seondumiskohtade lähedusse

(Brimacombe *et al.*, 1993; Decatur & Fournier, 2002; Smith *et al.*, 1992). Enamlevinuimateks modifikatsioonideks on pseudouridinülatsioonid (Ψ) ja metülatsioonid. Metüleeritakse nii lämmastikaluste erinevaid positsioone (tähistus m^xX) kui riboosi 2'-OH rühma (tähistus Xm) (Decatur & Fournier, 2002; Ofengand & Del Campo, 2004).

Escherichia coli rakkude ribosoomides modifitseeritakse kokku 36 rRNA positsiooni, millest 13 asuvad 50S subühiku 23S rRNA V domeenis (joonis 2 ja tabel 1). PTC regiooni 13-st modifikatsioonist viis on pseudouridiinid (Ψ 2457, Ψ 2504, Ψ 2580, Ψ 2604 ja Ψ 2605), nii riboosi (Gm2251, Cm2498 ja Um2552) kui lämmastikaluste (m^7G 2069, m^2G 2445 ja m^2A 2503) metülatsioone on kokku kuus ning lisaks üks dihvouridiin (D) ja üks 5-hüdroksüütidiin (ho^5C 2501) (Decatur & Fournier, 2002; Ofengand & Del Campo, 2004). *E. coli* ribosoomi tertsiaarstruktuuris paiknevad need modifitseeritavad positsioonid mitte enam kui 25 Å kaugusel PTC olulisest adenosiin-2451 (A2451) positsioonist (joonis 2A).



B

Joonis 2. *Escherichia coli* 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide paiknemine ribosoomi tertsiaar ja sekundaarstruktuuris. Paneelil A on näidatud lähisvaated PTC regioonist, punasega on näidatud 23S rRNA V domeeni modifikatsiooni positsioonid (tabel 1). Lisaks on välja toodud A- ja P-saidi tRNA-d ning A- ja P-lingud. Struktuuris on näha A-tRNA-ga seotud alinohape (lüsiin, Lys) ning P-tRNA-ga seotud tunnelis paiknev kasvav valguahel (NC). Roosaga on näidatud adenosiin-2451 (A2451), mis on oluline nukleotiid peptiidsideme sünteesil. Kollasega on välja toodud tunnelisse seonduv translatsiooni inhibiitor erütromütsiin (ERY). Joonis saadud meie laboris avaldamisel olevast artiklist. Paneelil B on 23S rRNA V domeeni sekundaarstruktuur. Roheliste ringidega on märgistatud modifitseeritud positsioonid 23S rRNA V domeenis. Punasete ringidega on märgistatud antud töö seisukohast olulised

modifikatsioonid Gm2251 (katalüüsiv RlmB poolt) ja m²A2503 (katalüüsiv RlmN poolt). Punase kastiga on välja toodud A2451. Lisaks on märgistatud A- ja P-lingud. Joonis on kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Bakterites viivad rRNA modifitseerimist läbi spetsiaalsed modifikatsioonien süümid, mis vastutavad nii substraadi äratundmise kui modifikatsiooni sünteesimise eest. Iga modifikatsioonien süüm sünteesib kindlat tüüpi modifikatsiooni, kuid võib seda teha rRNA erinevates positsioonides. Näiteks RluC sünteesib pseudouridiini 23S rRNA kolmes erinevas positsioonis, millest kaks (Ψ 2504 ja Ψ 2580) asuvad V domeenis ning modifikatsioonien süüm RlmKL hübriidvalgu erinevad domeenid (vastavalt K või L) metüleerivad erinevaid positsioone (vastavalt m⁷G2069 ja m²G2445) (Conrad *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012). Metüültransferaas RlmN on oma duaalse-spetsiifika tõttu võimeline katalüüsima modifikatsioone nii rRNA-s (m²A2503) kui tRNA-s (m²A37 antikoodonlingus) (tabel 1) (Benítez-Páez *et al.*, 2012).

Tabel 1. *Escherichia coli* ribosoomi 23S rRNA domeenis V paiknevad modifikatsioonid

23S rRNA positsioon	Modifikatsioon	Ensüüm
2498	Cm	RlmM
2449	D	RldA (geen pole teada)
<u>2251</u> (P-ling)	Gm	RlmB
<u>2501</u>	ho ⁵ C	RlhA
2503	m ² A	RlmN
2445	m ² G	RlmKL (L domeen)
2069	m ⁷ G	RlmKL (K domeen)
<u>2552</u> (A-ling)	Um	RlmE
2605	Ψ	RluB
2504	Ψ	RluC
2580	Ψ	RluC
2457	Ψ	RluE
2604	Ψ	RluF

Allatõmmatud positsioonid 23S rRNA-s tähistavad positsioone, mida modifitseeritakse kõigis organismides.

Modifikatsioonid muudavad lokaalselt RNA konformatsiooni ja keemilisi omadusi (Helm, 2006). Samuti võivad modifikatsioonid muuta RNA-d dünaamilisemaks (näiteks dihydrouridiin) või jäigemaks (riboosi 2'-OH rühma metülatsioon). Pseudouridiin võib muuta

üksikahelalisi RNA regioone paindlikumaks, kuid samas stabiliseerida RNA heelikseid (Helm, 2006). Lisaks võivad modifikatsioonid vähendada (pseudouridiin) või suurendada (metülatsioon) lämmastikaluste hüdrofoobsust ja seeläbi mõjutada “stäckumist“ (*stacking*) (Agris, 1996; Polikanov *et al.*, 2015). On näidatud, et metüleeritud nukleotiidid m⁵U1915 ja Cm1920, mis paiknevad 23S rRNA-s suurendavad hüdrofoobseid interaktsioone ja võivad mõjutada subühikutevahelisi sildu ning seeläbi stabiliseerida kontakte subühikute vahel (Polikanov *et al.*, 2015; Sergiev *et al.*, 2018). Lisaks, modifikatsioonid võivad muuta ribosoomiga seonduvate valguliste faktorite või madalmolekulaarsete ühendite (nt. antibiootikumide) seondumissaite. Samuti võivad modifikatsioonid (metülatsioonid ja pseudouridinülatsioonid) muuta vesiniksideme doonorite ja aktseptorite mustrit mingis RNA regioonis mõjutades Watson-Crick paardumist või kaitsta seda ribonukleaaside eest (riboosi 2'-OH rühma metülatsioon) (Agris, 1996; Lane *et al.*, 1995).

Vaatamata sellele, et osad rRNA modifikatsioonide positsioonid on fülogeneetiliselt konserveerunud, modifikatsioonid koonduvad funktsionaalselt oluliste keskuste ümber ning nende süntees nõuab rakult metaboolseid ressursse, ei ole ükski rRNA modifikatsioon hädavajalik *Escherichia coli* rakkude elutegevusele (Brimacombe *et al.*, 1993; Decatur & Fournier, 2002; Smith *et al.*, 1992). Veelgi enam, individuaalsete modifikatsiooniensüümide deleteerimisel genomist, millega kaasneb vastavate modifikatsioonide puudumine ribosoomis, ei mõjuta märgatavalt *E. coli* kasvu, ribosoomide biogeneesi ega funktsioneerimist (Ofengand & Del Campo, 2004). Senini on leitud, et PTC regiooni modifikatsioonide korral ainult Um2552 (sünteesitud modifikatsiooniensüümi RlmE poolt) puudumisel aeglustub oluliselt *E. coli* rakkude kasv (Arai *et al.*, 2015; Caldas, Binet, Bouloc, & Richarme, 2000). Fülogeneetiliselt konserveerunud RlmE modifitseerib 23S rRNA positsiooni 2552, mille kõrval asuv nukleotiid G2553 on oluline aminoatsüül-tRNA 3' CCA regiooni korrektsele positsioneerimisele PTC-s (Brimacombe & Stiege, 1985; Caldas, Binet, Bouloc, Costa, *et al.*, 2000; Kim & Green, 1999). *E. coli* tüves (*ΔrlmE*), kust on deleteeritud *rlmE* geen, on häiritud nii ribosoomide biogeneesi kui funktsioneerimine (Caldas, Binet, Bouloc, Costa, *et al.*, 2000). Erinevalt enamikest teistest modifikatsiooniensüümidest, mis modifitseerivad rRNA-d ribosoomi biogeneesi varajasemates etappides, sünteesib RlmE Um2552 hilises faasis (Siibak & Remme, 2010).

Kui välja jätta Um2552, siis teiste PTC regiooni rRNA modifikatsioonide tähtsus ei ole teada. On pakutud, et rRNA modifikatsioonide roll on ribosoomi oluliste regioonide moodustumise, stabiilsuse ning funktsioneerimise peenhäälestamine (*fine-tuning*), mida on keeruline uurida tulenevalt sellest, et modifikatsioonidel on tõenäoliselt osaliselt funktsionaalselt kattuv ja kumuleeruv efekt (Decatur & Fournier, 2002; Ofengand & Del Campo, 2004).

3. Ribosomaalse RNA metüültransferaasid

RNA metüülatsioonid on leitavad kõikides organismides alates bakterist ja lõpetades inimesega. Neid leitud pea kõikides RNA tüüpides (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, siRNA, piRNA ja miRNA) (Kamminga *et al.*, 2010; Montgomery *et al.*, 2012; Sergiev *et al.*, 2018). Suurem osa metüülatsioonidest 23S rRNA-s leiab aset ribosoomi assambleerumise algetappides (Siibak & Remme, 2010).

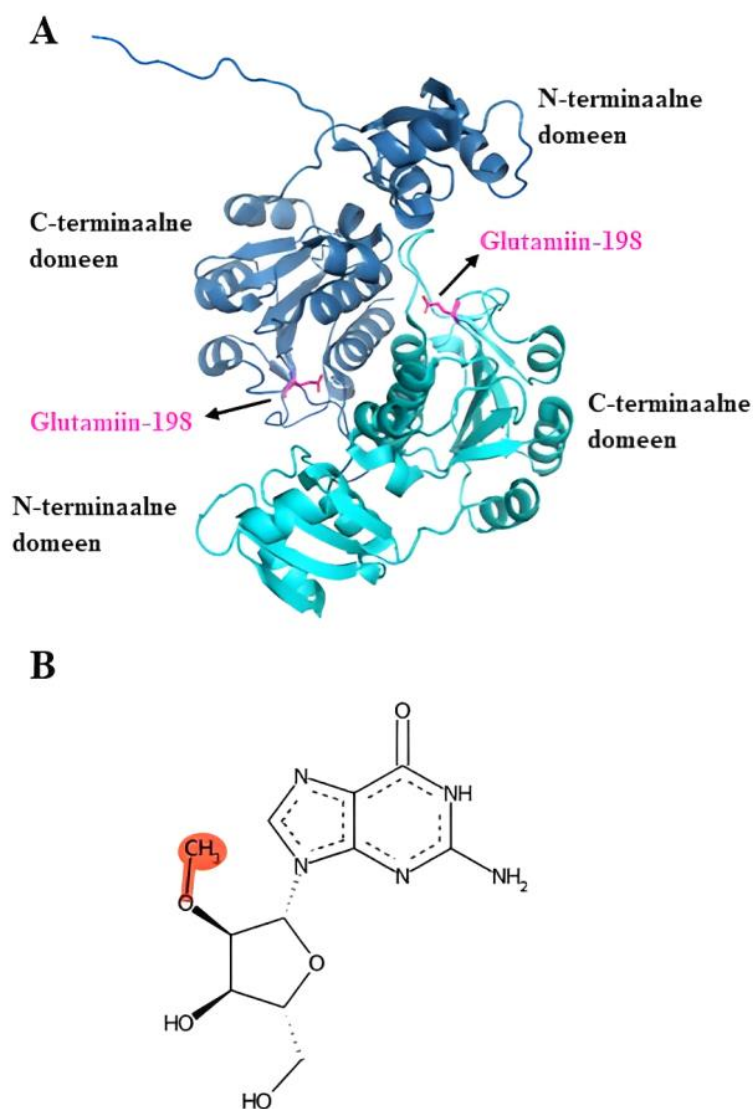
Metüülatsioonid sünteesivad post-transkriptsiooniliselt ensüümid, mida nimetatakse metüültransferaasideks. Kõik metüültransferaasid kasutavad metüülrühma ülekandmiseks kofaktorit S-adenosüül-L-metioniini (SAM) ja sisaldavad nõrgalt konserveerunud SAM siduvat järjestust (Schubert *et al.*, 2003). Metüültransferaasid jagunevad SAM seondumise regiooni struktuuri põhjal viite klassi (I-V). rRNA-d metüleerivad metüültransferaasid kuuluvad klass I või klass IV (Ofengand & Del Campo, 2004; Schubert *et al.*, 2003).

Klass I rRNA metüültransferaaside hulka kuulub omakorda 6 perekonda: m²G, m⁵C, m⁶A, m¹G, m⁵U ja 2'-O sünteesivad valgud (Ofengand & Del Campo, 2004; Schubert *et al.*, 2003). See klass sisaldab konserveerunud metüültransferaasi katalüütilist regiooni (Rossmanni struktuur), mis koosneb vaheldumisi paiknevatest α -heeliksitest ja β -lehtedest. Enamikul klass I metüültransferaasidel on lisa domeenid, mida ensüüm kasutab substraadi täpseks äratundmiseks (Ofengand & Del Campo, 2004). Töös kasutatav metüültransferaas RlmN kuulub klassi I. Klass IV rRNA metüültransferaasid on kõik kolmiksõlme (*deep trefoil knot*) sisaldava SPOUT (nimi tuleb homoloogiast SpoU ja TrmD valkudega) perekonna liikmed, mis katalüüsivad m¹G ja Gm modifikatsioone (Anantharaman *et al.*, 2002). SPOUT ensüümide C-terminuses paikneva kolmiksõlme vahendusel moodustavad metüültransferaasid dimeeri ja SAM-i seondumisel ning katalüütilise saidi moodustumisel panustavad mõlemad monomeerid (Anantharaman *et al.*, 2002; Ofengand & Del Campo, 2004). Sellesse klassi kuulub töös uuritav metüültransferaas RlmB

3.1 Metüültransferaas RlmB (Gm2251)

Metüültransferaas RlmB (joonis 3A) kuulub SPOUT valkude perekonda ja sünteesib universaalset konserveerunud modifikatsiooni 2'-O-metüleeritud guanosiini positsioonis 2251 (joonis 3B), mis asub 23S rRNA P-lingu regioonis (Lövgren & Wikström, 2001). See asukoht on oluline translatsioonil peptidüül-tRNA 3' CCA otsa korrektsel seondumisel peptidüültransferaasi keskusesse (PTC) (Michel *et al.*, 2002; Polikanov *et al.*, 2015; Voorhees *et al.*, 2009). Modifikatsiooni Gm2251 2'-O-metüülgrupp moodustab lisa hüdrofoobseid sidemeid tsüsteiini suhkruga positsioonis 2065 ja uridiini alusega positsioonis 2449. (Lövgren & Wikström, 2001; Polikanov *et al.*, 2015) Vaatamata sellele, *rlmB* geeni deleteerimine

Escherichia coli rakkudest ei mõjuta rakkude kasvu ega ribosoomide assambleerumist (Lövgren & Wikström, 2001). RlmB ortoloog pärmi *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes, Pet56p, aga on oluline mitokondriaalsete ribosoomide assambleerumiseks isegi ilma katalüütilise aktiivsusega (Sirum-Connolly & Mason, 1993). Seega RlmB valgul võib rakkudes olla metüültransferaasest aktiivsusest sõltumatu funktsioon. RlmB ja selle poolt sünteesitud Gm2551 modifikatsiooni tähtsus *E. coli*'s ei ole teada.



