

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Natalja Garber

**Kimäärse pseudouridiini süntaasi spetsiifika iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Margus Leppik

TARTU 2014

## Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Ribosoomi struktuur.....	7
1.1.2 Ribosomaalne RNA.....	8
1.1.4 Ribosoomi suur subühik.....	9
1.1.5 Subühikutevahelised sillad.....	10
1.1.6 Heeliks-ling 69.....	11
1.2 Ribosomaalse RNA modifikatsioonid.....	13
1.2.1 Pseudouridiin.....	14
1.2.2 Pseudouridiini süntaasid.....	14
1.2.3 Pseudouridiini süntaas RluD.....	15
2. Eksperimentaalne osa.....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Transformatsioon.....	19
2.2.2 Plasmiidse DNA eraldamine minipreparatsiooni meetodil.....	19
2.2.3 Rakkude kasvatamine ja lüüs.....	20
2.2.4 Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendis.....	20
2.2.5 Ribosomaalsete subühikute sadestamine.....	21
2.2.6 rRNA puhastamine.....	22

2.2.7 HPLC analüüs (high-performance liquid chromatography) .....	23
2.2.8 Pseudouridiinide määramine .....	24
2.2.9 Praimeriekstentsioon .....	25
2.3 Tulemused ja arutelu .....	27
2.3.1 Kimäärse pseudouridiini süntaasi C4DK mõju ribosoomiprofilile.....	27
2.3.2 Pseudouridiinide hulga detekteerimine HPLC analüüsil .....	29
2.3.3 Heeliks-lingu 69 pseudouridiinide süntees .....	31
2.3.4 Arutelu.....	33
Kokkuvõte .....	37
Summary.....	38
Tänuavaldused.....	39
Kirjanduse loetelu.....	40
Kasutatud veebiaadressid .....	45
Lisad .....	46
Lisa 1.....	46
Lisa 2.....	47
Lihtlitsents .....	48

## Kasutatud lühendid

70S- prokarüoodi ribosoom

50S- prokarüoodi ribosoomi suur subühik

30S- prokarüoodi ribosoomi väike subühik

Amp- ampitsiliin

CMCT- N-tsökloheksüül-N'-(2-morfoliinoetüül)-karbodimiid Meto-p-tolusulfonaat

dNTP- desoksünukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

dNTP(-C)- 110mM dNTP, milles on vähenadatud dCTP kontsentratsioon (6mM)

FS- formamiidi stop

HB- hübridisatsiooni puhver

HPLC - high-performance liquid chromatography

IPTG- isopropüültio- $\beta$ -D-galaktosiid

Km- kanamütsiin

LLP- lüüsi lahjenduspuhver

OD- optiline tihedus

PTC- peptidüültransferaasne tsester

RB- reaktsiooni puhver

RluD- ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas D

RluC- ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas C

rRNA- ribosomaalne RNA

RT- pöördtranskriptaas

RT-STOP- pöördtranskriptaasi stop

U- ühik

$\beta$ -ME- 2-merkaptetanool

$\Psi$ - pseudouridiin

## Sissejuhatus

Ribosoom on kaheosaline molekulaarne masin, mis on leitud kõikidest identifitseeritud organismidest. *E. coli* ribosoomid, mis on väga hästi uuritud, koosnevad kolmest rRNA-st ja umbes 53 valgust (Wittmann, 1982). mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vaheline õige seondumine on translatsioonis tähtis. Ribosoom vahendab seda interaktsiooni kõrge täpsuse ja kiirusega. Valgusünteesi käigus lisatakse kasvavasse valgu ahelasse 10-20 aminohapet sekundis ja samas tekib ainult üks viga igal 3000 koodoni kohta (Wilson ja Nierhaus, 2003).

rRNA sisaldab palju posttranskriptsioonilisi modifikatsioone. Kõige levinum posttranskriptsiooniline modifikatsioon rRNA-s on pseudouridiin. Pseudouridiin on leitud enamikust struktuursetest RNA-dest: rRNA, tRNA ja snRNA. Pseudouridiini tekkimise eest vastutavad pseudouridiini süntaasid, mis ei vaja pseudouridiini tekkimiseks lisa energiat ega faktoreid. Kõik pseudouridiini süntaasid on väga spetsiifilised oma substraatide suhtes, siiski ei ole siiani selge, kuidas enamik pseudouridiini süntaase sellise spetsiifilisuse saavutab (Gutgsell jt., 2005). Enamik rRNA pseudouridiini süntaase sisaldab valgu N-terminaalses otsas S4-sarnast domeeni. On spekuleeritud, et S4-sarnane domeen on oluline pseudouridiini süntaasi spetsiifilisuse tagamisel, kuid tema täpne roll on siiani ebaselge (Sivaraman jt., 2004).

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada varasemalt konstrueeritud kimäärse pseudouridiini süntaasi (C4DK), mis sisaldas RluD katalüütilist domeeni ja RluC S4-sarnast domeeni, substraadi spetsiifikat *in vivo*, mis võimaldaks heita valgust S4-sarnase domeeni funktsioonile pseudouridiini süntaasides. Teiseks eesmärgiks on välja selgitada, millist efekti omab sellise kimäärse pseudouridiini süntaasi ekspresserimine rakkude elutegevusele, rRNA modifitseerimisele ja ribosoomi assambleerumisele.

## 1. Kirjanduse ülevaade

### 1.1 Ribosoomi struktuur

Ribosoom on valk-RNA kompleks, mille ülesanne on valkude sünteesimine kõikides rakkudes. Ribosoom on kõige suurem tänaseks teada olev naturaalne ribosüüm, mis omab sünteetilist aktiivsust (Rodnina jt., 2006). Ribosoom on transleerija, mille ülesanne on lugeda mRNA koodonite järjestust, et sünteesida tRNA-de vahendusel sellele vastav aminohappeline järjestus. Translatsioon on kiire protsess. Üks ribosoom lisab sünteesitavasse valgu ahelasse 10-20 aminohapet sekundis (Wilson jt., 2002). Bakteri ribosoom koosneb rohkem kui 4000 ribonukleotiidist ja 54-st erinevast valgust ning tema molekulmass ületab 2,5 miljonit Daltonit (Wilson ja Nierhaus, 2003).

Kõik ribosoomid koosnevad suurest ja väikest subühikust, mis peavad translatsiooni toimumiseks omavahel korrektselt interakteeruma (Tissières ja Watson, 1958). Bakteri ribosoomi suurt ja väikest subühikut, nimetatakse 50S ja 30S subühikuteks, mis omavahelise interakteerumise tulemusel moodustavad funktsionaalse 70S ribosoomi. S-väärtused tulenevad vastavalt nende partiklite sedimentatsiooni kiirusele tsentrifuugimisel, kus S tähendab Svedbergi ühikut. Sedimentatsioon sõltub molekuli massist ja geomeetrisest vormist

([http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg\\_unit.html](http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg_unit.html)).

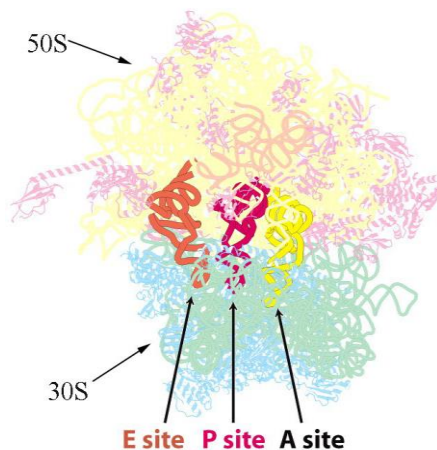
Bakteri suur subühik koosneb 23S rRNA-st ja 5S rRNA-st ning 33 ribosomaalsest valgust (L-valgust) (Tabel 1). Väike subühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 ribosomaalsest valgust (s-valgust) (Tabel 1) (Wilson jt., 2002).

**Tabel 1.** *E. coli* ribosoomi koostis.

Subühikud	rRNA	Ribosomaalsete valkude arv
50S	23S (2900 nt), 5S (120 nt)	33
30S	16S (1500 nt)	21

Ribosoomil on tRNA sidumiseks kolm saiti mida nimetatakse A, P ja E saitideks (Joonis 1) vastavalt sellele, milline tRNA sellesse saiti seondub (Wilson jt., 2002). A saiti ehk akseptorsaiti seondub aminoatsüül tRNA (aa-tRNA). P saiti, seondub peptidüül-tRNA ja E

sait ehk exit sait on deatsüleeritud tRNA seondumiseks (Joonis 1). Need seondumissaidid on olemas mõlemates ribosoomi subühikutes (Wilson jt., 2002). tRNA läheb translatsiooni jooksul läbi kõigi seondumissaitide, alustades A saidist, läbi P saidi ja E saiti, misjärel see väljub ribosoomist (Wilson ja Nierhaus, 2003).



**Joonis 1. tRNA seondumissaidid ribosoomis.** Ülemise noolega on tähistatud suur subühik ja alumise on väike subühik. Nooltega on tähistatud A, P ja E saidid, kuhu seondub vastav tRNA (Tymoczko jt., 2013).

### 1.1.2 Ribosomaalne RNA

Valdava enamus rakkudes leiduvast RNA-st moodustavad mRNA-d, rRNA-d ja tRNA-d. mRNA funktsiooniks on viia DNA-s talletatud geneetiline informatsioon ribosoomi. tRNA transpordib ribosoomi valgusünteesiks vajalikud aminohapped. rRNA ülesandeks on vahendada mRNA ja tRNA omavahelist interaktsiooni, mis on korrektse valgusünteesi eelduseks ja katalüüsida peptidüüli transferaasset reaktsiooni. Eukarüoosis sünteesitakse rRNA molekulid raku tuumas ja transporditakse seejärel tsütoplasmasse, kus toimub ribosoomi subühikute assambleerimine. Prokarüootides toimub rRNA sünteesimine ja ribosoomi assambleerimine tsütoplasmas. Suured rRNA molekulid omavad täpselt defineeritud sekundaarstruktuuri, ja see struktuur on konserveerunud üle liikide (Brimacombe ja Stiege, 1985) (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/502158/ribosomal-RNA-rRNA>).

Suur subühik sisaldab alati 5S rRNA molekuli, mis on leitud kõikidest elusorganismide ribosoomi suure subühiku koosseisust ja see mängib olulist rolli ribosoomi assambleerimisel ja funktsioonil (Shpanchenko jt., 1998). 5S peamiseks funktsiooniks on siduda omavahel 23S rRNA domeene II ja V (Lisa 1) (Sergiev jt., 2000). Erinevalt ülejäänud ribosomaalsetest RNA-dest ei ole 5S rRNA-st leitud modifitseeritud nukleotiide (Silberklang jt., 1983). Elusloodusest on leitud veel väikseid rRNA-sid, mida nimetatakse 5.8S rRNA (eukarüoodis) ja 5S rRNA analoogid, mis on 4.5S rRNA (kloroplastis) ja 2S rRNA (*D. melanogaster*) mis kuuluvad suure ribosomaalse subühiku koosseisu (Silberklang jt., 1983).

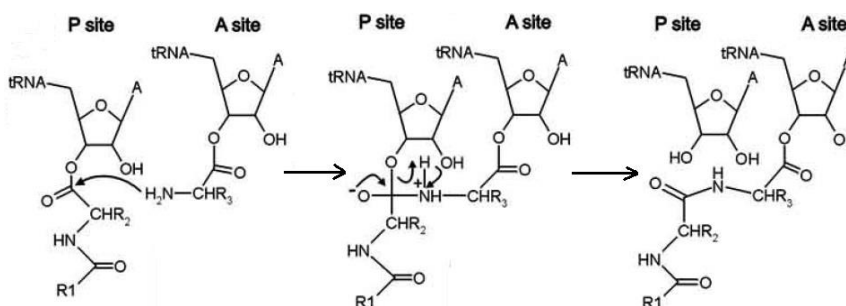
Bakteri suure ribosomaalse subühiku koosseisu kuulub ka 23S rRNA, mis jaotakse sekundaarstruktuuri alusel kuueks domeeniks (Wilson jt., 2002) ja mis sisaldab üle 100 heeliksi (Lisa 1). 23S rRNA domeenid II, IV ja V sisaldavad suhteliselt palju konserveerunud heelikseid ja post-transkriptsioonilisi modifikatsioone (Noller jt., 1981). 23S rRNA õige kokku pakkimine on eelduseks funktsionaalse PTC moodustumiseks, kus toimub peptiidideme süntees (Katunin jt., 2002; Polacek ja Mankin, 2005).

30S partikli koosseisu kuulub 16S rRNA, mille struktuur sisaldab 50 heeliksit ja mis on sekundaarstruktuuri alusel jagatud neljaks domeeniks (Woese jt., 1980). Need domeenid on: 5' domeen, tsentraalne domeen, 3' suur domeen ja 3' väike domeen (Lisa 2). Erinevalt 23S rRNA-st moodustavad 16S rRNA sekundaarstruktuuri domeenid ka 30S tertsiaarstruktuuris eraldiseisvad osad mida tinglikult nimetatakse peaks, platvormiks ja kehaks. 16S rRNA 5' domeen moodustab 30S partikli keha, tsentraalne domeen moodustab platvormi, 3' suur domeen moodustab pead. (Joonis 3A) (Wilson jt., 2002).

#### **1.1.4 Ribosoomi suur subühik**

50S subühik on poolkera kujuline läbimõõduga 250 Å. Suure subühiku ülemise otsa moodustavad 3 kühmu. Tsentraalne kühm sisaldab 5S rRNA-d ja temaga seotud valke. Parem kühm sisaldab ribosomaalseid valke L7/L12 ja vasak kühm sisaldab ribosomaalset valku L1 (Moore ja Steitz, 2003) (Joonis 3B). 50S-si sisaldab spetsiaalset tunnelit, mille kaudu sünteesitav valk liigub PTC-st tsütoplasmasse. Tunneli pikkus on umbes 100 Å, diameeter umbes 20 Å ja see mahutab 30 ja 50 aminohappe jääki kasvavast polüpeptiidi ahelast. (Wilson jt., 2002; Wilson ja Nierhaus, 2003).

Suur ribosomaalne subühik sisaldab peptidüüli transferaasset tsentrit (PTC) kus toimub valgusünteesi reaktsiooni katalüüsimine (Ban jt., 1999). PTC lokaliseerub 50S subühiku struktuuris tsentraalse kühmu all (Joonis 3B) (Wilson jt., 2002). Peptidüüli transferaasi reaktsioon toimub siis, kui P saidis on peptidüül-tRNA, A saidis on aminoatsüül-tRNA ja E sait on vaba (Wilson jt., 2002). Peptiidsideme moodustumisel osaleb aa-tRNA  $\alpha$ -aminogrupp, mis atakeerib süsinikku karbonüülgruppi, mis on seotud peptidüül-tRNA-s tRNA 3' osaga, lõpuks moodustub uus peptiidside (Joonis 2). Peale peptidüüli transferaasi reaktsiooni tekib uus peptidüül-tRNA A saiti, mille peptiidahel on ühe aminohappe võrra pikem, kui oli eelnevalt. P saiti jääb deatsüleeritud tRNA, mis liigub translokatsiooni ajal ribosoomi E saiti ja väljub viimase kaudu ribosoomist. Peale translokatsiooni jääb ribosoomi A sait vabaks uue aa-tRNA sidumiseks (Wilson jt., 2002).



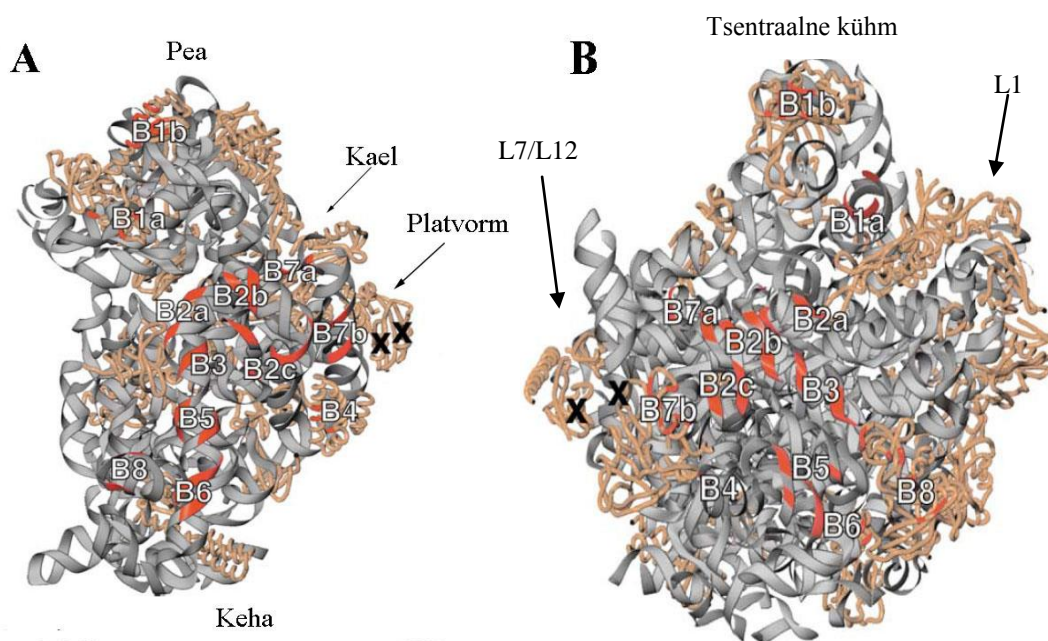
**Joonis 2. PTC reaktsioon.** Joonisel on nädatud reaktsioonid, mis toimuvad A ja P saidi tRNA-de vahel peptidüüli transferaasi reaktsiooni käigus (Wilson jt., 2002).