Joonis 3. RlmB tertsiaarstruktuur ja katalüüsiv guansiini riboosi 2'-OH grupi metüülatsoon (Gm). Paneelil A on näidatud dimeerne metüültransferaas RlmB (Protein database ID: 1GZ0). Välja on toodud N-terminaalsed domeenid (rRNA äratundmine) ja C-terminaalsed katalüütilised domeenid. Struktuuris puudub kofaktor SAM. Tume- ja helesinisena on välja toodud monomeerid, roosaga on näidatud katalüütiliselt oluline aminohappe (glutamiin positsioonis 198). Paneel A oli koosatud kasutades PyMOL arvutiprogrammi. Paneelil B on Gm modifikatsioon (Modomics andmebaas). RlmB poolt lisatav metüülrühm on näidatud punasega.

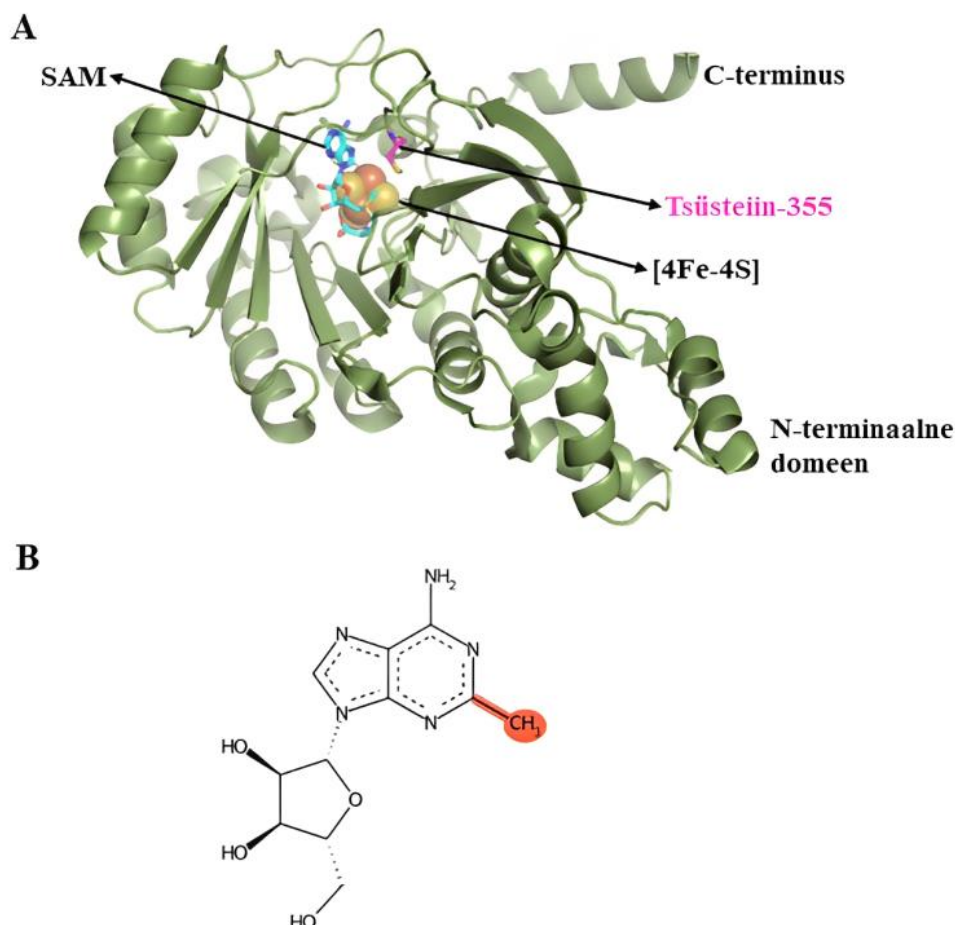
RlmB monomeer koosneb suuremast ja jäigemast C-terminaalsest domeenist, millel on katalüütiline funktsioon ja mis on oluline dimeeri tekkeks, ning väiksemast ja plastilisemast N-

terminaalsest domeenist, mis vastutab rRNA äratundmise eest (joonis 3A) (Michel *et al.*, 2002). Domeene ühendab *linker*-regioon ja vähesed domeenidevahelised sillad (Michel *et al.*, 2002). RlmB katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks peab moodustuma dimeer. Kaks monomeeri seonduvad omavahel läbi C-terminaalsete regioonide, side tekib ühe monomeeri sõlmregiooni motiiv I ja teise monomeeri sõlmregiooni motiiv II ja III vahel (Michel *et al.*, 2002). Motiivid II ja III on lisaks kofaktor SAM seondumiskohad (Gustafsson *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 2002). Kuigi antud metüültransferaas on SAM-sõltuv, siis esineb modifikatsiooniensüümil RlmB tavalisest Rossmani struktuurist erinev SAM-i siduv regioon. Katalüütilise regiooni C-terminaalses domeenis moodustab omapärane sügav kolmikusõlm (*deep trefoil knot*), mis omab võtmerolli metüültransferaas RlmB dimeriseerimisel (Michel *et al.*, 2002). RlmB aktiivsait moodustub mõlema monomeeri katalüütilise domeeni sõlmregioonist.

Katalüütiliselt oluliseks aminohappeks metüültransferaasi RlmB korral loetakse glutamiini positsioonis 198 (joonis 3A). Antud aminohape paikneb ühe monomeeri C-terminaalses domeenis ja loob silla teise monomeeri arginiiniga positsioonis 114 (Michel *et al.*, 2002). On teada, et pärmi 21S 2'-O-metüültransferaasi Pet56p (RlmB ortoloog pärmi mitokondris) saab katalüütiliselt inaktiveerida kui muteerida glutamiin positsioonis 358 (Sirum-Connolly & Mason, 1993). *Escherichia coli* rakkudes on selleks vastavalt glutamiin 198.

3.2 Metüültransferaas RlmN (m²A2503)

Metüültransferaas RlmN (joonis 4A) kuulub klass I rRNA metüültransferaaside hulka ja on duaalse-spetsiifikaga radikaal-SAM ensüüm (Benítez-Páez *et al.*, 2012; Grove *et al.*, 2011; Sofia *et al.*, 2001), mis metüleerib 23S rRNA adensiini teist süsinikku (joonis 4B) positsioonis 2503 ja lisaks katalüüsib sama modifikatsiooni osade tRNA-de antikoodonlingu positsioonis 37 (Benítez-Páez *et al.*, 2012; Toh *et al.*, 2008). 23S rRNA positsioon 2503 paikneb ribosoomi suure subühiku peptidüültransferaasi keskuses, peptiidi väljumistunneli läheduses ja suurendab aluste "stäckumist" (*stacking*) adeniini 2059 ja adeniini 2503 vahel. Selline interaktsioon stabiliseerib kahte üheahelalist rRNA segmenti, mis moodustavad peptiidi väljumistunneli seinu (Ban *et al.*, 2000; Polikanov *et al.*, 2015; Toh *et al.*, 2008). Adensiini 2503 metüleerimine on oluline translatsiooni täpsuse jaoks kuna on näidatud, et *rlmN* deletsioonitüvel suureneb UAG stopp-koodonite läbilugemine (Benítez-Páez *et al.*, 2012). Lisaks on selle positsiooni metülatsiooni funktsiooniks tunnelis olevate teatud peptiidide aminohappelise järjestuse äratundmine ning signaali edastamine PTC-sse, millele järgneb translatsiooni seiskumine (*ribosome stalling*) (Vázquez-Laslop *et al.*, 2010). Sellele vaatamata ei esine *rlmN* geeni deletsioonitüvel kasvufenotüüpi ning m²A2503 olulisus *E. coli*'s on teadmata.



Joonis 4. RlmN tertsiaarstruktuur ja katalüüsiv adenosini lämmastiku aluse 2. süsiniku metüülatsoon (m^2A). Paneelil A on näidatud metüültransferaas RlmN (Protein Database ID: 4PL2). Välja on toodud katalüütiline C-terminaalne domeen ja N-terminaalne L30e-sarnane lisadomeen. Roosaga on näidatud katalüütiliselt oluline aminohappe tsüsteiin positsioonis 355, helesinisega on näidatu kofaktor SAM ja kollased ning oranžid kerad märgistavad raudväävelklastrit [4Fe-4S]. Paneel A oli koostatud kasutades PyMOL arvutiprogrammi. Paneelil B on m^2A modifikatsioon (Modomics andmebaas). RlmN poolt lisatud metüülrühm on näidatud punasega.

RlmN on monomeerne ensüüm (joonis 4A), mis koosneb klassikalisest Rossmanni struktuurist, millega seondub raudväävelklaster [4Fe-4S] ja mida ümbritsevad kaks pikka silmuse regiooni (Boal *et al.*, 2011). C-terminaalse domeeni funktsiooniks on modifikatsiooni katalüüsimine ja N-terminaalne L30e-le sarnanev domeen vastutab substraadi äratundmise eest (Boal *et al.*, 2011). Selline struktuur on iseloomulik radikaal-SAM ensüümidele (Boal *et al.*, 2011; Sofia *et al.*, 2001).

Lämmastikaluse endotsüklilise süsinikuaatomi metüleerimine on keemiliselt keerulisem reaktsioon kui näiteks endotsüklilise lämmastikaatomi või riboosi 2' hapniku metüleerimine (Toh *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010). Radikaal-SAM ensüümid kasutavad sellise modifikatsiooni läbiviimiseks kahte SAM molekuli. Esimene on vajalik 5' deoksüadenosüülradikaali tekitamiseks ja teine SAM molekul on vajalik metüülrühma ülekandmiseks tsüsteiinile

positsioonis 355 (C355) (Boal *et al.*, 2011; Yan & Fujimori, 2011). Seejärel metüülrühm, mis saadi SAM molekulist, kinnitatakse RNA-ga teisest SAM molekulist tuletatud radikaali lisamisega. Tekkinud struktuur lahendatakse disulfiidsilla moodustamisega metüleeritud tsüsteiini positsioonis 355 ja teise konserveerunud tsüsteiini (C118) vahel (Boal *et al.*, 2011; Grove *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010). Tulemuseks on m²A modifitseeritud rRNA nukleotiid. Seetõttu peetakse katalüütiliselt oluliseks aminohappeks RlmN homologide seas konserveerunud tsüsteiini positsioonis 355 (C355).

EKSPERIMENTAALOSA

1. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on hinnata modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN ning nende poolt sünteesitud ribosomaalse RNA modifikatsioonide olulisust bakteris *Escherichia coli*. Selleks vaadati natiivse või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN mõju bakteri kasvule, ribosoomide biogeneesile ja funktsioneerimisele kasutades *Escherichia coli* tüvesid, millest on deleteeritud kõik teadaolevate geenidega ribosomaalse RNA modifikatsiooniensüümid.

2. Materjal ja meetodika

2.1 *Escherichia coli* tüved ja plasmiidid

Katsete läbiviimiseks kasutati *Escherichia coli* (*E. coli*) metsiktüüpi tüvesid MG1655 ja DH5 α ning MG1566 tüvel põhinevaid mitmikdeletsioonitüvesid $\Delta 10$ ja $\Delta 9$ (tabel 2).

$\Delta 9$ tüvest on deleteeritud üheksa 23S rRNA modifikatsiooniensüümi: *rluC*, *rlmKL*, *rlmN*, *rlmM*, *rluE*, *rluB*, *rluF*, *rlmB* ja *rlhA*. $\Delta 10$ tüvest on lisaks deleteeritud *rlmE* geen. $\Delta 10$ tüve genoom on sekveneeritud ning vastavate modifikatsioonide puudumine 23S rRNA's on kinnitust leidnud Margus Leppiku (Tartu Ülikooli molekulaarbioloogia õppetool) poolt.

Tabel 2. Katsete läbiviimiseks kasutatud *Escherichia coli* tüved.

Tüve nimetus	Genotüüp	Allikas
MG1655	<i>F</i> -, λ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
$\Delta 10$	<i>F</i> -, λ -, <i>rfb-50</i> , <i>ilvG</i> -, <i>rph-1</i> <i>ΔrluE</i> , <i>ΔrluC</i> , <i>ΔrluB</i> , <i>ΔrlhA</i> , <i>ΔrlmM</i> , <i>ΔrlmB</i> , <i>ΔrluF</i> , <i>ΔrlmKL</i> , <i>ΔrlmN</i> , <i>ΔrlmE</i> , Km ^R	Meie labori kollektsoon; Anastassia Klink bakalaureusetöö 2020
$\Delta 9$	<i>F</i> -, λ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i> , <i>ΔrluE</i> , <i>ΔrluC</i> , <i>ΔrluB</i> , <i>ΔrlhA</i> , <i>ΔrlmM</i> , <i>ΔrlmB</i> , <i>ΔrluF</i> , <i>ΔrlmKL</i> , <i>ΔrlmN</i> , Km ^R	Meie labori kollektsoon; Triin Truu magistritöö 2016
DH5α	<i>F</i> - Δ (<i>argF-lac</i>)169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> 58(M15), <i>ΔphoA8</i> , <i>glnX44</i> (AS), λ -, <i>deoR481</i> , <i>rfbC1</i> , <i>gyrA96</i> (NalR), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thiE1</i> , <i>hsdR17</i>	Kemokompetentsed rakud saadud Maie Looritsalt (TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool); (Hanahan, 1983)

Modifikatsiooniensüümide ekspresseerumiseks kasutati pHBT plasmidi (pHSG576 derivaat)(Lilleorg *et al.*, 2017), mis sisaldab klooramfenikooli selektsiooni markerit (Cam^R),

pCS101 replikatsiooni alguspunkti ja *tac* promootorit (*trp* ja *lac* UV 5 hübrid). pHBT vektori *tac* promootorilt toimub “lekkiv“ ekspressioon isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiidi puudumisel, mille tulemuseks on uuritavate valkude madal ekspressioonitase rakus.

2.2 Praimerid

Tabel 3. Katsetes kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	5' → 3'järjestus	Kasutus
RlmB (E198A) FORW	GTGATGGGTGCG <u>G</u> CAGGTGAAGG TATG	RlmB mutagenees
RlmB (E198A) REV	CAGCGCCAGGCGTCCGGTCATTTT G	RlmB mutagenees
RlmN (C355A) FORW	GATATCGATGCTGCC <u>G</u> CTGGTCA GTTGG	RlmN mutagenees
RlmN (C355A) REV	ATCACCACGAGTTTTACGCACAA TAGTGGTGAAAC	RlmN mutagenees
pUC DIR	GTAAAACGACGGCCAGT	pHBT konstruktide sekveneerimine
pUC REV	CAGGAAACAGCTATGAC	pHBT konstruktide sekveneerimine
23S 5' END (FAM märkega)	TCGCCTCTGACTGCCAGGGCATCC	23S rRNA 5' otsa määramine praimer- ektentsiooniga

2.3 Söötmed ja puhvid

Tabel 4. Katsetes kasutatud söötmed.

Sööde	Koostis	Allikas
2x YT	1,6%, trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989
LB	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Bertani, 1951
MS	1% trüpton, 0,01% pärmiekstrakt, 1% NaCl	
SOB	2% baktotrüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄	(Hanahan, 1983)

Tabel 5. Katsetes kasutatud puhvrid.

Puhver	Koostis
RF1	100 mM KCl, 50 mM MnCl ₂ •4H ₂ O, 30 mM K-atsetaat, 10 mM CaCl ₂ •2H ₂ O, 15% glütserool
RF2	10 mM KCl, 10 mM MOPS pH 6,8, 75 mM CaCl ₂ •2H ₂ O, 15% glütserool
Lüüsipuhver (LP)	60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 6 mM MgCl ₂ , 16% sahharoos, 6 mM β-merkaptotoetanool
Lüüsilahjenduspuhver (LLP)	60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 12 mM MgCl ₂ , 6 mM β-merkaptotoetanool
OV-10	60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl ₂ , 6 mM β-merkaptotoetanool
PM	Guanidiin-HCl ja isopropanool; täpne koostis ei ole teada (Qiagen)
5x RT-HB	225 mM K-HEPES pH 7,0, 450 mM KCl
10x RT-RB	1,3 M Tris-HCl pH 8,5, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT
FS (formamiidi stopp puhver)	98% formamiid, 10 mM EDTA, 0,1% bromofenoolsinine, 0,1% ksüleenksüanool
RT-STOP	75 mM Na-atsetaat, 70% etanool

2.4 RlmB ja RlmN mutagenees

Natiivset RlmB ja RlmN valku kodeerivad plasmiidid (pHBT-*rlmB* ja pHBT-*rlmN*) olid konstrueeritud meie laboris varasemate tudengite poolt. Kirjanduse põhjal on teada, et RlmB ja RlmN jaoks katalüütiliselt olulised aminohapped on vastavalt glutamaat positsioonis 198 ja tsüsteiin positsioonis 355 (Grove *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2002). Asendamaks neid aminohappeidalaniiniga, disainiti spetsiaalsed praimerid, mis asendavad vastavad koodonid, GAA→GCA *rlmB* geenis ja TGT→GCT *rlmN* geenis,alaniini kodeerivateks koodoniteks (tabel 3). Saadud praimeritega viidi läbi koht-spetsiifiline mutagenees iPCR meetodil (tabel 6) (M. R. Green & Sambrook, 2019) kasutades Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific) ning matriitsina pHBT-*rlmN* ja pHBT-*rlmB* plasmide. PCR produktide ligeerimiseks lisati proovidele PNK (polünukleotiidi kinaas), DpnI ja T4 DNA ligaas (kõik saadud Thermo Scientific'ust) ning transformeeriti kuumašoki meetodil kemokompetentsetesse DH5α rakkudesse. Plasmiidid pHBT-*rlmB*(E198A) ja pHBT-*rlmN*(C355A) eraldati FavorPrep plasmiidieraldamiskomplektiga (Favorgen). Konstrueeritud plasmiidid koos algsete

plasmiididega kontrolliti sekveerimisega (TÜMRI sekveerimisteenus) kasutades praimereid pUC DIR ja pUC REV (tabel 3).

Tabel 6. iPCR reaktsiooni tingimused.

Etapp	Reaktsioon	Temperatuur (°C)	Aeg (sek)	Tsüklite arv
1	Algne denaturatsioon	98	30 sek	
2	Denaturatsioon	98	10 sek	30
3	Praimerite seondumine ja elongatsioon	72	150 sek	
4	Lõplik elongatsioon	72	300 sek	

2.5 Kemokompetentsete $\Delta 10$ rakkude valmistamine

Eelnevalt kirjeldatud plasmiidide sisestamiseks $\Delta 10$ tüve rakkudesse tuli need kõigepealt teha kemokompetentseteks. Selleks kasvatati $\Delta 10$ rakke 200 ml SOB vedelsöötmes (tabel 4) kanamütsiini (Km) (50 $\mu\text{g/ml}$) juuresolekul temperatuuril 37°C loksutis üleöö. Rakukultuurist tehti 100x lahendus 200 ml SOB vedelsöötmesse ja inkubeeriti samadel tingimustel kuni OD₆₀₀ oli $\approx 0,4$. Seejärel rakud koguti tsentrifuugimise teel 3000 rpm (pöördeid minutis) juures 15 minutit temperatuuril 4°C. Rakkudelt eemaldati sööde, suspendeeriti RF1 puhvril ja asetati 30 minutiks jääle. Seejärel rakud koguti eelnevalt väljatoodud tingimustel tsentrifuugimisega ja eemaldati RF1. $\Delta 10$ rakud suspendeeriti RF2 puhvril ja hoiti jääle 15 minutit. Hoiustamiseks külmutati rakud vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C juures.

Transformatsiooniks lisati kemokompetentsetele $\Delta 10$ rakkudele plasmide pHBT-*rlmB*, pHBT-*rlmB(E198A)*, pHBT-*rlmN* või pHBT-*rlmN(C355A)*. Rakke inkubeeriti 20-30 minutit jääle, misjärel tehti rakkudele kuumašokk hoides neid 5 minutit temperatuuril 37°C. Seejärel jahutati rakud 2-3 minutit jääle, pärast mida lisati rakkudele 1 ml LB söödet ja inkubeeriti 37°C juures tund aega. Šokist taastunud rakud tsentrifuugiti 5000 rpm juures 5 minuti jooksul põhja ja eemaldati suur osa söötmest. Seejärel rakud resuspendeeriti ja külvati klooramfenikooli (CAM) sisaldavatele (15 $\mu\text{g/ml}$) LB tardsöötme tassidele ning kasvatati üleöö 37°C juures.

2.6 Bakterite kasvukõverate ja poolestusaja määramine

2 ml LB söödet inokuleeriti *E. coli* MG1655 metsiktüüpi tüve, mitmikdeletsioonitüvega $\Delta 10$, natiivset RlmB valku ekspresseeriva $\Delta 10$ ($\Delta 10 + \text{RlmB}$), mutantset RlmB(E198A) valku ekspresseeriva $\Delta 10$ ($\Delta 10 + \text{RlmB(E198A)}$), natiivset RlmN valku ekspresseeriva $\Delta 10$ ($\Delta 10 + \text{RlmN}$) või mutantset RlmN(C355) valku ekspresseeriva $\Delta 10$ ($\Delta 10 + \text{RlmN(C355AA)}$) tüve üksikkolooniatega ning lisati vastavaid antibiootikume. $\Delta 10$ rakkudele lisati Km (50 $\mu\text{g/ml}$) ning plasmide sisaldavatele rakkudele CAM (15 $\mu\text{g/ml}$). 37°C juures üleöö kasvanud

rakukultuuridest tehti 1000x lahjendus (OD_{600} ligikaudu 0,01) 150 μ l LB söötmesse 96 augulisel mikrotiiterplaadil CellStar (Greiner Bio-One). Antibiootikume ei lisatud. Seejärel kaeti plaat läbipaistva teibiga, et vältida aurustumist. Plaadid inkubeeriti 37°C või 30°C juures mikroplaatlugejas BMG Labtech POLARstar Omega. Masin mõõtis optilist tihedust 600 nm juures iga 7 minuti tagant 10-18 tunni vältel pideva loksutamisega 500 rpm juures. Katset korrati kaks korda nii 37°C kui 30°C juures. Ühel mikrotiiterplaadil oli iga tüve kohta 2 bioloogilist ja 6 tehnilist replikaati.

Kasvukõverad visualiseeriti Microsoft Exceli's ja varajase logaritmilise faasi põhjal arvutati tüvede poolestusajad. Poolestusaegade arvutamiseks lahutati esialgsetest andmetest maha foon, milleks on negatiivse kontrolli (inokuleerimata LB vedelsöötme) optiline tihedus. Järgmisena kasutati valemit $g = \frac{\ln(2)}{r}$, kus $r = \ln\left(\frac{N}{N_0} \div (t - t_0)\right)$. Keskmised poolestusajad ja nende vastavad standardvead on esitatud tulpadena.

2.7 Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendis tsentrifugimisega

LB tardsöötmetelt külvati üksikkolooniad 2 ml värskesse LB vedelsöötmesse kuhu lisati klooramfenikool või kanamütsiin (vastavalt kas plasmiidiga või ilma $\Delta 10$ rakkude puhul) ja kasvatati üleöö 37°C juures loksutis. 2 ml üleöö kultuuriga inokuleeriti 500 ml 2x YT vedelsöödet koos vastava antibiootikumiga, misjärel jälgiti rakkude kasvu 37°C juures loksutis (180 rpm) kuni OD_{600} oli $\approx 1,5$. Vajaliku OD_{600} saavutamisel rakud koguti tsentrifugimise teel (4000 rpm, 15 minutit, 4°C). Sööde eemaldati ja rakud suspendeeriti LP lüüsipuhvrts, millele lisati DNAas I (10 U/ml) ja 0,5 ml klaaskuule (0,1 mm, Sigma Aldrich). Rakud lüüsi kasutades Bertin Precellys24 Tissue Homogenizer homogenisaatorit. Programm koosnes 3-st tsüklist 60 sekundi tööaja (6000 rpm) ja 60 sekundi pausiga (ühe tsükli kohta) 4°C juures.

Rakkude lüsaate tsentrifugiti 3 minutit 3000 rpm 4°C juures, et vabaneda rakukestadest ja lahjendati 1:1 lüüsilahjenduspuhvriga LLP. Järgmisena mõõdeti lüsaadis oleva RNA kontsentratsiooni (neelduvus 260 nm juures A_{260} ; U/ml). Saadud tulemuste põhjal lahjendati proovid LLP puhvriga 100 U/ml kontsentratsioonini. Seejärel kanti 1 ml lüsaate 10% kuni 30% sahharoosgradiendile OV-10 puhvrts ja ultratsentrifugiti kasutades Beckman Coulter SW-28 rootorit. Ultratsentrifugimine kestis 17 tundi ja 40 minutit kiirusel 22000 rpm ($\omega^2 t = 3,0 \times 10^{11}$ rad/sek) 4°C juures. Katset korrati oli 3 korda.

Ribosoomide profiilid visualiseeriti kasutades GE Healthcare rec 112 isekirjutajat, mis sai andmeid GE Healthcare Monitor UVis-920 läbivoolu-spektrofotomeetrilt, mis pidevalt mõõtis neeldumist 260 nm juures. Samaaegselt profiilide visualiseerimisega koguti 70S ribosoomidele ja vabadele 50S subühikutele vastavad fraktsioonid.

Ribosoomide profiilid digitaliseeriti kasutades CorelDraw X8 arvutiprogrammi. Ribosoomi profiilide kvantifitseerimiseks määrati 70S ja 50S fraktsioonide “piikidealune“ pindala kasutades ImageJ arvutiprogrammi. Arvutati keskmine 50S ja 70S fraktsioonide suhte ning vastava standarthälve.

2.8 rRNA nukleosiidse koostise analüüsimine RP-HPLC-ga

Kogutud 70S ribosoomidest dissotseeriti 50S subühikud 1 mM MgCl₂ juuresolekul ning 50S subühikute rRNA nukleosiidne koostis määrati RP-HPLC (pöördfaasiline kõrgjõudlusega vedelikkromatograafia) meetodiga Margus Leppiku poolt.

2.9 23S rRNA 5' otsa määramine praimer-ekstensiooniga

70S ribosoomide ja vabade 50S subühikute fraktsioonid, mis olid kogutud ribosoomide profiilide kaardistamisel, sadestati ultratsentrifuugimisega kasutades Beckman Coulter Ti-50 roorit. Ultratsentrifuugimine kestis 20 tundi kiirusel 39000 rpm ($\omega^2t=1,2 \times 10^{12}$ rad/sek) 4°C juures. Ribosoomid suspendeeriti 200 µl OV-10 puhvrts, millele lisati 800 µl PM puhvrit (Qiagen). Saadud lahus loksutati 20 minutit 45°C juures väristajal (2000 rpm). Seejärel lisati 20 µl 50% SiO₂ suspensiooni ja väristati veel 10 minutit, misjärel SiO₂ sadestamiseks proovid tsentrifuugiti 30 sekundit 13000 rpm juures. Supernatant eemaldati ja sadet pesti kaks korda 1 ml 70% etanooliga, vahepeal tsentrifuugides proove. Seejärel etanool eemaldati ja sadet kuivatati 5 minutit temperatuuril 37°C. rRNA elueeriti veega (Milli-Q) kuumutades 5 minutit temperatuuril 55°C, misjärel sade tsentrifuugiti põhja ja rRNA vesilahus kanti uude tuubi. RNA kontsentratsioon mõõdeti 260 nm juures.

Praimer-ekstensiooni jaoks segati kokku 2 pmol 23S 5' END FAM-märkega praimerit (Microsynth) (tabel 3) ja 0,5-1 pmol vastavat matriits RNA-d 1x RT-HB puhvrts (reaktsiooni maht 9 µl). Segu kuumutati 90°C juures 1 minut, jahutati aeglaselt \approx 50°C ning asetati jääle 20 minutiks. Järgmisena lisati 1 mM dNTP (deoksüribonukleotiidtrifosfaat) segu, 1-2 ühikut AMV pöördtranskriptaasi (New England BioLabs) RT-RB puhvrts reaktsiooni lõppmahuga 13 µl. Praimer-ekstensioon toimus 30 minutit temperatuuril 42°C. Seejärel cDNA sadestati 120 µl RT STOP lahusega -20°C juures 10 minutit. Sade tsentrifuugiti põhja 13000 rpm juures 10 minutit 4°C juures ja supernatant eemaldati. Sade lahustati 10 µl FS (formamiid stopp) puhvrts. Enne geelile kandmist proovid kuumutati 5 minutit 95°C juures.

Polüakrüülamiidgeeli (PAAG) valmistamiseks segati kokku 7% PAA lahus (akrüülamiid ja bisakrüülamiid vahekorras 19:1) ja 8 M urea. 100 ml PAA/uurea lahuse polümeriseerimiseks lisati 700 µl 10% naatriumpersulfaati (NAPS) ja 70 µl tetrametüületüleendiamiini (TEMED). Peale polümeriseerumist pre-fooresiti geeli tund aega 2000 V juures. Seejärel kanti proovid (3

µl) geelile ning foreesiti 1,5-2 tundi 2000V juures. Fluorestsents visualiseeriti Typhoon Trio fluoro/fosfovisualiseeriaga (GE Healthcare).

2.10 *In vivo* translatsioon

MG1655 metsiktüüpi, mitmikdeletsioonitüve Δ9, natiivse RlmB valku ekspresseeriva Δ9 (Δ9 + RlmB), mutantset RlmB(E198A) valku ekspresseeriva Δ9 (Δ9 + RlmB(E198A)), natiivset RlmN valku ekspresseeriva Δ9 (Δ9 + RlmN) ja mutantset RlmN(C355) valku ekspresseeriva Δ9 (Δ9 + RlmN(C355A)) rakud kasvatati MS söötmes (tabel 4), kuhu lisati CAM või Km (vastavalt kas plasmiidiga või ilma Δ9 rakkude puhul), 37°C juures loksutis (180 rpm) üleöö. Seejärel tehti 20x lahjendused värskesse MS söötmesse (antibiootikumi ei lisatud) ja kasvatati rakke 2 tundi loksutis 37°C juures, misjärel mõõdeti OD₆₀₀. Rakukultuurid lahjendati 5 ml värskesse MS söötmesse nii, et OD₆₀₀ oleks 0,1 ja inkubeeriti 1 tund väristajal (800 rpm) temperatuuril 25°C. Pärast tunni aja möödumist lisati proovidele 15 µl [¹⁴C] märkega L-aminohapete segu (100 µCi/ml; Hartman Analytic) ja inkubeeriti väristajal veel tund aega. Järgnevalt võeti iga 60 minuti tagant välja 100 µl rakukultuuri, millele lisati 1 ml külma 5% triklooräädikhapet (TCA), ning sadestati –20°C juures vähemalt tund aega.

Sadenenud valgud koguti filtreerimisega. Enne filtrile kandmist kuumutati kõik proovid 95°C juures 20 minutit. Seejärel kanti proovid klaasmikrofiiber filtritega (GF/C, Whatman) vaakumfiltersüsteemile. Filtreid pesti 5% TCA ja 70% etanooliga ning lasti õhu käes kuivada. Filtrile lisati 5 ml Optiphase Hisafe 3 stsintillatsiooni kokteili (Perkin Elmer). Proovidel lasti seista pimedas üleöö. Mõõtmised tehti vedelstsintillatori analüsaatoriga Tri-Carb 2800TR (Perkin Elmer).

[¹⁴C]-aminohapete lülitumist valkudesse hinnati DPM (*decay per minute*) põhjal. Koostati DPM muutus ajas graafikud, mille alusel arvatud tõusud võimaldavad hinnata suhtelist valgusünteesi efektiivsust rakus. Vähemalt kolm bioloogilist replikaati oli kasutatud keskmiste tõusude leidmisel ja standardvigade arvutamisel.