### 1.1.5 Subühikutevahelised sillad

*E. coli* ribosomaalsed subühikud on ühendatud 12 subühikutevahelise silla abil, mis hõlmavad kokku üle 30 individuaalse subühikutevahelise interaktsiooni. (Yusupov jt., 2001). Kõik *T. Thermophilus*-sest leitud sillad on sarnased *E. coli*-st leitud subühikutevaheliste sildadega. Selline sarnanus tuleb sellest, et enamus subühikutevahelisi sildu on konserveerunud üle liikide (Gao jt., 2003). Sillad mängivad translatsioonis tähtsat rolli, näiteks seovad need subühikuid omavahel valkude sünteesil (Liiv ja O'Connor, 2006).

Üle 80% *E. coli* subühikutevahelistest sildadest sisaldab kontakte 16S rRNA heliksiga 23, 24 (tsentraalne domeen) ja 44 (3' väike domeen) 30S subühikust (Lisa 2) ja 23S rRNA heliksiga 64 ja 67-71 (IV domeen) 50S subühikust (Lisa 1) (Gao jt., 2003). Subühikutevahelised sillad jagatakse kolmeks grupiks: RNA-RNA, valk-RNA ja valk-valk

sillad. RNA-RNA kontaktid asuvad ribosoomis tsentraalselt ja RNA-RNA sildadeks on B2a, B2b, B2c, B3 ja B7a (Joonis 3). Ülejäänud kontaktid, mis sisaldavad ühe või mõlema komponendina valke, asuvad ribosoomi keskosast eemal ja sellega eemal ka funktsionaalsest saitidest ning nendeks sildadeks on B1a, B1b, B7b, B8, B4, B5 ja B6 (Joonis 3).



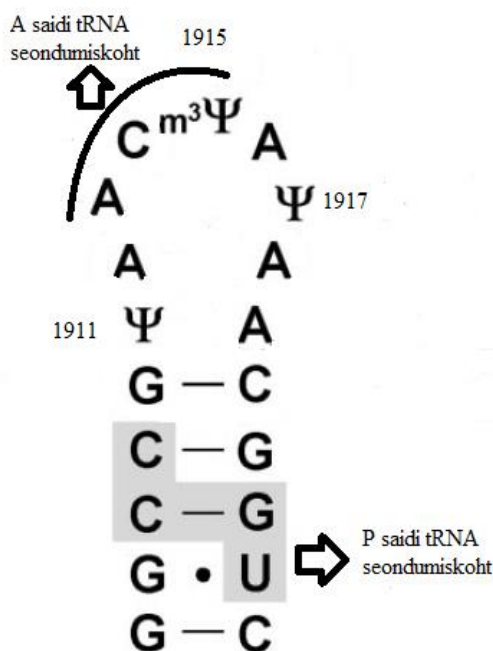
**Joonis 3. Ribosomaalsete subühikute struktuurid.** A: 30S-i poolsete subühikute vahelised kontaktid (punased) ja nooltega on tähistatud väikse subühiku osad (pea, kael, platvorm ja keha). B: 50S-i poolsete subühikute vahelised kontaktid (punased) ja nooltega on märgitud kühmud (L7/L12, tsentraalne ja L1). RNA on värvitud halliga ja valgud on kuldsed. Muudetud Gao jt., tööst (Gao jt., 2003).

### 1.1.6 Heeliks-ling 69

Ribosomaalne RNA mängib olulist rolli ribosoomi struktuuris ja funktsioonis. Heeliks 69 (23S rRNA nukleotiidid 1906-1924 *E. coli* numeratsiooni järgi) (Joonis 4), on kõrgelt konserveerunud heeliks-ling. H69 asub 23S rRNA IV domeenis (Lisa 1) ja sisaldab pseudouridiine positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Joonis 4) (Liiv jt., 2005). H69 interakteerub 16S rRNA h44-ga moodustades subühikutevahelise silla B2a (Joonis 3 B) (Hirabayashi jt., 2006), H69 annab kontakte ka A- ja P-saidi tRNA-dega. Kui ribosoomist deleteerida H69 siis see põhjustab bakterikultuuri aeglast kasvu ja *in vitro* katsetes on näha

subühikute assotsiatsiooni defekte (Sakakibara ja Chow, 2012). Spekuleeritakse, et heeliks 69 aitab tRNA-I õigesti seonduda peptidüültransferaasesse tsentrisse (Ali jt., 2006).

Heeliksi 69 funktsiooni uurimiseks on kasutatatud SSER (systematic selection of functional sequences by enforced replacement) meetodid. Selle meetodi järgi on võimalik uurida ja identifitseerida *E. coli* 23S rRNA järjestusi, mis on ribosoomi funktsiooniks vajalikud (Hirabayashi jt., 2006). Uuringud viitavad, et 23S rRNA nukleotiidid A1912 ja U1917, mis asuvad H69 lünga osas, on vajalikud ribosoomi funktsiooniks (Hirabayashi jt., 2006).



**Joonis 4. Heeliks 69 sekundaarstruktuur.** Joonisel on tähistatud H69 järjestus, sekundaarstruktuur ja tRNA-ga kontakteeruvad piirkonnad. Samuti on näidatud RluD poolt sünteesitud pseudouridiinid positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (muudetud pilt Hirabayashi jt., 2006 tööst).

H69 mutatsiooniallüüsi ja IPTG ekspressiooni süsteemi abil on välja selgitatud, et mutatsioonid positsioonides (A1912G, Ψ1917C ja A1919G) põhjustavad suurt kasvu fenotüüpi ja mutatsioonid positsioonides (Ψ1911C, A1913G, C1914A ja A1918G) põhjustavad nõrka kasvu defekti. Mutatsioonid (Ψ1917C, A1919G ja A1912G) inhibeerivad translatsiooni *in vitro* (Liiv jt., 2005). Seega kõik tulemused viitavad sellele, et tegemist on ribosoomi funktsiooniks äärmiselt tähtsa elemendiga.

## 1.2 Ribosomaalse RNA modifikatsioonid

rRNA-d, tRNA-d ja sno-RNA-d sisaldavad posttranskriptsiooniliselt modifitseeritud nukleotiide. 95% *E. coli* ja *S. cerevisiae* rRNA-de modifikatsioone on lokaliseeritud funktsionaalselt olulistesse regioonidesse (Rodnina jt., 2011). Sellisteks regioonideks on peptidüültransferaasne tsepter ja dekodeerimis tsepter (Tabel 2) (Kipper jt., 2011). Suurem osa rRNA modifikatsioone paiknevad erinevatel organismidel samas kohas, kui vaadata rRNA struktuuri. *E. coli* rRNA modifikatsioonide analooge on leitud ka imetajate rakkude rRNA-dest. Modifitseeritud nukleotiidide lokaliseeritus ei ole juhuslik. Seda näitab ilmekalt rRNA tertsaarstruktuur, mille järgi modifikatsioonid on klasterdunud suuresti kohtadesse, millele on omistatud ribosoomis funktsionaalselt olulise rolli (Rodnina jt., 2011).

Modifikatsioonide arv varieerub erinevatel organismidel. Pärmide rRNA sisaldab rohkem kui 100 ja selgroogsete rRNA rohkem kui 200 modifikatsiooni (Piekná-Przybylska jt., 2008).

Iga rRNA modifikatsioon on sünteesitud spetsiifilise ensüümi abil. *E. coli* rakkudest on leitud 32 rRNA modifikatsiooni ensüümi, 25 nendest on metüültransferaasid ja 7 pseudouridiini süntaasid (Siibak ja Remme, 2010). rRNA modifikatsiooni ensüümid on võimalik jagada kolmeks klassiks vastavalt sellele, millises *in vivo* ribosoomi assembleerimise etapis nad rRNA-d modifitseerivad. Modifikatsiooni ensüümid jagatakse siis vastavalt varajasteks, keskmisteks ja hilisteks ensüümideks (Siibak ja Remme, 2010).