3. Tulemused ja arutelu

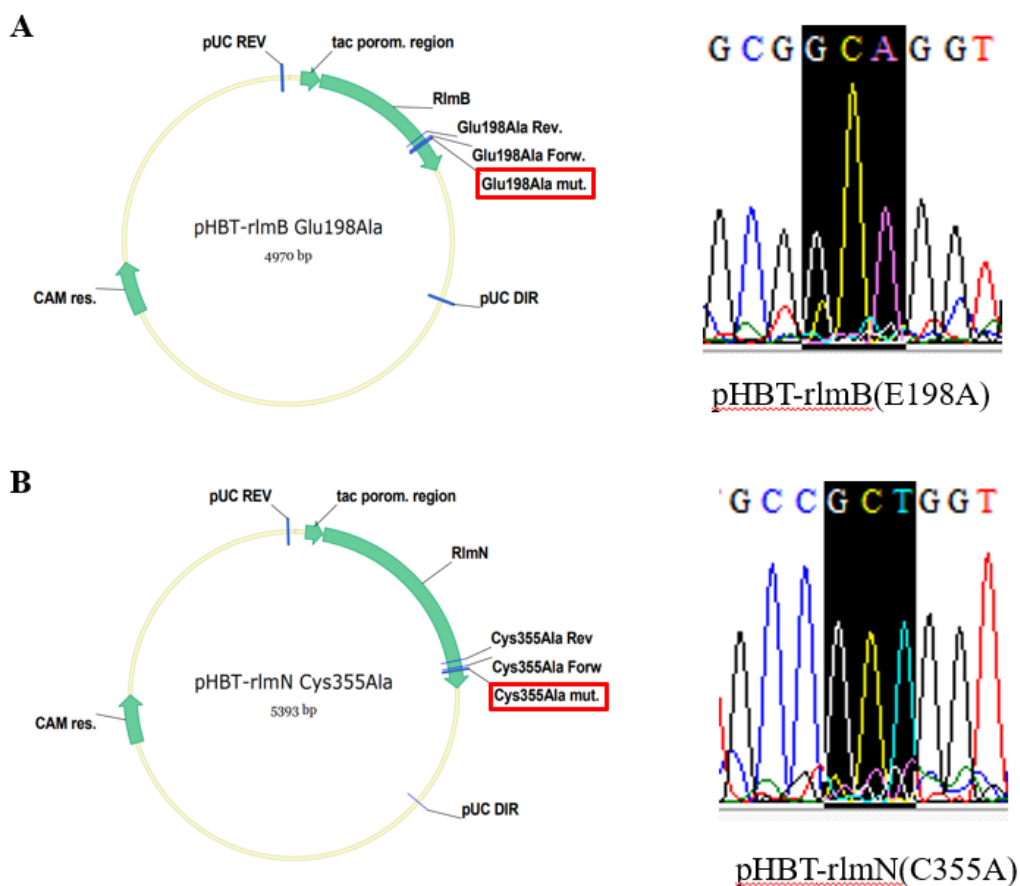
3.1 RlmB ja RlmN mutagenees

Käesoleva töö eesmärgiks on hinnata rRNA metüültransferaaside RlmB ja RlmN funktsiooni ja olulisust bakterites. rRNA metüültransferaasidel võib olla rakus nende metüültransferaasest aktiivsusest sõltumatu funktsioon. Näiteks, RlmB ortoloog (Pet56p) on hädavajalik mitokondriaalsete ribosoomide biogeneesil pagaripärmis, kuid selle metüültransferaasne aktiivsus mitte (Lövgren & Wikström, 2001). Selleks, et eristada modifikatsioonide olulisust neid sünteesitavate valkude muudest potentsiaalsetest funktsioonidest, tuleks võrrelda

natiivseid ja katalüütiliselt inaktiivseid valke. Natiivset RlmB ja RlmN valku ekspresseerivad plasmiidid pHBT-*rlmN* ja pHBT-*rlmB* on varasemast laborikollektsioonis olemas. Katalüütiliselt inaktiivsete valkude ekspressioonikonstruktid valmistati käesoleva töö raames.

Kõigepealt disainiti spetsiaalsed praimerid (tabel 3), et asendada koht-spetsiifilise mutageneesiga katalüütiliselt olulised aminohappedalaniiniga. Plasmiidis pHBT-*rlmB*, *rlmB* geenis, asendati RlmB glutamiinile positsioonis 198 vastav koodonalaniini kodeerivaks koodoniks (GAA→GCA). Selles positsioonis asuvat glutamiini peetakse katalüütiliselt oluliseks kuna RlmB ortoloogi Pet56p (*Saccharomyces cerevisiae*) vastava glutamiini (positsioonis 358) asendamiselalaniiniga kaotas valk katalüütilise aktiivsuse (Michel *et al.*, 2002; Sirum-Connolly & Mason, 1993). Plasmiidis pHBT-*rlmN*, *rlmN* geenis, asendati RlmN tsüsteiinile positsioonis 355 vastav koodonalaniini kodeerivaks koodoniks (TGT→GCT). Selles positsioonis asuv tsüsteiin on katalüütiliselt oluline kuna sellele kantakse üle metüülrühm, mis lõpuks jõuab substraadini (Boal *et al.*, 2011; Grove *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010). Mutageneesiks kasutati iPCR tehnoloogiat (M. R. Green & Sambrook, 2019).

Konstrueeriti plasmiidid pHBT-*rlmB(E198A)* ja pHBT-*rlmN(C355A)* (joonis 5) ning veendumaks, et soovitud asendused on toimunud, kontrolliti plasmiidid sekveneerimisega (kasutades TÛMRI sekveneerimisteenust).



Joonis 5. RlmB ja RlmN valkude mutagenees. Paneelil A on käesolevas töös konstrueeritud plasmidi pHBT-*rlmB*(E198A) skeem ja mutatsioonikohale vastava regiooni sekveneerimise tulemus. Paneelil B on käesolevas töös konstrueeritud plasmidi pHBT-*rlmN*(C355A) skeem ja mutatsioonikohale vastava regiooni sekveneerimise tulemus. Plasmiididel on näidatud mutatsiooni asukoht (märgistatud punasega kastiga), *tac* promootori regioon, kooramfenikooli resistentsuse kassett ja mutageneesiks ning sekveneerimiseks kasutatud praimerite (tabel 3) seondumiskohad. Sekveneerimise tulemustel on mustaga välja toodud asendatud koodon.

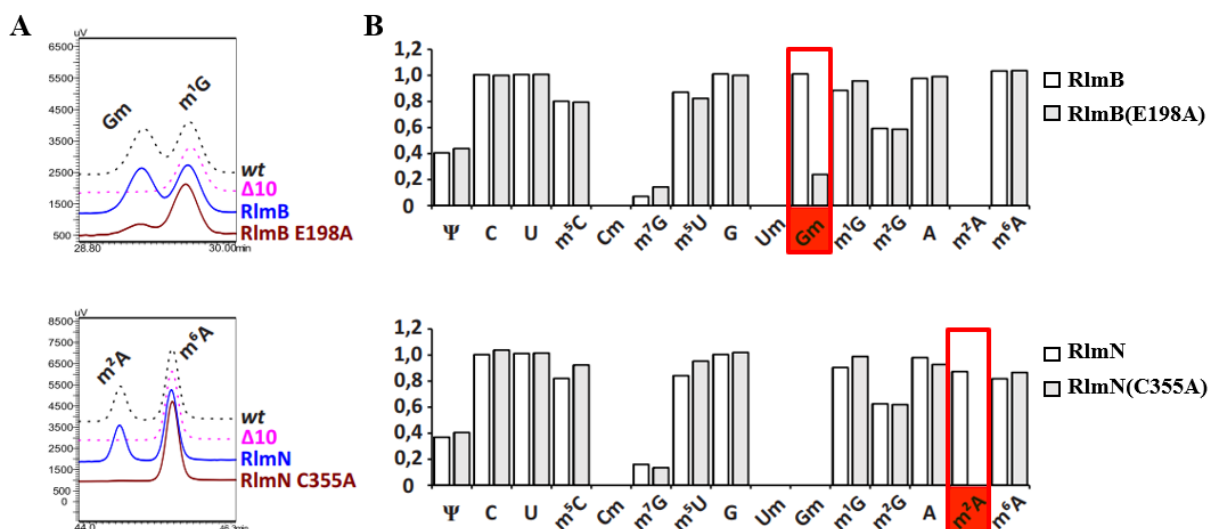
Sekveneerimise tulemused kinnitavad, et plasmiidid pHBT-*rlmB*(E198A) ja pHBT-*rlmN*(C355) võimaldavad ekspresseerida mutantseid RlmB ja RlmN valke, kus glutamiin positsioonis 198 asendatudalaniiniga (RlmB(E198A)) või tsüsteiin positsioonis 355 on asendatudalaniiniga (RlmN(C355A)). Lisaks näitavad sekveneerimise tulemused, et ülejäänud geeni osas ebasoovitavaid mutatsioone ei esine.

3.2 Mutageneesi mõju RlmB ja RlmN aktiivsusele

Järgnevalt sooviti hinnata, kas koht-spetsiifilise mutageneesiga sisse viidud mutatsioonid mõjutavad RlmB ja RlmN metüültransferaasset aktiivsust. Selleks transformeeriti nii mutantsed (pHBT-*rlmB*(E198A) või pHBT-*rlmN*(C355A)) kui natiivsed (pHBT-*rlmB* või pHBT-*rlmN*) plasmiidid *E. coli* Δ10 tüvesse. Selles tüves puuduvad kõik peptidüültransferaasi keskuse regiooni modifikatsioonid, sealhulgas RlmB ja RlmN omad (tabel 1 ja 2). pHBT plasmiidilt toimuv “lekkiv” translatsioon võimaldab valkude ekspresseerimist madalas

kontsentratsioon, mis on ligilähedane modifikatsiooniensüümide kontsentratsiooniga metsiktüüpi rakkudes. Võrdluseks kasutati *E. coli* MG1655 metsiktüüpi tüve (WT) ning $\Delta 10$ tüve, mis ei ekspresseeri plasmiidilt ühtegi modifikatsiooniensüümi. Rakukultuurid kasvatati kuni OD₆₀₀ oli ligikaudu 1,5, seejärel rakud lüüsi ja ribosoomid fraktsioneeriti sahharoosgradiendis ultratsentrifuugimisega (vt. materjal ja meetodika). Koguti 70S ribosoomidele vastavad fraktsioonid. Seejärel dissotseeriti 70S ribosoomid 1 mM MgCl₂ juuresolekul (ribosoomid dissotseeris Rya Ero). Dissotseeritud 50S subühikutest eraldas Margus Leppik rRNA ja analüüsis selle nukleosiidset koostist RP-HPLC meetodil.

rRNA nukleosiidse koostise analüüsid kinnitavad, et $\Delta 10$ tüves puuduvad 23S rRNA-s modifikatsioonid Gm ja m²A võrreldes metsiktüüpi tüvega (joonis 6). Tulemus on kooskõlas sellega, et $\Delta 10$ genoomist on deleteeritud 10 rRNA modifikatsiooniensüümi, sealhulgas Gm2251 sünteesi eest vastutav RlmB ja m²A2503 sünteesi eest vastutav RlmN (tabel 1 ja 2). Kui $\Delta 10$ tüvesse viia plasmiidilt ekspresseeritud natiivne RlmB või RlmN, siis taastuvad 23S rRNA-s vastavad modifikatsioonid MG1655 metsiktüübi (WT) tüvega võrreldaval tasemel (joonis 6). Kui aga ekspresseerida mutantseid RlmB(E198A) või RlmN(C355A) valke, siis vastavaid modifikatsioone ei sünteesita üldse (m²A) või väga vähesel määral (Gm) (joonis 6).



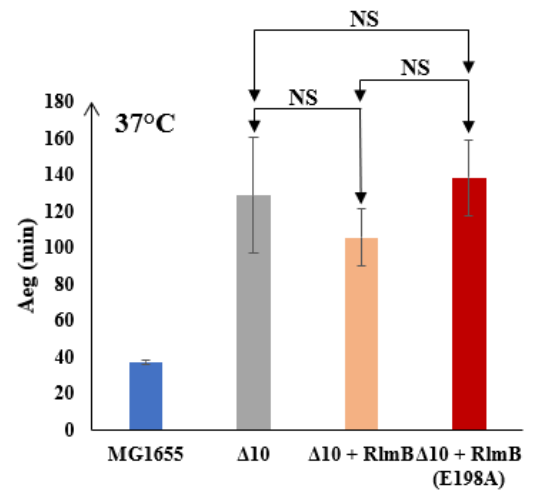
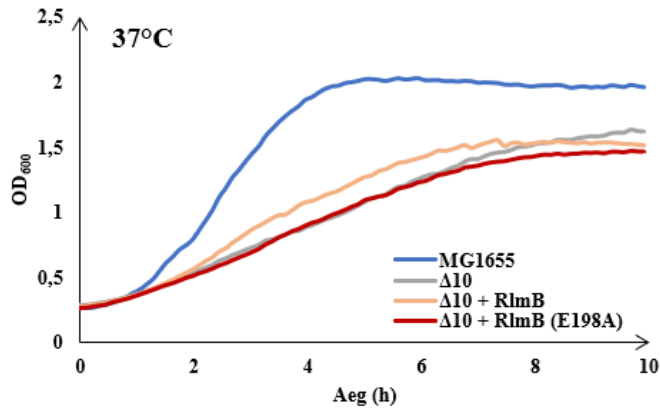
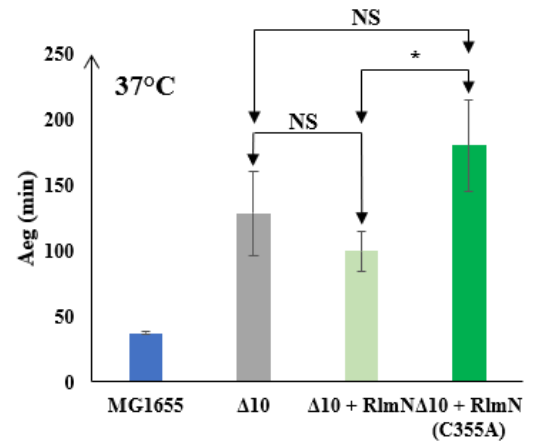
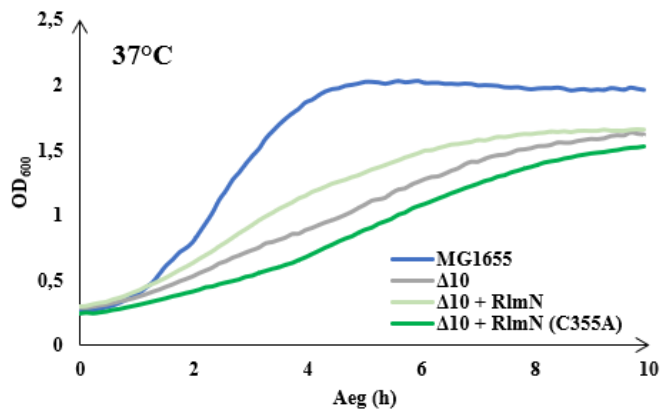
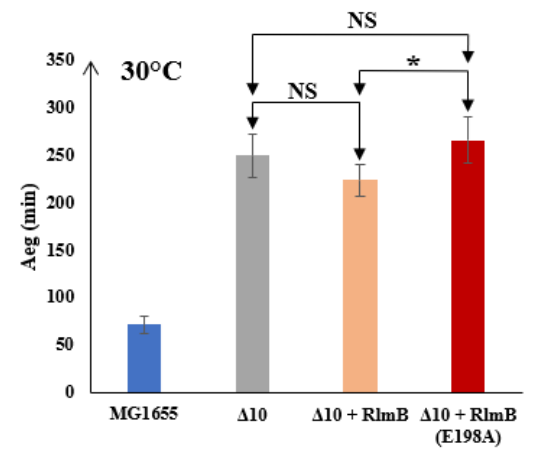
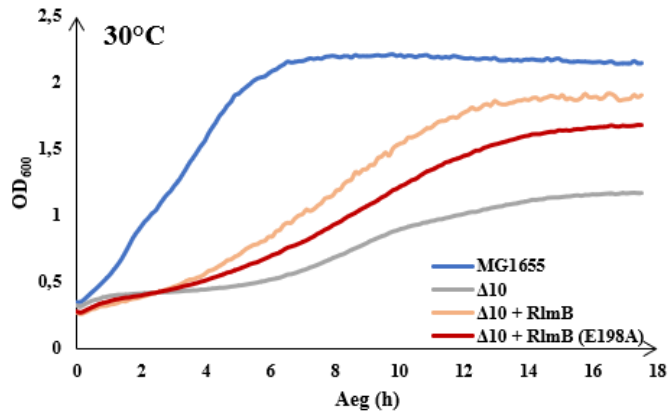
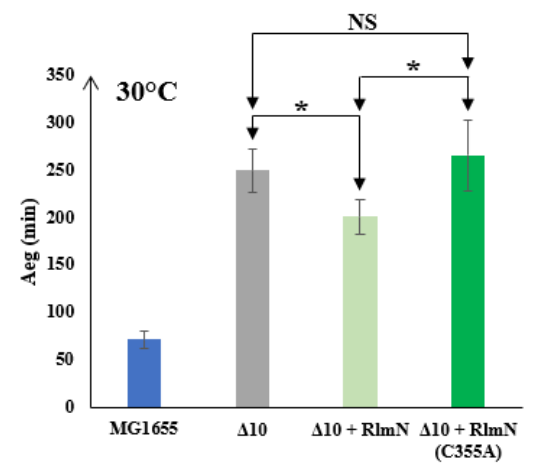
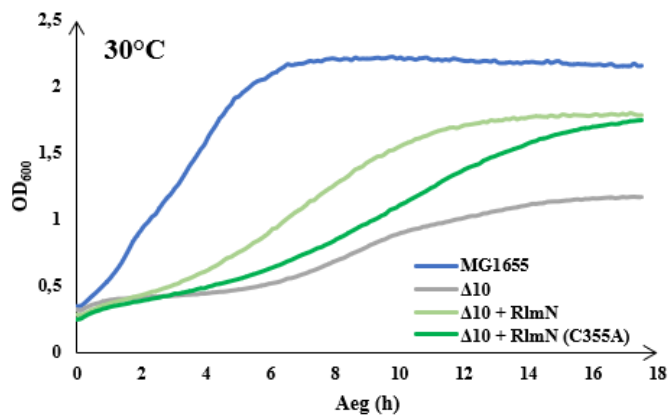
Joonis 6. Natiivset või mutantset RlmB ja RlmN valku ekspresseeriva $\Delta 10$ tüve ribosoomide 23S rRNA nukleosiidne koostis. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi (WT) ja $\Delta 10$ tüve, mis ei ekspresseeri plasmiidilt mainitud modifikatsiooniensüüme. 70S ribosoomidest dissotseeritud 50S subühikutest eraldatud rRNA nukleosiidne koostis määrati RP-HPLC meetodiga. Paneelil A on näidatud Gm (RlmB korral) ja m²G (RlmN korral) modifitseeritud nukleosiididele vastavad HPLC kromatogrammide regioonid. Paneelil B on vastavate piikide pindalad integreeritud ja arvatatud WT suhtes (WT on võetud 1). Valged tulbad on natiivse RlmB või RlmN ja hallid tulbad on mutantse RlmB või RlmN ekspresioonitüved. RP-HPLC katse viis läbi ning tulemusi analüüsis Margus Leppik (TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool).