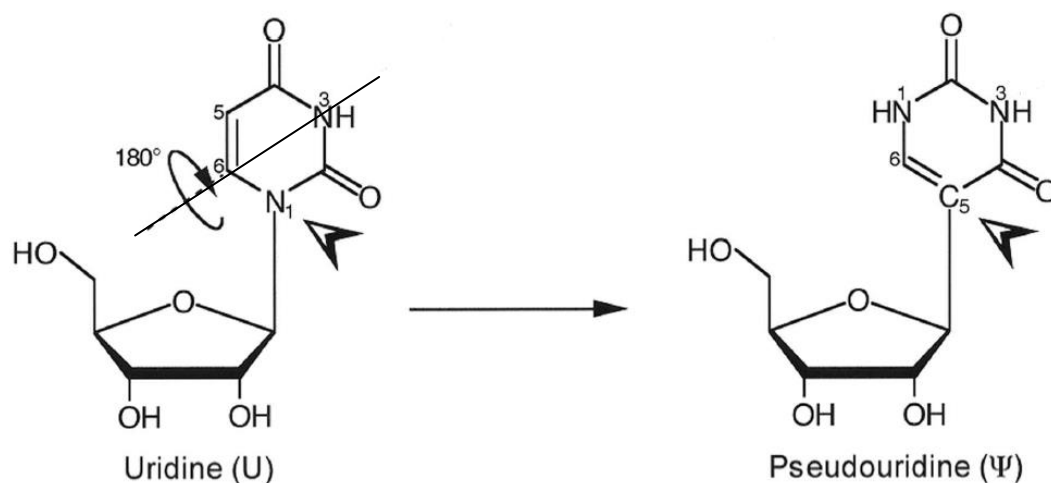
**Table 2. *E. coli* ja *S. cerevisiae* ribosomaalsete RNA-de modifikatsioonide võrdlus.** Tabelis on toodud rRNA modifikatsioonid suures ja väikses subühikutes (Decateur ja Fournier, 2002).

Ribosoomi suur subühik			Ribosoomi väike subühik		
rRNA koht/liik	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	rRNA koht/liik	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
A sait	5	10	A sait	1	4
P sait	4	3	P sait	3	3
E sait	0	3	E sait	0	2
PTC	11	14	Heeliks 44	3	1
Polüpeptiidne väljumise tunnel	18	37	mRNA sidumise tunnel	2	4
Suühikute vahelised sillad	5	14	Subühikute vahelised sillad	6	8
Kokku	24	74	Kokku	11	34

### 1.2.1 Pseudouridiin

Pseudouridiinid ( $\Psi$ ) sünteesitakse posttranskriptsiooniliselt pseudouridiini süntaaside poolt. (Huang jt., 1998; Charette ja Gray, 2000).  $\Psi$  on leitud erinevat liiki RNA-dest: tRNA, rRNA, snRNA ja snoRNA.  $\Psi$  tekkib isomerisatsiooni käigus uridiinist (U) (Joonis 5) (Ofengand jt., 2001).

Pseudouridiin (5-ribosüüluratsiil) on kõige levinum modifikatsioon ribosomaalses RNA-s. Pseudouridiini arv varieerub erinevates organismides. Näiteks *Sulfolobus solfataricus* sisaldab vähem pseudouridiine, kui eubakter, aga *Haloarcula marismortui* sisaldab rohkem  $\Psi$ . *E. coli* ja *Bacillus subtilis* RNA väikses subühikus on ainult üks  $\Psi$ , samal ajal *Saccharomyces cerevisiae*-s on 14. Suures subühikus on vähemalt 4  $\Psi$  (*Halobacter halobium*) ja suures subühikus on alati rohkem pseudouridiine võrreldes väikse subühikuga (Ofengand jt., 2001) (Ofengand, 2001).



**Joonis 5.** Joonisel on toodud pseudouridiini teke isomerisatsiooni käigus. Uridiini lämmastikalus on pööratud  $180^\circ$  ümber C6 ja N3 telje. Pseudouridiinis on lämmastik alus seotud suhku alusega C5-C1 sidemega, aga uridiinis N1-C1 sidemega (näidatud noolega). Isomerisatsiooni reaktsiooni tagajärjel on tekkinud lämmastikalusesse üks lisa vesiniksideme doonor positsiooni N1 (Charette ja Gray, 2000).

### 1.2.2 Pseudouridiini süntaasid

Pseudouridiini süntaasid katalüüsivad isomerisatsiooni reaktsiooni, mille käigus muudetakse uridiin pseudouridiiniks (Joonis 5). Pseudouridiini süntaasid on nagu teisedki modifikatsiooni ensüümid spetsiifilised kindlas RNA positsioonis asuva nukleotiidi suhtes (Ramamurthy jt.,

1999). Kõik pseudouridiini süntaasid sisaldavad katalüütilist aspartaati mis viitab konserveerunud katalüütilisele mehhanismile (Ramamurthy jt., 1999). *E. coli* RNA sisaldab 11 pseudouridiini süntaasi, mis jagatakse homoloogia alusel viieks grupiks (Gutgsell jt., 2005):

- RsuA, RluE, RluB ja RluF kuuluvad RsuA perekonda;
- RluA, RluC, RluD ja TruC kuuluvad RluA perekonda
- TruA, TruB ja TruD ise moodustavad igaüks omaette perekonnad.

Kõik pseudouridiini süntaasid on spetsiifilised vaid kindla substraadi suhtes (Gutgsell jt., 2005). Iga pseudouridiini süntaas vastab kindla pseudouridiini tekkimise eest, kuid üks süntaas võib vastutada mitme pseudouridiini tekkimise eest. RluA perekonnast kaks süntaasi RluC ja RluD sünteesivad mõlemad 23S rRNAse kolm pseudouridiini vastavalt positsioonidesse 955, 2504, 2580 ja 1911, 1915, 1917 (Ofengand jt., 2001). RluA ise on samuti multispetsiifiline ensüüm, mis vastustab pseudouridiini tekkimise eest 23S rRNA positsiooni 746 ja tRNA positsiooni 32 (Hoang jt., 2006; Raychaudhuri jt., 1999).

On spekulatsioonid, et RluD võib muuta pseudouridiiniks kõik uridiinid, mis paiknevad H69 lingu regioonis või selle lähedal kuni G•U paarini (Joonis 4) (Ofengand jt., 2001). See spekulatsioon on osutunud siiski valeks ja RluD tunneb väga spetsiifiliselt ära vaid uridiini positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Leppik jt., 2007). RluC isomeriseerib spetsiifiliselt kolme uridiini, mis ei oma mingeid sarnasusi ei primaar, ega sekundaarstruktuuri tasemel. Samuti ei ole RluC substraadid 23S rRNA tertsiaarstruktuuris üksteise läheduses. Seega pole RluC substraadi äratundmise mehhanism veel selge (Ofengand jt., 2001).

Kindel mehhanism, mille abil enamuse pseudouridiini süntaase oma substraadid ära tunnevad on praegu veel teadmata. On spekulatsioonid, et nendel süntaasidel, mille koostises on S4-sarnane domeen, vastutab S4 ensüümi õigetesse kohta seondamise eest (Sivaraman jt., 2004).

### **1.2.3 Pseudouridiini süntaas RluD**

RluD on pseudouridiini süntaas, mis vastutab 23S rRNA  $\Psi$ 1911,  $\Psi$ 1915 ja  $\Psi$ 1917 moodustamise eest, mis asuvad 23S rRNA heeliks-lingus 69-s (Gutgsell jt., 2005). RluD

koosneb 2 subdomeenist, katalüütilisest domeenist ja S4-sarnasest domeenist (Sivaraman jt., 2004). RluD on väga oluline ensüüm, kuna on näidatud, et *rluD* geeni deleterimine põhjustab rakkudel aeglase kasvu fenotüüpi ja defekti subühiku assambleerimisel (Ofengand jt., 2001; Gutgsell jt., 2005).

Nagu kõik süntaasid, vastutab ka RluD ainult kindlate pseudouridiinide tekkimise eest (Leppik jt., 2007). RluD ei sünteesi pseudouridiine mujale, kui positsioonidesse 1911, 1915 ja 1917 isegi siis, kui punkmutatsioonide abil vahetada nukleotiidid A1912, C1914, A1916 ja A1919 uridiinide vastu. On tuvastatud, et A1916 on ainukene nukleotiid H69 ligu piirkonnas, mis mõjutab RluD aktiivsust pseudouridiini tekkimiseks *in vivo* ja *in vitro* (Leppik jt., 2007). 50S subühik on RluD jaoks oluliselt parem substraat, kui 70S ribosoom. Põhjus on ilmselt selles, et 70S ribosoomis on H69 tihedalt seotud h44-ga, mis takistab RluD-l oma substraadile seondumast (Vaidyanathan jt., 2007).

S4-sarnase domeeni roll on väga oluline RluD spetsiifiliseks ja aktiivsuseks. On spekuleeritud, et ilma S4-sarnase domeenita, võib RluD modifitseerida pseudouridiine, mis tavaliselt tema substraatideks ei ole. Intaktne RluD on spetsiifiline ainult kindlate positsioonide suhtes, nagu mainitud eespool (Vaidyanathan jt., 2007).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

Kõikidest RNA-dest on leitud pseudouridiine. Pseudouridiin on kõige tuntum modifitseeritud nukleotiid rRNA-s. Pseudouridiin tekib isomerisatsiooni käigus uridiinist, mille sünteesivad pseudouridiini süntaasid. Enamiku pseudouridiini süntaaside substraadi äratundmise mehhanism on praegu veel teadmata. Enamik *E. coli* rRNA spetsiifilisi pseudouridiini süntaase sisaldavad lisaks katalüütilisele domeenile ka S4-sarnast domeeni. S4-sarnane domeen on saanud nime oma sarnasuse järgi ribosoomi valguga S4. S4-sarnase domeeni funktsioon pseudouridiini süntaasides on teadmata. On spekuleeritud, et S4-sarnane domeen on vajalik pseudouridiini süntaasi spetsiifika määramiseks (Vaidyanathan jt., 2007).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kimäärse pseudouridiini süntaasi (C4DK), mis oli konstrueeritud meie laboris RluC S4-sarnasest domeenist ja RluD katalüütilisest domeenist, *in vivo* spetsiifikat, mõju 23S rRNA modifitseerimisele ning 50S subühiku assemblile.

## 2.2 Materjal ja metoodika

### 2x YT sööde

1 liitri söötme kohta 16 g trüptooni, 10 g pärmiekstrakti, 5 g NaCl

### 10x TBE

0.9 M Tris, 0,9 M boorhape, 10 mM EDTA, pH 8,3

### Lüüsi lahjenduspuhver (LLP)

60 mM KCl, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Tris HCl pH 8, 12 mM MgOAc, 6 mM β-ME

### 1xLLP 1mM Mg

60 mM KCl, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM MgOAc, 6 mM β-ME

### BEU puhver

7 M UUREA, 4 mM EDTA, 50 mM Bicine/NaOH pH 8,5

### 1 M CMCT/BEU puhver

1M CMCT BEU puhvris

### NPK puhver

20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA

### RT-STOP

1 osa 300 mM NaOAc ja 3 osa 96% etanooli

### 5x hübridisatsioonipuhver (RT-HB)

225 mM K-HEPES pH 7, 450 mM KCl

### 10x pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhver (RT-RB)

500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 750 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>

### Formamiidi STOP (FS)

80 % deioniseeritud formamiid 10 mM EDTA, 0,25% broomfenool sinine

### dNTP (-C)

110 mM dATP, 110 mM dGTP, 110 mM dTTP, 6 mM dCTP

### 7 % UUREA-polüakrüülamiid geel (7 % PAAG)

1x TBE, 8 M UUREA, 7 % akrüülamiid-bis-akrüülamiid (19:1)

### HPLC puhver A

2,5 % metanool, 0,01 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,3

### HPLC puhver B

20 % metanool, 0,01 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,1

### HPLC puhver C

35 % atsetonitril, 0,01 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4,9

## ***E. coli* tüved ja plasmiidid**

*E. coli* tüvi MG1655 (F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG- rfb-50 rph-1)

*E. coli* tüvi M15 sisaldab lisaks plasmidest *lac* repressorit (Qiagen)

*E. coli* tüvi PRC on MG1655 derivaat, millest on deleteeritud genoomsed RluD ja RluC geenid (konstrueeritud meie laboris).

Kimäärset pseudouridiini süntaasi C4DK kodeerivat geeni ekspresseeriti bakterirakkudes ekspressioonivektorilt pQE-60 (Qiagen).

## **Kasutatud praimerid**

<b>Praimer</b>	<b>Järjestus</b>
U1 praimer	5' CAGCCTGGCCATCATTACGCC 3'
T3 praimer	5' GCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTT 3'
C7 praimer	5' CACCAGTGATGCGTCCAC 3'
C17 praimer	5' ACCACTTTAAATGGC 3'

### **2.2.1 Transformatsioon**

Kompetentsed rakud sulatati aeglaselt jääl. Sulanud rakkukultuurile (100 µl ) lisati 10 ng plasmidi ja rakke inkubeeriti jääl ~30 minutit. Rakudele tehti *heatshock* 1 minut temperatuuril +42°C. Peale *heatshokki* inkubeeriti kultuuri veel 5 minutit jääl. Rakkukultuur külvati LB plaadile (Amp 200 µg/ml) ning inkubeeriti üleöö +37°C.

### **2.2.2 Plasmiidse DNA eraldamine minipreparatsiooni meetodil**

LB plaadilt külvati üks bakterikoloonia 2 ml 2xYT söötmesse (Amp 100 µg/ml) ja inkubeeriti loksutis üleöö, temperatuuril +37°C. Rakud koguti tsentrifuugimise teel 13 000 rpm 2 minutit, +4°C (Heraeus fresco). Bakterimass resuspendeeriti 150 µl puhvril P1 (Qiagen), lisati 150 µl puhvrit P2 (Qiagen) ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Lisati 150 µl puhvrit P3 (Qiagen) ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, misjärel lisati 300 µl 4M NaClO<sub>4</sub>, inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13 000 rpm 15

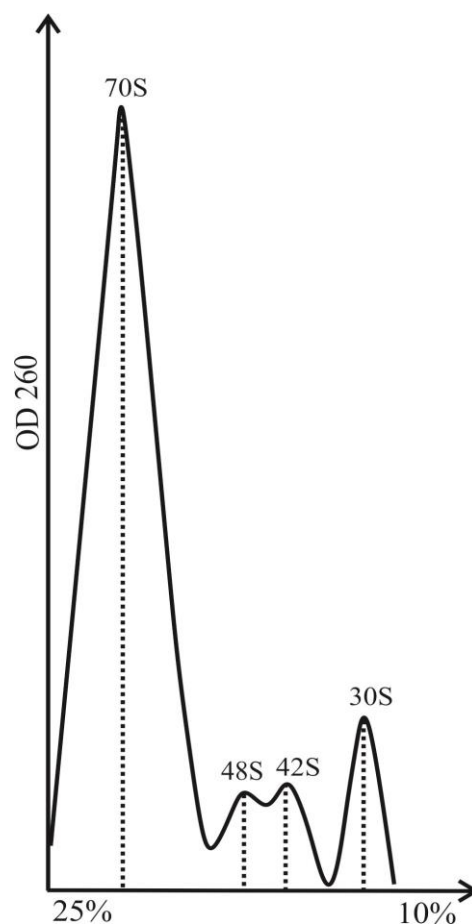
minutit, +4°C. Supernatant tõsteti uude reaktsioonituubi ja lisati 1300 µl 5M GuCN. Lisati 15 µl ränisuspensiooni ja DNA seoti räniga vääristajal 3 minutit ning räni-DNA kompleks sadestati lauatsentrifuugis 6000 rpm 30 sekundit. Sadet pesti kolm korda 1 ml 70% etanooliga ja seejärel kuivatati 10 minutit temperatuuril +37°C. DNA elueeriti RÄNI küljest 40 µl MQ veega 5 minutit temperatuuril +37°C. Räni sadestati tsentrifuugimisel 13 000 rpm 3 minutit, +4°C lauatsentrifuug (Fresco), misjärel puhas DNA vesilahus tõsteti uude reaktsioonituubi ja mõõdeti kontsentratsioon.

### **2.2.3 Rakkude kasvatamine ja lüüs**

LB plaadilt külvati 1 bakterikoloonia 2 ml 2xYT söötmesse (Amp 100 µg/ml) ja inkubeeriti loksutis üleöö temperatuuril +37°C. Üleöö kasvanud bakterikultuur külvati ümber 500 ml 2xYT söötmesse mis sisaldab antibiootikume (Amp (100 µg/ml) ja Km (25 µg/ml)). Rakukultuur kasvatati tiheduseni 0,3-0,4 (OD<sub>600</sub>), misjärel lisati IPTG (lõppkontsentratsioon 1 mM), et indutseerida plasmiidilt valgu ekspressioon ja bakterikultuuri kasvatamist jätkati 2 tundi. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel 4500 rpm 7 minutit +4°C (Sorvall RC5B plus, Sorvall GSA rotor) ja kogutud rakud resuspendeeriti 4 ml-s 1xLLP-s 12 mM MgOAc, lisati Dnaas lõppkontsentratsiooniga 25 U/ml ja lüsootsüüm lõppkontsentratsiooniga 2 mg/ml. Rakkude lüüsimiseks kasutati homogenisaatorit (Precellys 24) vastavalt tootja protokollile. Rakukestade ja klaaskuulide eemaldamiseks rakulüsaadist tsentrifuugiti lüsaati 13 000 rpm 15 minutit +4°C (Heraeus fresco) ja supernatant tõsteti uude reaktsioonituubi.

### **2.2.4 Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendis**

Ribosoomi partiklite lahutamiseks sahharoosi gradiendis ultratsentrifuugimise teel valati SW28 tuubidesse gradiendi segaja abil lineaarsed 10% - 25% sahharoosigradiendid, 1xLLP 12 mM MgOAc puhvris. Igale gradiendile lisati 70-100 U (1000 µl) rakulüsaati ja tsentrifuugiti ultratsentrifuugis 21 000 rpm, 16 tundi ( $\omega^2t=2,5 \times 10^{11}$ ), temperatuuril +4°C. Gradiendi profiilide visualiseerimiseks kasutati läbivooluspektrofotomeetrit (time constant=2, abs-range=1,  $\lambda=254$  nm), peristaatilist pumpa ja isekirjutajat (GE Healthcare). Gradiendist koguti eraldi 70S, 48S, 42S ja 30S ribosomaalsete partiklite fraktsioonid (Joonis 6).