Tulemused viitavad sellele, et RlmB valgu glutamiin-198, ja RlmN valgu tsüsteiini-355, asendaminealaniiniga toob kaasa vastavalt metüültransferaasse aktiivsuse osalise või täieliku kaotuse. See omakorda kinnitab, et tegu on katalüütiliselt oluliste aminohapetega.

3.3 Modifikatsiooniensüüme RlmB ja RlmN mõju rakkude kasvule

Varasemast on teada, et *rlmB* või *rlmN* geeni deletsioon ei mõjuta märgatavalt *E. coli* kasvu (Lövgren & Wikström, 2001; Toh *et al.*, 2008). Sellest võib jääda mulje, et vastavad modifikatsioonensüümid ja nende poolt sünteesitud modifikatsioonid ei ole rakkudele olulised. Mis on üllatav, sest RlmB on universaalselt konserveerunud ja Gm2251 vastav positsioon asub ribosoomide funktsioneerimise seisukohast olulises P-lingus ning on modifitseeritud bakterite ribosoomidest kuni inimese ribosoomideni (Decatur & Fournier, 2002). Veelgi enam RlmB ortoloog Pet56p on oluline mitokondriaalsete ribosoomide biogeneesil pärmis (Lövgren & Wikström, 2001; Sirum-Connolly & Mason, 1993). Seevastu RlmN metüleerib lisaks rRNA-le ka mitmeid tRNA molekule (Benítez-Páez *et al.*, 2012). Lisaks kulutab rakk modifikatsioonide tegemiseks energiat ja ressursi. Individuaalsete modifikatsioonide olulisust on tihtipeale raske hinnata kuna rRNA modifikatsioonidel võivad olla sarnased või kattuvad funktsioonid. Pealegi võib rRNA modifikatsioonidel olla olulisem roll mingites kindlates tingimustes, näiteks stressi situatsioonides. Sellest lähtuvalt on meie laboris konstrueeritud *E. coli* $\Delta 10$ tüvi, kus kõik PTC modifikatsioonid (k.a RlmB ja RlmN omad) on eemaldatud. $\Delta 10$ tüvi võimaldab hinnata individuaalsete modifikatsioonide olulisust erinevates rakulistes protsessides ja erinevatel kasvutingimustel.

Kõigepealt soovitigi hinnata RlmB ja RlmN ning nende modifikatsioonide olulisust bakteri kasvule. Selleks transformeeriti natiivsed või mutantsed RlmB ja RlmN ekspressiooniplasmiidid $\Delta 10$ tüvesse ja määrati kasvukõverad LB söötmes 37°C ja 30°C juures (joonis 7). Kasvukõvera varajase logaritmilise faasi põhjal arvutati poolestusajad (joonis 7). Võrdluseks kasutati MG1655 metsiktüüpi tüve (WT) ja ilma ekspressiooniplasmiidita $\Delta 10$ tüve. Varasemast on teada, et “tühi“ pHBT plasmiid ise ei mõjuta rakkude kasvu.

A**B****C****D**

Joonis 7. Natiivsete või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN ekspressiooni mõju $\Delta 10$ rakkude kasvule. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi (WT) ja $\Delta 10$ tüve, mis ei ekspresseeri mainitud modifikatsiooniensüüme. Rakke kasvatati mikrotiiterplaadil 150 μ l LB söötmes ligikaudu 10 tundi temperatuuril 37°C (paneel A ja B) või 30°C (paneel C ja D). Iga 7 minuti järel mõõdeti rakukultuuri optilist tihedust 600 nm juures. Joonisel on näidatud igale tüvele iseloomulikud kasvukõverad ja poolestusajad varajases logaritmilises kasvufaasis. Katset korrati kummalgi kasvutemperatuuril vähemalt kaks korda. Kõiki tüvesid kasvatati 2 bioloogilises ja 6 tehnilises korduses. Poolestusaegade varieeruvuse statistilise olulisuse määramiseks kasutati t-testi 95% usaldusväärsusega. Tärniga on märgistatud statistiliselt olulised erinevused, NS (*not significant*) märgistab statistiliselt mitte olulisi erinevusi.

Bakterite kasvufenotüübi iseloomustamiseks vaadeldakse kasvukõverate erinevaid faase. Nimelt *lag*-faasi pikkust, rakkude poolestusaega varajases logaritmilises kasvufaasis ning rakukultuuri tihedust statsionaarses faasis.

37°C juures on metsiktüübi MG1655 rakkude *lag*-faas lühike ja rakukultuuri tihedus statsionaarses faasis üle 2 (OD_{600}) (joonis 7A/B). Poolestusaeg on 37 minutit, mis kinnitab, et MG1655 rakud on kiire kohanemisvõime ja kasvuga. 30°C juures kasvanud MG1655 rakkude (joonis 7C/D) *lag*-faas ja rakukultuuri tihedus statsionaarses faasis ei erine 37°C omast, kuid rakud saavutavad statsionaarse faasi mõni tund hiljem. Erinev on ka 30°C juures kasvanud MG1655 rakkude poolestusaeg, mis on kahekordistunud (72 min) võrreldes 37°C juures kasvanud rakkude poolestusajaga. Sellest järeldub, et madalamatel temperatuuridel on isegi *E. coli* metsiktüüpi rakkude kasv aeglasem.

$\Delta 10$ tüve rakkudel, mis kasvasid 37°C juures (joonis 7A/B), on *lag*-faas veidi pikem kui MG1655 rakkudel ja statsionaarse faasi rakutihedus väiksem. Keskmise poolestusaeg on 129 minutit, mis on ligikaudu 3,5 korda pikem kui metsiktüübi MG1655 rakkude oma. 30°C juures ilmneb $\Delta 10$ rakkude kasvudefekt veelgi selgemini. Kohastumisfaas (*lag*) on märgatavalt pikem kui MG1655 tüvel (joonis 7C/D). Poolestusaeg 30°C juures on nagu MG1655 rakkude puhul samuti pea kaks korda pikem (250 min) kui 37°C juures. Samuti saavutab 30°C juures $\Delta 10$ tüvi statsionaarse faasi märkimisväärselt madalamal rakutihedusel võrreldes metsiktüübiga MG1655. Seega rRNA modifikatsioonide puudumine mõjutab märgatavalt bakterite kasvu ning efekt on suurem madalamatel temperatuuridel. Selline tulemus viitab rRNA modifikatsiooniensüümide olulisusele bakterite kasvus ning eelkõige just suboptimaalsetes kasvutingimustes.

$\Delta 10$ tüvesse modifikatsiooniensüümi RlmB tagasiviimisel 37°C juures mõõdetud kasvukõverate (joonis 7A) *lag*-faasi pikkus ja statsionaarse faasi rakutihedus oluliselt ei muutu võrreldes $\Delta 10$ rakkudega, kuid poolestusaeg on 1,2 korda lühem (105 min). 30°C juures mõõdetud RlmB ekspresseeriva $\Delta 10$ tüve kasvukõvera (joonis 7C) *lag*-faas lüheneb ligikaudu

poole võrra ning statsionaarne faas saavutatakse oluliselt kõrgema rakutiheduse juures võrreldes $\Delta 10$ rakkudega. 30°C kasvanud metüültransferaasi RlmB ekspresseerivate $\Delta 10$ rakkude poolestusaeg on 225 minutit, mis ei ole oluliselt erinev $\Delta 10$ omast. Mutantset RlmB(E198A) ekspresseeriva $\Delta 10$ tüve 37°C juures mõõdetud kasvukõver sarnaneb $\Delta 10$ rakkude omaga. 30°C juures mõõdetud metüültransferaasi RlmB(E198A) sisaldava $\Delta 10$ tüve kasvukõver (joonis 7C) sarnaneb pigem natiivset RlmB ekspresseerivale kui $\Delta 10$ tüvele. Väikesed erinevused on siiski täheldatavad veidi pikema *lag*-faasi ja poolestusaja ning madalama statsionaarse faasi rakutiheduse näol võrreldes natiivse RlmB ekspressioonitüvega. Tuleks aga silmas pidada, et antud mutatsioon ei inaktiveerinud RlmB valku 100% ulatuses (joonis 6) ning isegi osaline Gm2251 modifitseerimine 23S rRNA-s võib kompenseerida $\Delta 10$ kasvudefekti.

Seega, kuigi natiivsel RlmB on väike efekt $\Delta 10$ rakkude kasvudefekti parandamisele 37°C juures, on tegu täiesti märgatava efektiga 30°C juures. 37°C juures RlmB ja RlmB(E198A) metüültransferaase ekspresseerivatel $\Delta 10$ rakkude võrdlusest ilmneb, et Gm2251 modifikatsiooni olemasolu või puudumine 23S rRNA-s oluliselt ei kompenseeri $\Delta 10$ kasvudefekti. Suurem efekt on nähtav 30°C juures kasvatatud rakkude puhul, kus mutantne RlmB küll osaliselt kompenseerib $\Delta 10$ kasvudefekti, kuid mitte samal määral kui natiivne RlmB. Sellest järeldub, et RlmB valgu metüültransferaasne aktiivsus on oluline bakterites eelkõige just suboptimaalsetes kasvutingimustes, aga ei ole välistatud, et RlmB valk omab ka Gm2251 sünteesist sõltumatut funktsiooni. Mis on kooskõlas sellega, et RlmB ortoloog pärmis, Pet56p, on oluline mitokondriaalsete ribosoomide biogeneesil ilma selle metüültransferaasse aktiivsusega (Lövgren & Wikström, 2001; Sirum-Connolly & Mason, 1993).

Natiivset RlmN ekspresseeriva $\Delta 10$ rakkude puhul ei ole 37°C juures mõõdetud kasvukõvera *lag*-faasi pikkus ega statsionaarse faasi rakutihedus märgatavalt erinev $\Delta 10$ rakkude omast (joonis 7B). Väike aga statistiliselt mitteoluline ($\alpha < 0,05$) erinevus on poolestusaegade vahel, kus metüültransferaasi RlmN ekspresseerivate $\Delta 10$ rakkude poolestusaeg on 100 minutit, mis on ligikaudu 1,3 korda lühem kui $\Delta 10$ tüvel. Märgatav efekt ilmneb 30°C juures mõõdetud kasvukõverate puhul (joonis 7D). RlmN modifikatsiooniensüümiga $\Delta 10$ rakkude *lag*-faas on lühenenud ligikaudu 3 korda ja rakkude tihedus statsionaarses faasis on märkimisväärselt suurem kui $\Delta 10$ tüvel. Poolestusaeg RlmN ekspresseerivatel $\Delta 10$ rakkudel on 201 minutit, mis on oluliselt lühem võrreldes $\Delta 10$ tüvega ning viitab RlmN modifikatsiooniensüümi olulisusele suboptimaalsetes kasvutingimustes. Mutantset RlmN(C355A) ekspresseeriva $\Delta 10$ tüve 37°C juures mõõdetud kasvukõvera *lag*-faas ei erine $\Delta 10$ rakkude omast, rakutihedus statsionaarses faasis on $\Delta 10$ tüve omaga võrreldav ning poolestumisaja erinevus ei ole statistiliselt oluline

($\alpha < 0,05$). 30°C juures kasvavate mutantset RlmN(C355) ekspresseerivate $\Delta 10$ rakkude kasvukõvera (joonis 7D) kohanemiskaas (*lag*) on pikem kui natiivse RlmN korral, kuid natukene lühem kui $\Delta 10$ tüvel. Huvitaval kombel, RlmN(C355A) ekspresseeriva $\Delta 10$ tüve poolestusaeg sarnaneb pigem $\Delta 10$ kontrolltüvega, kuid rakutihedus statsionaarses faasis on sarnane natiivse RlmN ekspressiooni omale.