**Joonis 6. Ribosomaalsete partiklite kogumine sahharoosi gradiendist.** Ribosoomipartiklid on lahutatud lineaarses 10%-25% sahharoosi gradiendis Sahharoosi gradiendist koguti eraldi 70S, 48S, 42S ja 30S fraktsioonid. Punktiirjoonena on tähistatud ribosomaalsete partiklite fraktsioonid.

### 2.2.5 Ribosomaalsete subühikute sadestamine

Ribosoomide sadestamiseks kasutati kahte erinevat meetodit: ultratsentrifuugimine ning sadestamine etanooli ja tsentrifuugimise teel.

Ribosomaalsete partiklite sadestamine ultratsentrifuugimise teel. Sahharoosi kontsentratsiooni vähendamiseks lahjendati gradiendist kogutud partiklite fraktsioonid 1xLLP 12mM MgOAc-ga ja lahuseid tsentrifuugiti 31 000 rpm, 22,5 tundi ( $\omega^2t=8,5 \times 10^{11}$ ), +4°C ja rootoris Ti-45 (Beckman). Peale ultratsentrifuugimist eemaldati supernatant ja ribosomaalsete partiklite sade lahustati 1X LLP-s. 70S sade lahustati 1xLLP-s 1 mM MgOAc, mis võimaldas 70S ribosoomi dissotsieerida subühikuteks ja 48S, 42S ja 30S sademed lahustati 1xLLP-s 12mM MgOAc.

Kontsentratsiooni mõõtmiseks ( $A_{260}$ ) kasutati spektrofotomeetrit NanoDrop. Ribosomaalsed partiklid külmutati lämmastikus ja säilitati temperatuuril  $-85^{\circ}\text{C}$ .

Selleks, et sadestada ribosomaalseid partikleid etanooli ja tsentrifugeerimise teel, lisati kogutud gradiendifraktsioonidele 2X maht etanooli ja inkubeeriti temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  üleöö. Lahuseid tsentrifugeeriti 1 tund 4500 rpm (Rotina 420R). Peale tsentrifugeerimist eemaldati supernatant ja ribosoomi partiklite sadet kuivatati temperatuuril  $+37^{\circ}\text{C}$  10 minutit. Kontsentratsiooni mõõtmiseks ( $A_{260}$ ) lahustati sade 1xLLP-s 12 mM Mg ja kasutati NanoDropi spektrofotomeetrit. Ribosomaalsed partiklid külmutati lämmastikus ja säilitati temperatuuril  $-85^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.6 rRNA puhastamine**

Selle töö raames kasutati kahte erinevat meetodit rRNA puhastamiseks

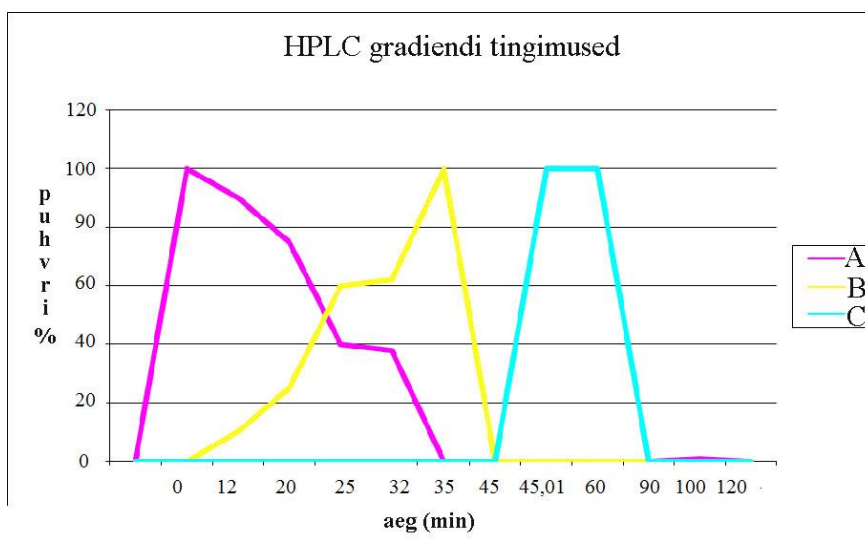
Räniga rRNA puhastamiseks võeti 3 U ( $A_{260}$ ) ribosoomi ja lahuse maht viidi 200  $\mu\text{l}$ -ni 1xLLP 12 mM MgOAc-ga. Lahusele lisati 800  $\mu\text{l}$  puhvrit PN (Quiagen) ja segati väristajal 20 minutit toatemperatuuril. rRNA sidumiseks lisati segule 20  $\mu\text{l}$  RÄNI suspensiooni ja jätkati väristajal 10 minutit toatemperatuuril. Räni sadestati lauatsentrifugeerimis 13 000 rpm 1 minut,  $+4^{\circ}\text{C}$  ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 2 korda 70% etanooliga ja kuivatati 10 minutit temperatuuril  $+37^{\circ}\text{C}$ . RNA elueeriti RÄNI küljest 50  $\mu\text{l}$  MQ veega temperatuuril  $+37^{\circ}\text{C}$ , 3 minutit. Räni sadestati lauatsentrifugeerimis 13 000 rpm 3 minutit ja rRNA vesilahus viidi uude reaktsioonituubi. RNA vesilahuse kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga (NanoDrop).

rRNA puhastamiseks fenool-kloroformi meetodiga võeti 4U ribosomaalseid partikleid ja viidi maht 400  $\mu\text{l}$ -ni 1xLLP 12 mM Mg-ga. Lahusele lisati 400  $\mu\text{l}$  fenooli pH 5,0 ja segati väristajal 3 minutit toatemperatuuril. Fenooli- ja vesifaasi eraldamiseks tsentrifugeeriti lahust lauatsentrifugeerimis 13 000 rpm, 3 minutit, toatemperatuuril ja vesifaas tõsteti uude reaktsioonituubi. Fenoolifaasile lisati 100  $\mu\text{l}$  MQ vett, segati väristajal ja tsentrifugeeriti lauatsentrifugeerimis 13 000 rpm 3 minutit toatemperatuuril. Vesifaasid segati omavahel kokku. Meetodi fenooli etappi korrati kokku kolm korda, misjärel lisati kogutud vesifaasidele võrdse maht kloroformi. Segu segati väristajal kolm minutit ja tsentrifugeeriti 13 000 rpm 3 minutit toatemperatuuril. Vesifaas tõsteti uude reaktsiooni tuubi ja RNA sadestamiseks lisati vesifaasile 2,5X mahtu 96% etanooli, inkubeeriti temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$ , üleöö ja tsentrifugeeriti

lauatsentrifuugis 13 000 rpm 20 minutit +4°C. rRNA sademelt eemaldati supernatant, sadet kuivatati temperatuuril +37°C, 10 minutit ja lahustati 80 µl MQ vees. RNA kontsentratsioon määrati NanoDrop spektrofotomeetriga ja rRNA-sid säilitati temperatuuril -20°C.

### 2.2.7 HPLC analüüs (high-performance liquid chromatography)

HPLC analüüsi meetod põhineb Gehrke ja Kuo töö tingimustel (Joonis 7) (Gehrke ja Kuo, 1989). Nukleaasi töötamiseks võeti 2 U eelnevalt fenool-kloroformi meetodil puhastatud rRNA-d ja reaktsiooni maht viidi MQ-ga 100 µl-ni. Lahust kuumutati 2 minutit temperatuuril +96°C, et denatureerida rRNA. rRNA vesilahus jahutati jääl, lisati 10 µl 10 mM ZnSO<sub>4</sub> ja 10 µl P1 nukleaasi (200U/ml), P1 nukleaasi töötus viidi läbi temperatuuril +37°C, üleöö. Reaktsioonisegule lisati 10 µl 10X FastAP puhvrit (Fermentas) ja 1 U FastAP ensüümi (Thermo) ning inkubeeriti 3 tundi temperatuuril +37°C. Nukleosiidide analüüsimiseks kasutati Shimadzu Prominence HPLC ja kolonni Supelcosil LC-18-S (25 cm x 4,6 mm, 5 µm), ning 120 minutist nukleosiidide analüüsimise programmi (Joonis 7) (Gehrke ja Kuo, 1989). HPLC analüüsi meetodi saadud nukleosiidide piikidest arvutasin pseudouridiinide arvu 23S rRNA molekulis valemi järgi (Valem 1), kus kasutatud ekstinktsioonikoefitsiendid määrati meie palvel Christy Chow poolt.