Seega, natiivsel RlmN on väike, kuid märgatav efekt $\Delta 10$ rakkude kasvudefekti parandamisele 37°C juures ja märgatavam efekt 30°C juures. 30°C juures kasvatatud natiivset või mutantset RlmN metüültransferaasi ekspresseerivate $\Delta 10$ rakkude kasvukõverate võrdlus viitab, et tõenäoliselt seisneb metüültransferaasi RlmN olulisus selles, et valk sünteesib m²A modifikatsiooni. Kokkuvõtteks, RlmN poolt sünteesitud m²A modifikatsioon 23S rRNA-s ja osades tRNA-des kompenseerib osaliselt $\Delta 10$ kasvudefekti. Varasemad katsed *rlmN* deletsioonitüvega ($\Delta rlmN$) ei võimaldanud hinnata m²A modifikatsiooni olulisust tõenäoliselt sellepärast (Toh *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010), et mingid muud rRNA modifikatsioonid kompenseerivad m²A puudumist $\Delta rlmN$ tüves. Kuna $\Delta 10$ tüves on teised sama regiooni rRNA modifikatsioonid puudu, siis individuaalsete modifikatsioonide efekt ilmneb paremini.

Bakterite kasvukõverate tulemuste põhjal näib, et soodsates kasvutingimustes (rikas sööde, 37°C) ei ole modifikatsiooniensüümidel RlmB ja RlmN olulist mõju $\Delta 10$ rakkude kasvudefekti kompenseerimisele. Looduses elavad bakterid aga peavad hakkama saama muutuvate elutingimustega kuna toitainete kättesaadavus ja keskkonna tingimused ei ole alati soodsad. 30°C juures on uuritavatel modifikatsiooniensüümidel RlmB ja RlmN märgatav suurem mõju. Võib eeldada, et vähem soodsates tingimustes on nii rRNA modifikatsioonide kui vastavate ensüümide olemasolu rakkudele oluline. Meie laboris konstrueeritud $\Delta 10$ tüvi sobib individuaalsete modifikatsiooniensüümide ja vastavate modifikatsioonide tähtsuse hindamiseks. Tulevikus tasuks uurida RlmB ja RlmN ekspressiooni mõju $\Delta 10$ tüvede kasvule erinevates stressitingimustes, näiteks vaesemas söötmes ja veelgi madalamatel temperatuuridel (nt. 25°C), et hinnata nende modifikatsiooniensüümide mõju kriitilistes tingimustes ning võrrelda selles töös saadud tulemustega.

3.4 Modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN mõju ribosoomide biogeneesile

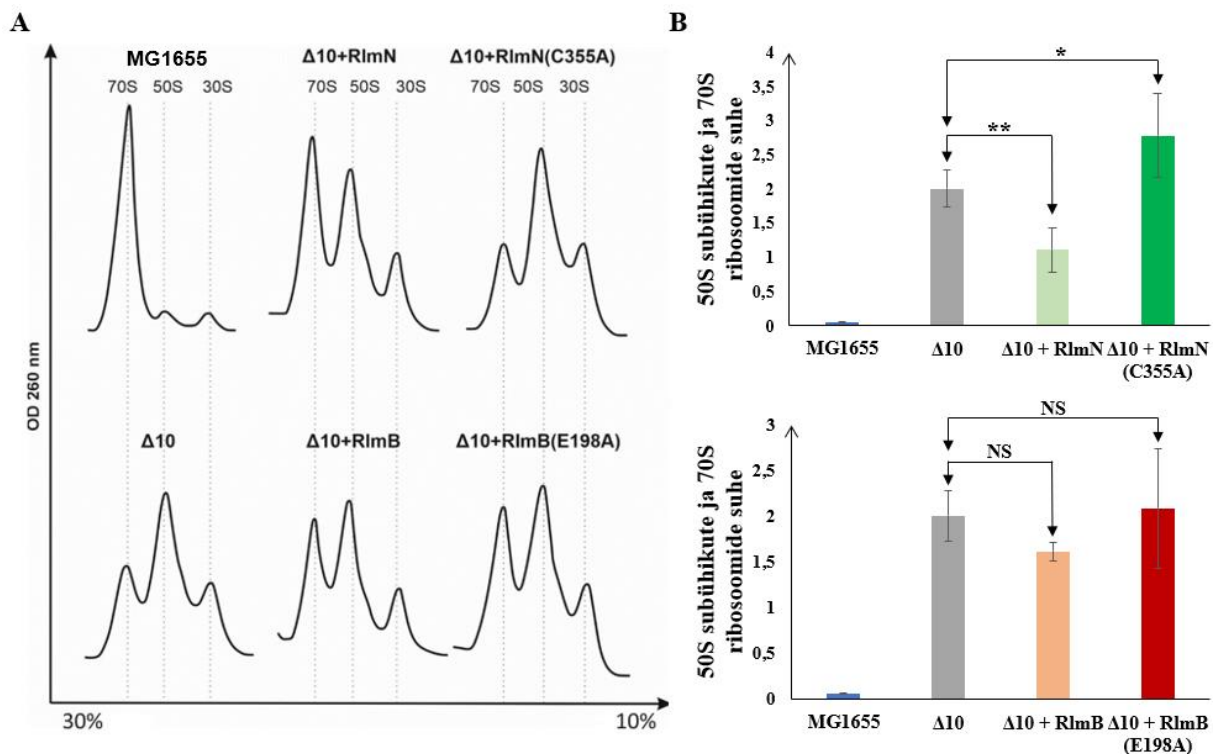
Varasemate katsete põhjal on väidetud, et individuaalsete rRNA modifikatsioonide, sealhulgas RlmB ja RlmN katalüüsivate modifikatsioonide, puudumine ei mõjuta ribosoomide biogeneesi bakteris (Lövgren & Wikström, 2001; Toh *et al.*, 2008). Erandiks on RlmE poolt sünteesitud Um2552 modifikatsiooni puudumine 23S rRNA-s. Nimelt on avastatud, et *rlmE* geeni puudumine rakkudes toob kaasa 50S subühikute eellaspartiklite kuhjumise ja

transleeritavate ribosoomide drastilise vähenemise rakus (Caldas, Binet, Bouloc, & Richarme, 2000).

Seetõttu sooviti uurida, kas modifikatsiooniensüümid RlmB ja RlmN mõjutavad ribosoomide biogeneesi $\Delta 10$ tüves, kus puuduvad kõik PTC modifikatsioonid (tabel 2). Selleks iseloomustati natiivset või katalüütiliselt inaktiivset RlmB ja RlmN ekspresseerivate $\Delta 10$ tüvede ribosoomide profile. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi tüve ning $\Delta 10$ tüve, mis ei ekspresseeri uuritavaid modifikatsiooniensüüme. Rakke kasvatati rikkas söötmes 37°C juures hilise ekponentsiaalse faasini, misjärel rakud lüüsi ja lüsaat fraktsioneeriti 10-30% sahharoosgradiendil ultratsentrifuugimisega. Ribosoomide profiilid määrati 260 nm juures. Hindamaks erinevust 70S ribosoomide ja 50S subühikute hulgas erinevate tüvede vahel, arvutati 50S/70S partiklite suhe. Selleks digitaliseeriti ribosoomiprofiilid ning määrati 70S ja 50S fraktsioonidele vastavad pindalad, kasutades ImageJ arvutiprogrammi.

E. coli MG1655 metsiktüüpi tüves domineerivad 70S ribosoomid (joonis 8A) ning vabu 50S ja 30S subühikuid on vähe. 50S/70S subühikute suhe (joonis 8B) on MG1655 rakkudel 0,06. See tähendab, et enamused vastvalminud subühikutest moodustavad kiiresti 70S ribosoomid, mis on võimelised valgusünteesi läbi viima.

$\Delta 10$ tüve rakkudes, kus on deleteeritud mitmed rRNA modifikatsiooniensüümide geenid (tabel 2), mis sünteesivad modifikatsioone 23S rRNA V domeenis, kuhjuvad vabad 50S subühikud ning 70S ribosoomide fraktsioon on väike (joonis 8A). 50S/70S suhe on ≈ 2 . See on ligikaudu 33 korda suurem võrreldes MG1655 rakkudega (joonis 8B), mis näitab, et vabu 50S subühikuid on palju rohkem võrreldes metsiktüüpi rakkudega viidates 50S subühiku biogeneesi defektile $\Delta 10$ tüves. See tulemus on igati ootuspärane, sest $\Delta 10$ tüvest on deleteeritud teiste seas ka *rlmE* metüültransferaasi geen, mille puudumist on juba varasemast seostatud 50S subühikute biogeneesi defektiga (Caldas, Binet, Bouloc, & Richarme, 2000).



Joonis 8. Natiivse või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN ekspressiooni mõju Δ10 ribosoomide biogeneesile. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi (WT) ja Δ10 tüve, mis ei ekspresseeri mainitud modifikatsioonensüüme. Rakke kasvatati rikkas söötmes 37°C juures $OD_{600} \approx 1,5$ ning ribosoomide profiilid määrati saharoosigradiendis ultratsentrifuugimisega. Katset korrati kolm korda ja joonisel on näidatud igale tüvele iseloomulikud ribosoomide profiilid. Gradiendiprofiilid visualiseeriti ImageJ programmiga. Välja on toodud 70S ribosoomidele ning 50S ja 30S subühikutele vastavad fraktsioonid (paneel A). Y-telg tähistab neelduvust 260 nm juures ning X-telg tähistab gradiendi suunda. Erinevate katseeriade tulemusena saadud ribosoomide profiilidest arvutati 70S ribosoomide ja vabade 50S subühikute pindala. Paneelil B on näidatud profiilide põhjal arvatud vabade 50S subühikute ja 70S ribosoomide (50S/70S) suhted. Graafikul on esitatud keskmised suhted kahe bioloogilist replikaadi kahe või enama tehnilise replikaadi kohta. Suhete statistilise olulisuse määramiseks kasutati t-testi 95% usaldusväärsusega. Tärniga on märgistatud statistiliselt olulised erinevused, NS (*not significant*) märgistab statistiliselt mitte olulisi erinevusi.

Natiivse metüültransferaasi RlmB tagasiviimine Δ10 rakkudes ei paranda oluliselt ($\alpha < 0,05$) ribosoomide biogeneesi. RlmB ekspresseerivatel Δ10 rakkudel on 70S ribosoomide rohkem kui Δ10 tüvel, kuid siiski on domineerivateks vabad 50S subühikud (joonis 8A). 50S/70S suhe on 1,6, mis on Δ10 rakkudega võrreldes 1,25 korda väiksem (joonis 8B). Seega natiivse RlmB ekspressioon ei kompenseeri oluliselt Δ10 tüve ribosoomide biogeneesi fenotüüpi. Katalüütiliselt inaktiivset RlmB(E198A) ekspresseerivate Δ10 rakkude ribosoomide profiil (joonis 8A) sarnaneb RlmB ekspresseerivate Δ10 rakkude omaga. Samamoodi on rohkem 70S ribosoomide kui Δ10 rakkudel, aga domineerivateks on vabad 50S subühikud. Lisaks on nii natiivset kui mutantset RlmB metüültransferaasi ekspresseeriva Δ10 tüve profiilil selgelt eristatav vabade 50S subühikute “õlg” viidates heterogeensele 50S eellaspartiklite

populatsioonile. Sellest järeldub, et antud katsesüsteemis nii RlmB katalüüsitava modifikatsioonil kui valgul endal puudub oluline efekt ribosoomide biogeneesile.

Metüültransferaasi RlmN ekspresseerimine $\Delta 10$ rakkudes märgatavalt parandab ribosoomide biogeneesi. See ilmneb suurenenud 70S ribosoomide hulgas võrreldes $\Delta 10$ rakkudega (joonis 8A). Kuigi ribosoomide profiilil on märgata 50S subühikute "õlg" on 50S/70S suhe 1,1, mis on 1,8 korda väiksem võrreldes $\Delta 10$ rakkude suhtega (joonis 8B). Sellest järeldub, et natiivse RlmN valgu ekspresseerimisel on oluline $\Delta 10$ tüve ribosoomide biogeneesi fenotüüpi kompenseeriv efekt. Mutantset RlmN(C355) metüültransferaasi ekspresseerivatel $\Delta 10$ rakkudel sarnaneb ribosoomide profiil pigem algse $\Delta 10$ tüve profiiliga. Domineerivateks on 50S subühikud ning vähem esineb 70S ribosoomide. 50S/70S suhe on 2,8, mis on isegi suurem kui alguses $\Delta 10$ tüves. Kuna katalüütiliselt inaktiivne RlmN ei kompenseeri $\Delta 10$ tüve ribosoomide biogeneesi fenotüüpi, siis järelikult m²A2503 modifikatsioon 23S rRNA-s on oluline 50S subühikute biogeneesil. Kuigi ei saa välistada, et m²A37 modifikatsioon tRNA-des mõjutab 50S subühikute biogeneesi, on see ülimalt ebatõenäoline. Kuidas täpselt m²A2503 modifikatsioon 23S rRNA-s mõjutab 50S ribosoomide sünteesimist ei ole teada.

Kokkuvõtteks, ei RlmB valk ega selle poolt katalüüsitav modifikatsioon Gm 23S rRNA positsioonis 2251 ei mõjuta oluliselt $\Delta 10$ rakkude ribosoomide biogeneesi. Seevastu, oluline efekt ilmneb aga modifikatsiooniensüümi RlmN puhul. RlmN katalüüsitav modifikatsioon m²A 23S rRNA positsioonis 2503 omab olulist positiivset mõju ribosoomide 50S subühikute biogeneesile $\Delta 10$ tüves.

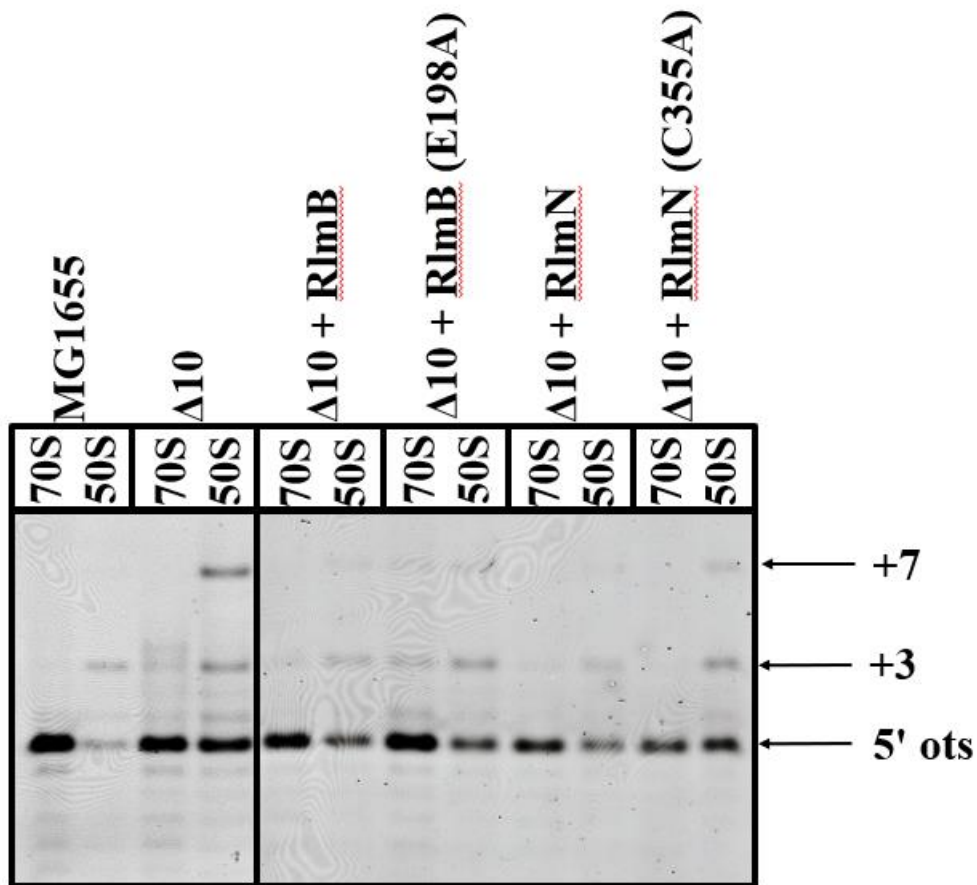
Vabade 50S subühikute kuhjumine rakus viitab probleemidele 50S biogeneesil (Arai *et al.*, 2015). Ribosoomide biogenees koosneb rRNA ja r-valkude sünteesist ning järk-järgulisest assambleerumisest subühikuteks, mille käigus modifitseeritakse nii rRNA-d kui r-valke ja toimub rRNA otsade protsessimine nukleasid poolt. Kõige aeglasemaks etapiks 50S moodustumisel ongi subühiku lõplik "küpsemine" kui kõik r-valgud on juba assambleerunud ja 50S sedimentatsioonikoefitsient on saavutatud. Valdav enamus 50S rRNA modifikatsioone sünteesitakse varajases assambleerumise faasis (Siibak & Remme, 2010). Hilises aeglasemas faasis toimuvad tõenäoliselt rRNA struktuurilised ümberkorraldused ja rRNA otste protsessimine. 23S rRNA 5' otsa lõplik protsessimine toimub alles siis, kui 50S on juba lülitunud 70S ribosoomi (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007).