**Joonis 7. HPLC gradiendi tingimused.** Joonisel on toodud erinevate värvidega analüüsis kasutatavad puhvrid. Kogu programmi pikkus on 120 minutit. Programm põhineb artiklil (Gehrke ja Kuo, 1989) ja pilt (Rander, 2005).

$$\Psi_{\text{mol}} = \Psi_{\text{koef}} \times \Psi_{\text{pindala}}$$

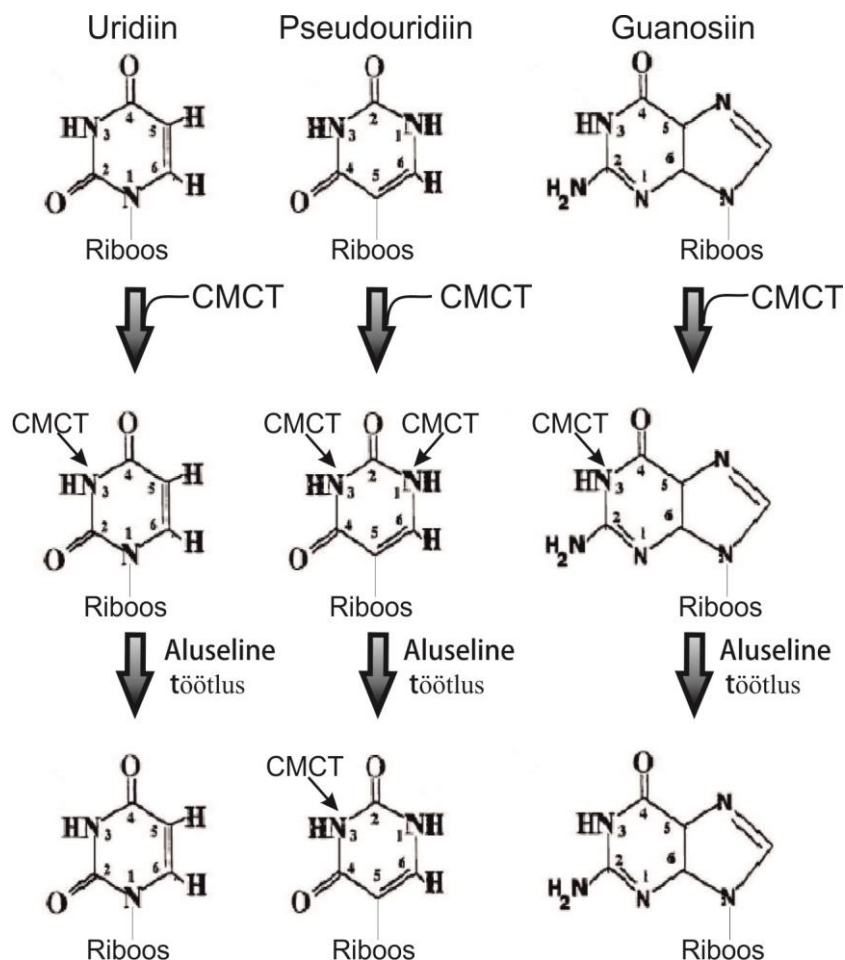
$$U_{\text{mol}} = U_{\text{koef}} \times U_{\text{pindala}}$$

$$\Psi_{\text{arv}} = \frac{U_{\text{arv}} \times \Psi_{\text{mol}}}{(\Psi_{\text{mol}} + U_{\text{mol}})}$$

**Valem 1. Pseudouridiini arvu valem.**  $\Psi_{\text{mol}}$  ja  $U_{\text{mol}}$ - vastavalt pseudouridiini ja uridiini moolide arv;  $\Psi_{\text{pindala}}$  ja  $U_{\text{pindala}}$ - vastavalt pseudouridiini ja uridiini piigi pindala HPLC kromatogrammis;  $\Psi_{\text{koef}}$  ja  $U_{\text{koef}}$ - vastavalt pseudouridiini ja uridiini ekstentsiooni koeffitsiendid;  $U_{\text{arv}}$ - uridiinide arv vastavas ribosomaalses RNA-s, kust on välja arvatud kõik modifitseeritud uridiinide peale pseudouridiini (Joonis 10).

### 2.2.8 Pseudouridiinide määramine

Pseudouridiinide määramiseks kindlates 23S rRNA positsioonides kasutati CMCT-alus ja praimeriekstensiooni meetodit (Joonis 8) (Ofengand jt., 2001). Pseudouridüleeritud kohtade määramiseks 23S rRNA-s tehti 2 reaktsiooni: esimese (pluss) reaktsiooni jaoks on vaja 15  $\mu\text{g}$  RNA-d, 80  $\mu\text{l}$  BEU puhvrit ja 20  $\mu\text{l}$  1M CMCT/BEU puhvrit; teise (kontroll e. miinus) reaktsiooni jaoks on vaja 15  $\mu\text{g}$  RNA-d, 100  $\mu\text{l}$  BEU puhvrit. Reaktsioonisegu inkubeeriti 10 minutit  $+37^{\circ}\text{C}$ , selle aja jooksul modifitseerib CMCT U, G ja  $\Psi$  nukleotiide (Joonis 8). RNA sadestamiseks reaktsioonisegust lisati 2  $\mu\text{l}$  dekstraani, 38  $\mu\text{l}$  4M NaOAc (pH 5,5) 600  $\mu\text{l}$  külma 96% etanooli, inkubeeriti temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  10 minutit ja tseentrifuugiti lauatsentrifuugis 13 000 rpm 15 minutit  $+4^{\circ}\text{C}$ . RNA sadet pesti 2 korda 70% külma Et-OH-ga ja kuivatati  $+37^{\circ}\text{C}$  10 minutit. Sade lahustati 50  $\mu\text{l}$  NKP puhvris ja inkubeeriti 4 tundi  $+37^{\circ}\text{C}$ , et eemaldada CMCT grupid U, G ja  $\Psi$  nukleotiidide küljest (Joonis 8). Peale inkubeerimist lisati RNA sadestamiseks 2  $\mu\text{l}$  dekstraani, 6  $\mu\text{l}$  4M NaOAc (pH5,5) ja 110  $\mu\text{l}$  külma 96% Et-OH. RNA sadestati temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  10 minutit ning tsetrifuugiti 13 000 rpm 10 minutit  $+4^{\circ}\text{C}$ . RNA sadet pesti nagu eelnevalt. Modifitseeritud RNA-d lahustati 30  $\mu\text{l}$  MQ vees. Modifitseeritud uridiinide visualiseerimiseks viidi läbi praimeriekstensioon.



**Joonis 8. CMCT-alus töötus.** Joonisele on kujutatud CMCT-ga modifitseeritavad nukleotiidid G, U ja  $\Psi$ . Noolega on tähistatud CMCT seondumine uridiinile positsiooni N3, pseudouridiinile positsioonidesse N3 ja N1 ja guanosiinile positsiooni N3. Pärast aluselist töötlust jääb CMCT ainult pseudouridiinis positsioonis N3 ja selle tagajärjel tekitab polümeraas peatumise praimeriekstentsiooni jooksul enne pseudouridiini (Leppik, 2007).