$\Delta 10$ tüves kuhjunud vabade 50S subühikute näol tegu tõenäoliselt ebaküpsete 50S eellaspartiklitega, kus kõik r-valgud on juba olemas, aga rRNA ei ole veel lõplikult protsessitud. Kõikide r-valkude olemasolu kinnitas ka Kaspar Reieri (TÜMRI molekulaarbioloogia

õppetool) poolt läbiviidud $\Delta 10$ tüve vabade 50S subühikute mass-spektromeetria analüüs. Hindamaks rRNA “küpsust“ vabades 50S subühikutes, määrati 23S rRNA 5' otsa pikkus. 23S rRNA 5' otsa pikkus on indikaator 50S partiklite “küpsuse“ kohta. Selleks eraldati rRNA 70S ribosoomidest ja vabadest 50S subühikutest ning 23S rRNA 5' otsa pikkused määrati praimerekstensiooni analüüsiga kasutades pöördtranskriptaasi ning fluorestseeruvalt märgistatud praimerit (tabel 3). Reaktsiooniproductid lahutati polüakrüülamiidgeelis elektroforeesil ning visualiseeriti fluorestseeruva märke abil.

MG1655 rakkude 70S ribosoomis on lõplikult protsessitud 23S rRNA ja vaba 50S subühiku fraktsioonides esineb nii “küpsuse“ 5' otsaga kui 3 nukleotiidi pikemat (+3) 23S rRNA-d sisaldavaid partikleid (joonis 9). See on eeldatav tulemus, sest nagu mainitud, lõplik protsessimine toimubki alles 70S ribosoomis. $\Delta 10$ tüve vaba 50S fraktsioonist eraldatud 23S rRNA hulgas esineb lisaks “küpsuse“ 5' otsaga ja kolme lisa nukleotiidiga 23S rRNA-le ka olulisel määral seitse nukleotiidi pikema 5' otsaga 23S rRNA, mis näitab $\Delta 10$ tüve 50S fraktsiooni suuremat heterogeensust kui metsiktüüpi tüves. See kinnitab veelkord $\Delta 10$ tüves esinevat 50S subühikute biogeneesi defekti.

Nii natiivsed kui mutantsed metüültransferaasid RlmB ja RlmN leevendavad $\Delta 10$ tüve 50S biogeneesi defekte, sest esineb vähem partikleid, kus 23S rRNA on seitse nukleotiidi pikem (joonis 9). Natiivne ja mutantne RlmB leevendavad 50S biogeneesi defekti enam-vähem sarnaselt. Natiivsel RlmN valgul on aga märgatav efekt, sest seitse nukleotiidi pikemat 23S rRNA-d sisaldavaid partikleid esineb väga vähe. Mutantse RlmN korral ei esine samaväärset efekti, millest järeldub, et m²A2503 modifikatsioon on 50S biogeneesi jaoks oluline $\Delta 10$ tüves. Praimerekstensiooni tulemused on heas kooskõlas ribosoomide profiilide analüüsi tulemustega.



Joonis 9. Natiivse või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN ekspressioonimõju $\Delta 10$ ribosoomide 23S rRNA 5' otsa protsessimisele. rRNA eraldati natiivset või mutantset RlmB või RlmN ekspresseerivatest $\Delta 10$ rakkudest isoleeritud 70S ribosoomidest ja vabast 50S subühikutest. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi ja $\Delta 10$ tüve. 23S rRNA 5' otsa pikkus määrati praimerekstensiooniga kasutades fluorestseeruva märkega praimerit. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooniproduktid lahutati polüakrüülamiidgeelil ning visualiseeriti Typhoon Trio fluoro/fosfovisualiseeriaga. Toodud on iseloomulik geelipilt kolmest kordusest. Kokku on liidetud kaks erinevat polüakrüülamiidgeeli pilti. +3 ja +7 tähistavad vastavalt kolme ja seitset lisanukleotiidi 23S rRNA 5' otsas.

Lähtuvalt praimerekstensiooni tulemustest, nii natiivne kui mutantne RlmB vabastab 50S biogeneesi $\Delta 10$ tüves. See viitab RlmB valgule metüültransferaasest aktiivsusest sõltumatu funktsioonile 50S subühikute biogeneesis. See on kooskõlas RlmB ortoloogi Pet56p metüültransferaasest aktiivsusest sõltumatu funktsioonile pärmi mitokondriaalsete ribosoomide biogeneesis (Sirum-Connolly & Mason, 1993). RlmN modifikatsiooni olemasolul taastub $\Delta 10$ rakkudes 50S subühikute 23S rRNA-s 5' otsa protsessimine peaaegu MG1655 tasemeni. Sellest järeldub, et RlmN metüültransferaasi poolt katalüüsitud modifikatsioon on ribosoomi biogeneesi seisukohast oluline. 23S rRNA m²A2503 modifikatsiooni täpne funktsioon ribosoomide biogeneesis on intrigeeriv ja vajab edasist uurimist.

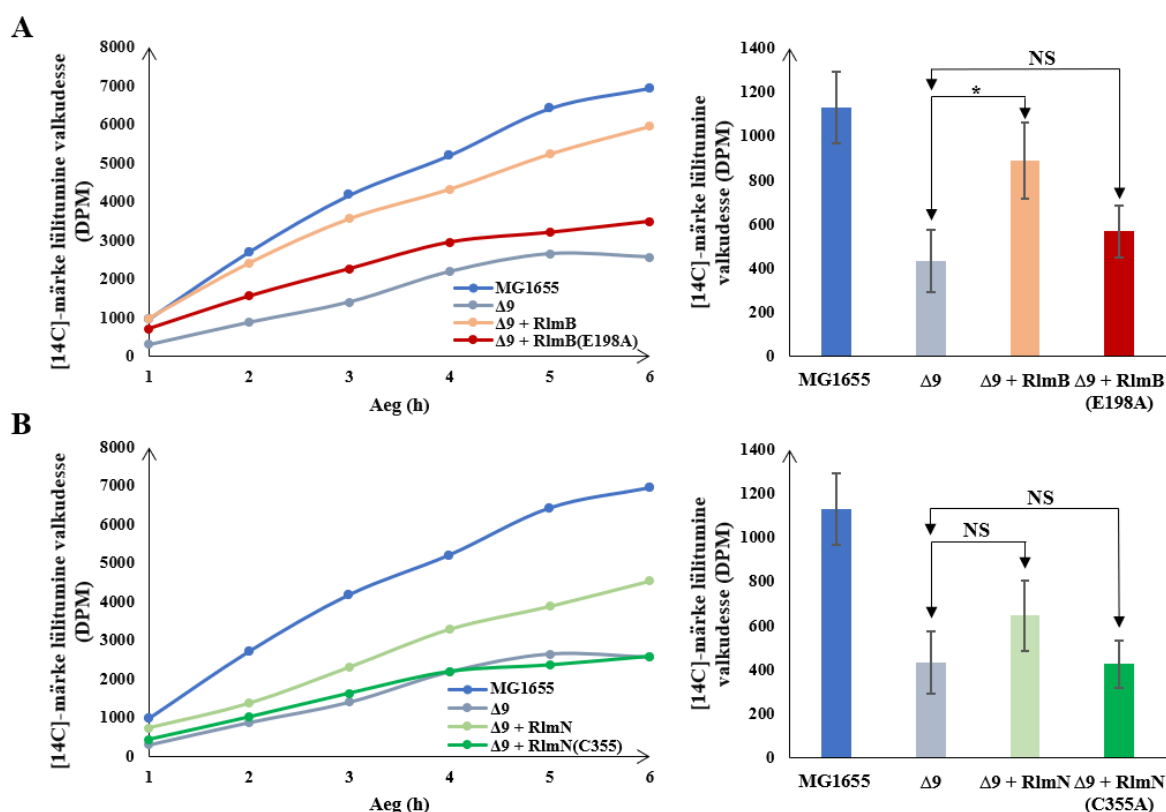
3.5 Modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN mõju translatsioonile

Kuna eelnevatest katsetest selgus, et eelkõige RlmN, aga vähemal määral ka RlmB, on olulised ribosoomide biogeneesis, siis järgnevalt sooviti vaadata, kas need modifikatsiooniensüümid mõjutavad ribosoomide funktsioneerimist. Selleks hinnati RlmB ja RlmN mõju $\Delta 9$ mitmikdeletsioonitüve *in vivo* translatsioonile. $\Delta 9$ tüve kasutati seetõttu, et erinevalt $\Delta 10$ tüvest, selles ekspresseeritakse genoomselt DNA-lt modifikatsiooniensüümi RlmE (tabel 2). RlmE valgul on oluline roll ribosoomide biogeneesile ja selle puudumine kas individuaalselt ($\Delta rlmE$ tüve korral) või koos teiste rRNA modifikatsiooniensüümidega $\Delta 10$ tüves põhjustab drastilist, bakterite kasvu ja ribosoomi biogeneesi defekti (joonised 7, 8 ja 9), mis raskendavad *in vivo* translatsiooni katse läbiviimist (Arai *et al.*, 2015; Caldas, Binet, Bouloc, & Richarme, 2000).

In vivo translatsiooni eksperimendi jaoks kasvatati *E. coli* MG1655 metsiktüüpi tüve, $\Delta 9$ tüve ning natiivseid või mutantseid RlmB ja RlmN valke ekspresseerivaid $\Delta 9$ tüvesid 25°C juures [¹⁴C]-märgistatud aminohapete juuresolekul, mida ribosoomid lülitavad värskelt sünteesitavatesse valkudesse. Katset viidi läbi 25°C juures seetõttu, et uusi ribosome sellel temperatuuril praktiliselt ei sünteesita ning on võimalik hinnata olemasolevate ribosoomide funktsionaalsust. Iga tunni aja tagant koguti proov, millest sadestati valgud triklooräädikhappega (TCA) ning koguti filtreerile. Valkudesse lülitunud [¹⁴C]-märgistatud stsintillatsiooni loenduri abil. Saadud tulemuste põhjal koostati graafik [¹⁴C]-märgistatud lülitumise sõltuvus ajast (joonis 10). Selle põhjal arvatud tõusud võimaldavad hinnata valgusünteesi suhtelist efektiivsust erinevates tüvedes.

Metsiktüüpi MG1655 rakkudes on radioaktiivselt märgistatud aminohapete lülitamine valkudesse suhteliselt efektiivne (joonis 10). $\Delta 9$ rakkudes toimub valgusüntees võrreldes MG1655 tüvega 2,6 korda aeglasemalt (joonis 10), mis viitab 23S rRNA modifikatsiooniensüümide olulisusele ribosoomide funktsioneerimisel. Metüültransferaasi RlmB tagasiviimine $\Delta 9$ tüvesse suurendab valgusünteesi kiirust 2 korda võrreldes $\Delta 9$ rakkudega (joonis 10). Katalüütiliselt inaktiivset RlmB(E198A) ekspresseerivate $\Delta 9$ rakkude puhul radioaktiivsete aminohapete lülitamine valkudesse kiireneb 1,3 korda võrreldes $\Delta 9$ tüvega (joonis 10), mis ei ole statistiliselt oluline ($\alpha < 0,05$). RlmB(E198A) väike mõju valgusünteesile võib tuleneda sellest, et antud mutantne valk on siiski võimeline vähesel määral sünteesima modifikatsiooni Gm2251 23S rRNA-s (joonis 6). Natiivset modifikatsiooniensüümi RlmN ekspresseerivate $\Delta 9$ rakkude translatsiooni kiirus samuti suureneb võrreldes $\Delta 9$ tüvega, kuid erinevus on väike ja statistiliselt mitteoluline (joonis 10). Mutantse RlmN(C355A) ekspresseerivate $\Delta 9$ rakkude puhul ei ilmne erinevusi võrreldes natiivsete $\Delta 9$ rakkudega (joonis

10). Sellest järeldub, et m²A2503 modifikatsiooni mõju translatsioonile on väike kui üldse esineb.



Joonis 10. Natiivse või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN ekspressiooni mõju translatsioonile $\Delta 9$ rakkudes. Võrdluseks analüüsiti MG1655 metsiktüüpi (WT) ja $\Delta 9$ tüve, mis ei ekspresseeri mainitud modifikatsiooniensüüme. Rakke kasvatati 25°C juures [¹⁴C]-märgiga aminohapete juuresolekul ning iga tunni aja tagant määrati valkudesse lülitunud [¹⁴C]-määrke hulk. Joonisel on näidatud [¹⁴C]-määrke lülitumine valkudesse sõltuvalt ajast. Tõusude järgi on arvutatud suhteline [¹⁴C]-määrke lülitumise (valgusünteesi) efektiivsus igas tüves. Tulemused on esitatud vähemalt kolme korduskatse keskmisena koos standarhälvetega. Statistiline olulisus määrati t-testiga 95% usaldusväärsusega. Tärniga on märgistatud statistiliselt olulised erinevused, NS (*not significant*) märgistab statistiliselt mitte olulisi erinevusi.

RlmB katalüüsitav modifikatsioon omab märgatavat efekti translatsioonile, kahekordistades [¹⁴C]-määrke valkudesse lülitumise suhtelist efektiivsust $\Delta 9$ tüves. Seega on modifikatsiooniensüüm RlmB oluline *Escherichia coli*'s. Antud katsesüsteem võimaldab esmakordselt näidata, et modifikatsioonil Gm2251 on oluline roll ribosoomide funktsioneerimisel bakteris. Selline tulemus ei ole üllatav, sest Gm2251 modifikatsioon on kõrgelt konserveerunud ja paikneb 23S rRNA P-lingus. P-ling on oluline P-saidi tRNA 5' CCA otsa korrektsele positsioneerimisele peptidüültransferaasi tsentris, mis on omakorda äärmiselt oluline peptidüültransferaasi reaktsiooni toimumiseks (Lövgren & Wikström, 2001; Polikanov *et al.*, 2015; Voorhees *et al.*, 2009). Samuti on RlmB valgul metüültransferaasest aktiivsusest

sõltumatu efekt ribosoomide biogeneesile $\Delta 10$ tüves, sarnanedes selle poolest ortoloogile Pet56p pagaripärmi rakkudes (Lövgren & Wikström, 2001; Sirum-Connolly & Mason, 1993).

RlmN katalüüsiv modifikatsioon omab väikest positiivset mõju ribosoomi funktsioneerimisele $\Delta 9$ tüves. See on huvitav kuna RlmN on duaalse-spetsiifikaga ja lisaks rRNA-s katalüüsitava m^2A2503 modifikatsioonile modifitseerib nelja tRNA-d positsioonis 37 (m^2A37) (Benítez-Páez *et al.*, 2012). Seetõttu võiks eeldada RlmN valgult suuremat mõju kuna nii 23S rRNA kui tRNA-d on olulised translatsioonil. Metüültransferaasi RlmN deletsioonitüve (*ArImN*) puhul on näidatud, et suureneb stopp-koodonite (UAG) läbilugemine, mis huvitaval kombel tuleneb m^2A modifikatsiooni puudumisest 23S rRNA-s mitte tRNA-des (Benítez-Páez *et al.*, 2012). Antud modifikatsioon paikneb kaugel 30S subühikus paiknevast dekodeerivast tsentrist, mis vastutab translatsiooni täpsuse eest. Nimelt asub m^2A2503 PTC lähedal peptiidi väljumistunnelis ning osaleb tunneli seina moodustamisel (Ban *et al.*, 2000; Polikanov *et al.*, 2015; Toh *et al.*, 2008). Tulemuse esmakordselt näitavad, et m^2A2503 on oluline ribosoomi 50S subühiku biogeneesil, kuid selle täpne funktsioon ei ole teada. Kokkuvõtteks, rRNA modifikatsioonientsüümide mitmikdeletsioonitüvesid kasutades on võimalik näha individuaalsete modifikatsioonide efekte, mis üksikdeletsioonitüvede puhul ei pruugi ilmned.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata modifikatsiooniensüümide RlmB ja RlmN ning nende poolt sünteesitud 23S rRNA modifikatsioonide olulisust *Escherichia coli*'s. Selleks vaadati natiivse või katalüütiliselt inaktiivse RlmB ja RlmN mõju bakterite kasvule, ribosoomide biogeneesile ja funktsioneerimisele kasutades *Escherichia coli* tüvesid, millest on deleteeritud 23S rRNA PTC regiooni modifitseerivad ensüümid.

Katsete tulemustest selgus, et modifikatsiooniensüümide RlmB või RlmN ekspresseerimine *Escherichia coli* $\Delta 10$ tüves ei avalda rakkude kasvule 37°C juures olulist efekti. Suboptimaalsetel tingimustel (30°C juures kasvades) on nii RlmB kui RlmN modifikatsiooniensüümidel väike, kuid mõõdetav $\Delta 10$ tüve kasvudefekti kompenseeriv mõju. RlmN poolt sünteesitud 23S rRNA modifikatsioonil (m^2A2503) on $\Delta 10$ rakkude kasvufenotüübi kompensatsioonile 30°C juures statistiliselt oluline efekt. Selle alusel võib oletada, et rRNA modifikatsioonidel on suurem mõju ebasoodsates tingimustes.

RlmN on oluline $\Delta 10$ tüve ribosoomide biogeneesi fenotüübi kompenseerimisel. RlmN valgu tagasiviimisel $\Delta 10$ rakkudesse suureneb 70S ribosoomide osakaal 1,8 korda võrreldes algse $\Delta 10$ tüvega. Samuti on RlmN ekspresseerivatel $\Delta 10$ rakkudel märkimisväärselt vähenenud 50S partiklite osakaal, mis sisaldavad protsessimata 23S rRNA-d. Kuna katalüütiliselt inaktiivse RlmN valgu korral seda ei täheldatud, siis võib järeldada, et just m^2A2503 modifikatsioon on oluline 50S subühikute biogeneesil. Lisaks on m^2A2503 modifikatsioonil väike kompenseeriv mõju $\Delta 9$ rakkude translatsiooni defektile 25°C juures.

Vastupidiselt, RlmB on oluline $\Delta 9$ tüve translatsiooni fenotüübi kompenseerimisel. Natiivse, kuid mitte katalüütiliselt inaktiivse RlmB, valgu tagasiviimisel suureneb märgatavalt *in vivo* translatsiooni efektiivsus $\Delta 9$ tüves, järelikult on just Gm2251 modifikatsioon oluline ribosoomide funktsioneerimisel. Modifikatsiooniensüümi RlmB ekspresseerimine $\Delta 10$ rakkudes ei mõjuta oluliselt ribosoomide profiili, kuid soodustab 23S rRNA 5' otsa protsessimist.

Varasema kirjanduse põhjal ei avalda *rlmB* või *rlmN* geeni deleteerimine olulist mõju bakterite elulemusele. Kui aga deleteeritud on lisaks *rlmN* ja *rlmB* geenidele veel teisedki 23S rRNA modifikatsiooniensüümid ning PTC regioon on modifitseerimata, siis esineb bakteritel drastiline kasvu ja ribosoomide biogeneesi ning funktsioneerimise defekt. Kui sellisesse tüvesse viia tagasi RlmB või RlmN, siis toimub osaline kasvu kompensatsioon eelkõige just suboptimaalsel kasvutemperatuuril. Lisaks selgus et, RlmN poolt sünteesitud m^2A2503 modifikatsiooni on oluline ribosoomide biogeneesil. Seevastu RlmB poolt sünteesitud Gm2251

kompenseerib pigem *in vivo* translatsiooni defekti. RlmB metüültransferaasne aktiivsus ei pruugi olla hädavalik selle mõjule ribosoomide biogeneesis (23S rRNA protsessimine) ning seega võib RlmB valgul olla rakus mitu funktsiooni. Kokkuvõtteks, *E. coli* rRNA modifikatsioonientsüümide mitmikdeletsioonitüved võimaldavad analüüsida individuaalsete modifikatsioonide olulisust, mida on seni olnud raske hinnata tulenevalt modifikatsioonide funktsioonide kattuvusest rakus.

Importance of ribosome modification enzymes RlmB and RlmN

Varvara Maksimtšuk

SUMMARY

Protein synthesis, performed by the ribosome, is a crucial process in all organisms. The bacterial ribosome (70S) is composed of two subunits: the small (30S) and the large (50S) subunits. Most of the ribosomal RNA modifications are located in the 50S peptidyl transferase center (PTC) formed by 23S rRNA domain V. This center is responsible for catalyzing peptide bond formation during protein synthesis. The vast majority of the individual modifications do not appear to be significant for the biogenesis or functioning of the bacterial ribosomes. However, the significance of rRNA modifications is difficult to assess due to their potentially redundant functions and cumulative effects.

This study aims to analyze the effects of *Escherichia coli* modification enzymes RlmB and RlmN on cell growth, ribosome biogenesis, and functioning using multideletion strains, that lack rRNA modifications in the PTC region.

The results of the experiments revealed that the expression of modification enzymes RlmB or RlmN in the *Escherichia coli* $\Delta 10$ strain does not have a significant effect on cell growth at 37°C. Under suboptimal conditions (30°C), both RlmB and RlmN proteins have a small but measurable compensatory effect on the growth defect of the $\Delta 10$ strain. Based on this, it appears that rRNA modification enzymes have a greater effect in unfavorable conditions.

RlmN can partially compensate for the ribosome biogenesis phenotype of the $\Delta 10$ strain. Upon reintroduction of the RlmN protein into $\Delta 10$ cells, the proportion of 70S ribosomes increases 1.8-fold compared to the original $\Delta 10$ strain. Also, RlmN-expressing $\Delta 10$ cells have a significantly reduced proportion of 50S particles containing unprocessed 23S rRNA. As this was not observed in the case of the catalytically inactive RlmN protein, it can be concluded that the modification of m²A2503 is important for the biogenesis of 50S subunits. In addition, the m²A2503 modification has a small compensatory effect on the translational phenotype of $\Delta 9$ cells at 25°C.

In contrast, RlmB can partially compensate for the translational phenotype of the $\Delta 9$ strain. When the native, but not catalytically inactive, RlmB protein is re-introduced, the translation efficiency of $\Delta 9$ increases significantly, therefore, it is the modification Gm2251 that is important for the functioning of ribosomes. Expression of the modification enzyme RlmB in

$\Delta 10$ cells does not significantly affect the ribosome profile but promotes 23S rRNA 5' end processing.

Taken together, based on the literature, deletion of the *rlmB* or *rlmN* gene has no significant effect on bacterial growth. However, if in addition to the *rlmN* and *rlmB* genes, other 23S rRNA modification enzymes are deleted and the PTC region is unmodified, the cells experience drastic growth, ribosome biogenesis, and functioning defects. When RlmN or RlmB is re-introduced into this strain, partial growth compensation occurs, especially at suboptimal temperatures. In addition, it was revealed that the m²A2503 modification synthesized by RlmN is important for ribosome biogenesis. In contrast, Gm2251, synthesized by RlmB, instead compensates for the *in vivo* translation defect. The methyltransferase activity of RlmB may not be essential for its significance in ribosome biogenesis (23S rRNA processing), and thus the RlmB protein may have multiple functions in the cell. In conclusion, multideletion strains of *E. coli* rRNA modification enzymes allow the analysis of the significance of individual modifications, which has been difficult to assess until now due to the overlapping functions of the modifications in the cell.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agris, P. F. (1996). The importance of being modified: Roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 53, 79–129.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4(1), 71–76.
- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), E4707–E4716.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481), 905–920.
- Benítez-Páez, A., Villarroya, M., & Armengod, M.-E. (2012). The Escherichia coli RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy. *Rna*, 18(10), 1783–1795.
- Besançon, W., & Wagner, R. (1999). Characterization of transient RNA-RNA interactions important for the facilitated structure formation of bacterial ribosomal 16S RNA. *Nucleic acids research*, 27(22), 4353–4362.
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., & others. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *science*, 277(5331), 1453–1462.
- Boal, A. K., Grove, T. L., McLaughlin, M. I., Yennawar, N. H., Booker, S. J., & Rosenzweig, A. C. (2011). Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme. *Science*, 332(6033), 1089–1092.
- Brimacombe, R., Mitchell, P., Osswald, M., Stade, K., & Bochkariov, D. (1993). Clustering of modified nucleotides at the functional center of bacterial ribosomal RNA. *The FASEB journal*, 7(1), 161–167.
- Brimacombe, R., & Stiege, W. (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *Biochemical Journal*, 229(1), 1.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., & Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of Escherichia coli is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16414–16419.

- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., & Richarme, G. (2000). Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um2552 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 714–718.
- Chow, C. S., Lamichhane, T. N., & Mahto, S. K. (2007). Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS chemical biology*, 2(9), 610–619.
- Conrad, J., Sun, D., Englund, N., & Ofengand, J. (1998). The *rluC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18562–18566.
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). RRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344–351.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Inverse polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb-prot095166.
- Green, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 679–716.
- Grove, T. L., Benner, J. S., Radle, M. I., Ahlum, J. H., Landgraf, B. J., Krebs, C., & Booker, S. J. (2011). A radically different mechanism for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Science*, 332(6029), 604–607.
- Gustafsson, C., Reid, R., Greene, P. J., & Santi, D. V. (1996). Identification of new RNA modifying enzymes by iterative genome search using known modifying enzymes as probes. *Nucleic acids research*, 24(19), 3756–3762.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–580.
- Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic acids research*, 34(2), 721–733.
- Kaczanowska, M., & Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 477–494.
- Kamminga, L. M., Luteijn, M. J., Den Broeder, M. J., Redl, S., Kaaij, L. J., Roovers, E. F., Ladurner, P., Berezikov, E., & Ketting, R. F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *The EMBO journal*, 29(21), 3688–3700.
- Kim, D. F., & Green, R. (1999). Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Molecular cell*, 4(5), 859–864.
- Klein, D. J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2004). The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *Rna*, 10(9), 1366–1379.

- Lane, B., Ofengand, J., & Gray, M. (1995). Pseudouridine and O²-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. *Biochimie*, *77*(1–2), 7–15.
- Lewicki, B. T., Margus, T., Remme, J., & Nierhaus, K. H. (1993). Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly in vivo: Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *Journal of molecular biology*, *231*(3), 581–593.
- Lilleorg, S., Reier, K., Remme, J., & Liiv, A. (2017). The intersubunit bridge B1b of the bacterial ribosome facilitates initiation of protein synthesis and maintenance of translational fidelity. *Journal of Molecular Biology*, *429*(7), 1067–1080.
- Lövgren, J. M., & Wikström, P. M. (2001). The rlmB gene is essential for formation of Gm2251 in 23S rRNA but not for ribosome maturation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *183*(23), 6957–6960.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, *19*(6), 560–567.
- Michel, G., Sauv e, V., Larocque, R., Li, Y., Matte, A., & Cygler, M. (2002). The Structure of the RlmB 23S rRNA Methyltransferase Reveals a New Methyltransferase Fold with a Unique Knot. *Structure*, *10*(10), 1303–1315. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00852-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00852-3)
- Montgomery, T. A., Rim, Y.-S., Zhang, C., Downen, R. H., Phillips, C. M., Fischer, S. E., & Ruvkun, G. (2012). PIWI associated siRNAs and piRNAs specifically require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog henn-1. *PLoS genetics*, *8*(4), e1002616.
- Noller, H. F. (2005). RNA structure: Reading the ribosome. *Science*, *309*(5740), 1508–1514.
- Noller, H. F., & Woese, C. R. (1981). Secondary structure of 16 S ribosomal RNA. *Science*, *212*(4493), 403–411.
- Ofengand, J., & Del Campo, M. (2004). Modified nucleosides of *Escherichia coli* ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, *1*(1).
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., Stepanov, V. G., Gaucher, E. A., Grover, M. A., Harvey, S. C., & others. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic acids research*, *41*(15), 7522–7535.

- Polikanov, Y. S., Melnikov, S. V., Söll, D., & Steitz, T. A. (2015). Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. *Nature structural & molecular biology*, *22*(4), 342–344.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, *108*(4), 557–572.
- Schlueder, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., & others. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *cell*, *102*(5), 615–623.
- Schmeing, T. M., & Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, *461*(7268), 1234–1242.
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. *Trends in biochemical sciences*, *28*(6), 329–335.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy IV, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., & Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70 S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, *313*(5795), 1935–1942.
- Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S., & Dontsova, O. A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nature chemical biology*, *14*(3), 226–235.
- Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *71*(4), 1342–1346.
- Siibak, T., & Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *Rna*, *16*(10), 2023–2032.
- Sirum-Connolly, K., & Mason, T. L. (1993). Functional requirement of a site-specific ribose methylation in ribosomal RNA. *Science*, *262*(5141), 1886–1889.
- Smith, J. E., Cooperman, B. S., & Mitchell, P. (1992). Methylation sites in Escherichia coli ribosomal RNA: Localization and identification of four new sites of methylation in 23 S rRNA. *Biochemistry*, *31*(44), 10825–10834.
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., & Miller, N. E. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: Functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic acids research*, *29*(5), 1097–1106.
- Srivastava, A. K., & Schlessinger, D. (1990). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annual review of microbiology*, *44*(1), 105–129.

- Toh, S.-M., Xiong, L., Bae, T., & Mankin, A. S. (2008). The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *Rna*, *14*(1), 98–106.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., & Mankin, A. S. (2010). The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide. *The EMBO journal*, *29*(18), 3108–3117.
- Voorhees, R. M., Weixlbaumer, A., Loakes, D., Kelley, A. C., & Ramakrishnan, V. (2009). Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nature structural & molecular biology*, *16*(5), 528–533.
- Wang, K.-T., Desmolaize, B., Nan, J., Zhang, X.-W., Li, L.-F., Douthwaite, S., & Su, X.-D. (2012). Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m⁷G2069 and m²G2445 modifications in Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic acids research*, *40*(11), 5138–5148.
- Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2007). The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *42*(3), 187–219.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, *407*(6802), 327–339.
- Yan, F., & Fujimori, D. G. (2011). RNA methylation by radical SAM enzymes RlmN and Cfr proceeds via methylene transfer and hydride shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(10), 3930–3934.
- Yan, F., LaMarre, J. M., Röhrich, R., Wiesner, J., Jomaa, H., Mankin, A. S., & Fujimori, D. G. (2010). RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(11), 3953–3964.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J., & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *science*, *292*(5518), 883–896.

LIHTLITSENTS

Mina, Varvara Maksimtšuk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Ribosoomi modifikatsiooniensoomide RlmB ja RlmN tähtsus“, mille juhendaja on PhD Rya Ero, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Varvara Maksimtšuk

29.05.2023