### 2.2.9 Praimeriekstentsioon

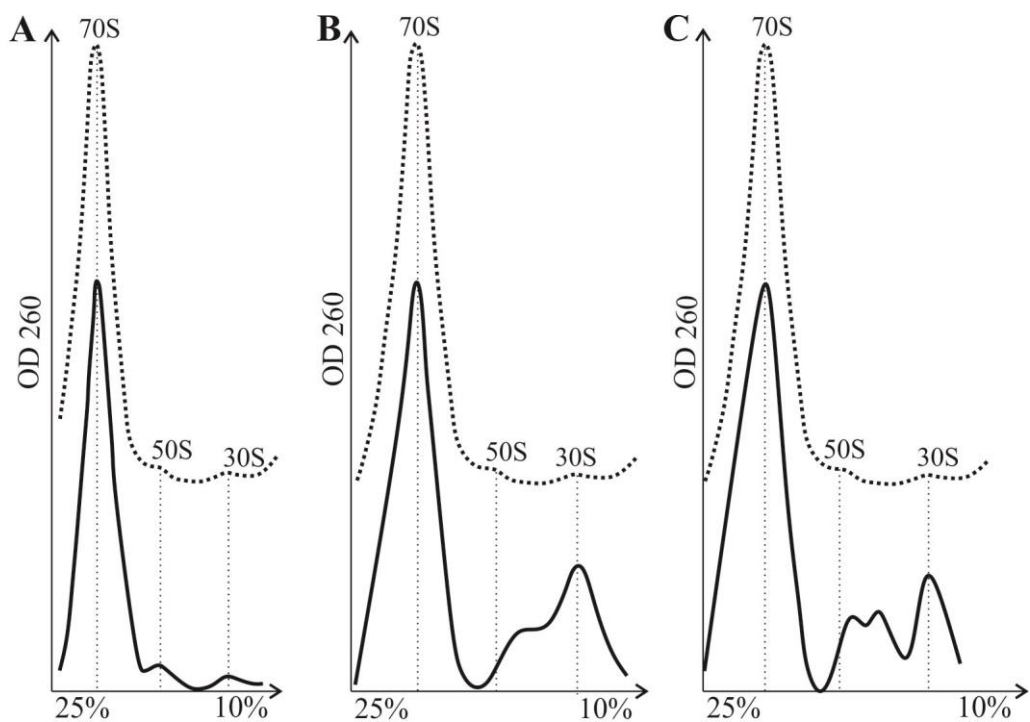
Praimeriekstentsioonireaktsioonid viidi läbi nii CMCT-ga modifitseeritud, kui modifitseerimata RNA-dele. 1-2 pmol rRNA-dele, lisati 2  $\mu$ l hübrisatsiooni puhvrit (HB) ja 2 pmol praimerit (U1, C17, C7 või T3). Reaktsiooni lõpprumala viidi MQ-ga 9  $\mu$ l-ni. RNA denatureerimiseks ja praimetite seondumiseks RNA-le kuumutati reaktsioonisegu  $+90^{\circ}\text{C}$  5 minutit ja jahutati aeglaselt kuni  $+47^{\circ}\text{C}$ -ni. Reaktsioonisegudele lisati 1,2  $\mu$ l 10x pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhvrit (RB), 0,8  $\mu$ l dNTP(-C)-d, 0,3  $\mu$ l  $a^{32}\text{PdCTP}$ -d (Hartmann Analytic) ja 0,16  $\mu$ l AMV pöördtranskriptaasi (Seikagaku) (4 U). Reaktsiooni lõpprumalat viidi 12  $\mu$ l-ni MQ-ga ja inkubeeriti 30 minutit  $+42^{\circ}\text{C}$ , misjärel lisati 2  $\mu$ l 1mM dNTP ja inkubeeriti 15 minutit  $+42^{\circ}\text{C}$ . Reaktsioon peatati 120  $\mu$ l STOP-RT lahusega ja saadestati  $-20^{\circ}\text{C}$  üleöö ja tsentrifugeeriti

13 000 rpm 15 minutit, +4°C. RNA sadet lahustati 10 µl formamiidi STOP-is (FS) ja segati vorteksiga. Fragmentide lahutamiseks kanti 1 ul praimerekstensioonil saadud materjali 7% UUREA-PAA geelile ja elektrofooresiti, 2000V. Enne geelile kandmist denatureeriti proove +95°C 5 minutit. DNA fragmendid visualiseeriti phosphoimageriga (Typhoon trio) ja analüüsiti Image Quant programmiga.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Kimäärse pseudouridiini süntaasi C4DK mõju ribosoomiprofiilile

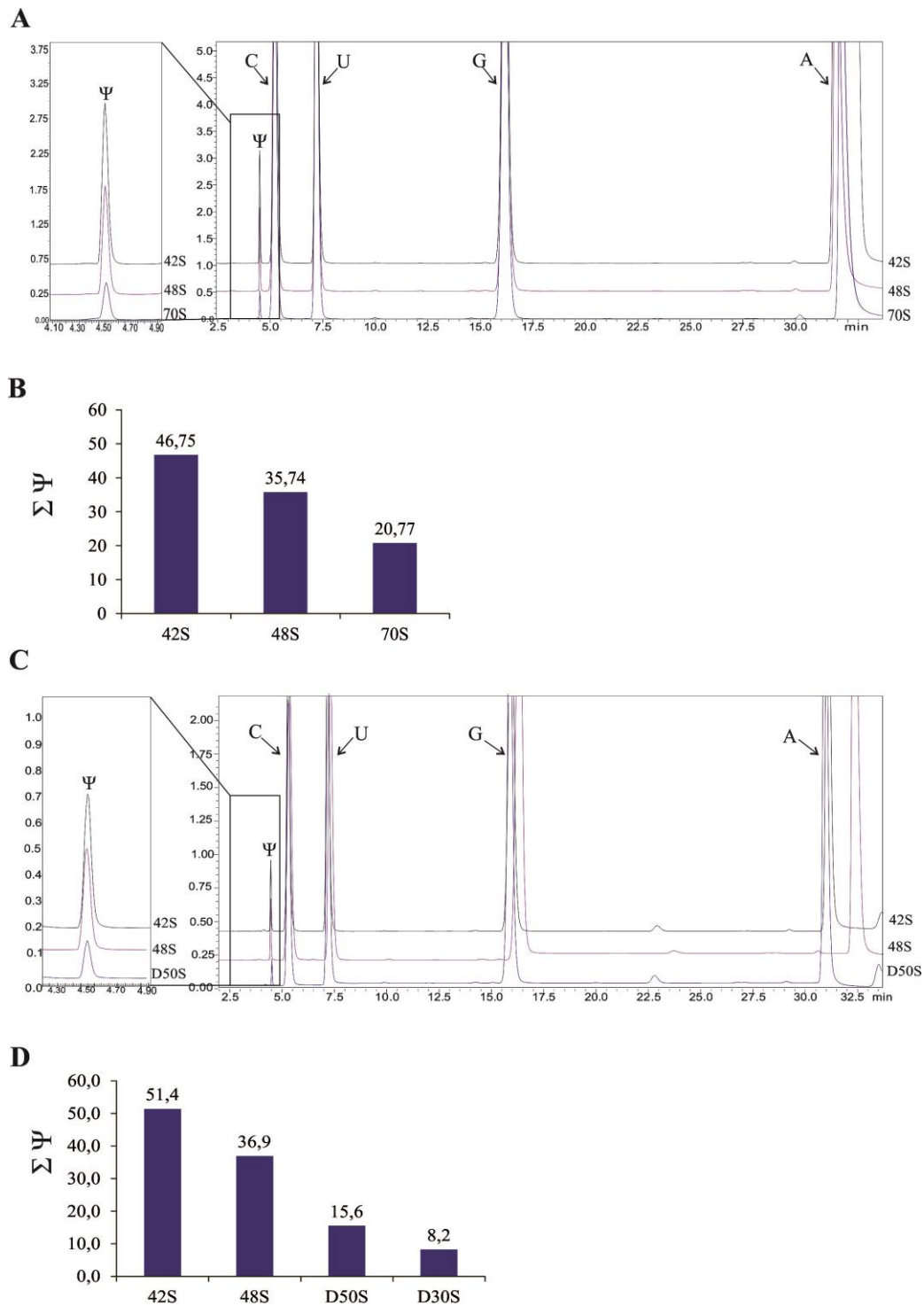
Ribosoomiprofiilide analüüsimiseks kasvatati ja lüüsi bakterirakke ning 30 U lüsaati tsentrifuugiti läbi sahharoosi gradiendi, nagu oli kirjeldatud meetodite osas. Kontrolliks kasutati wt tüve (MG1655) ja PRC tüve, millest viimases ekspresseeriti tühja pQE-60 plasmidi, et välistada plasmidi mõju ribosoomi profiilile (Joonis 9 A). Kimäärse C4DK valgu ekspresseerimine põhjustab suurenenud vabade subühikute piikide tekke, võrrelduna 70S ribosoomi piigiga nii PRC kui M15 rakkude puhul (Joonis 9 B ja C). Samuti on näha, et C4DK ekspressioon põhjustab 50S piigi nihkumise 30S subühiku piigi suunas (Joonis 9 B ja C). Kui suurenenud vabade subühikute fraktsioonid viitavad ribosoomi assotsiatsiooni defektile, siis piigi nihkumine viitab pigem 50S subühiku assambleerimisele defektile. Lisaks kõigele, võib gradiendi profiilidest täheldada, et ka 30S ja 50S piikide omavaheline suhe on muutnud (Joonis 9 B ja C), mis viitab sellele, et valesti kokku pakitud 50S subühikuid on hakatud lagundama.



**Joonis 9. Sahharoosi gradiendi profiil.** Ribosoomipartiklid on lahutatud lineaarses 10%-25% sahharoosi gradiendis. Vertikaalse punktiirjoonena on tähistatud ribosomaalsed fraktsioonid. Punktiirjoonega on märgitud wt (MG1655) ribosoomiprofiil. **A:** PRC tüvi millesse on viidud tühi pQE-60 plasmiid. Joonisel on näha, et tühi pQE-60 plasmiid ei mõjuta ribosoomiprofiili, kõik piigid on õiges kohas ja sarnased võrrelduna wt profiiliga. **B:** PRC tüvi, milles ekspresseeritakse pQE-60 plasmiidilt kimäärset valku C4DK. **C:** M15 tüvi, milles ekspresseeritakse pQE-60 plasmiidilt kimäärset valku C4DK. Joonisel on näha, et paneelidel B ja C on 50S piik nihkunud 30S piigi suunas ning piik on väiksem, kui 30S piik.

### 2.3.2 Pseudouridiinide hulga detekteerimine HPLC analüüsil

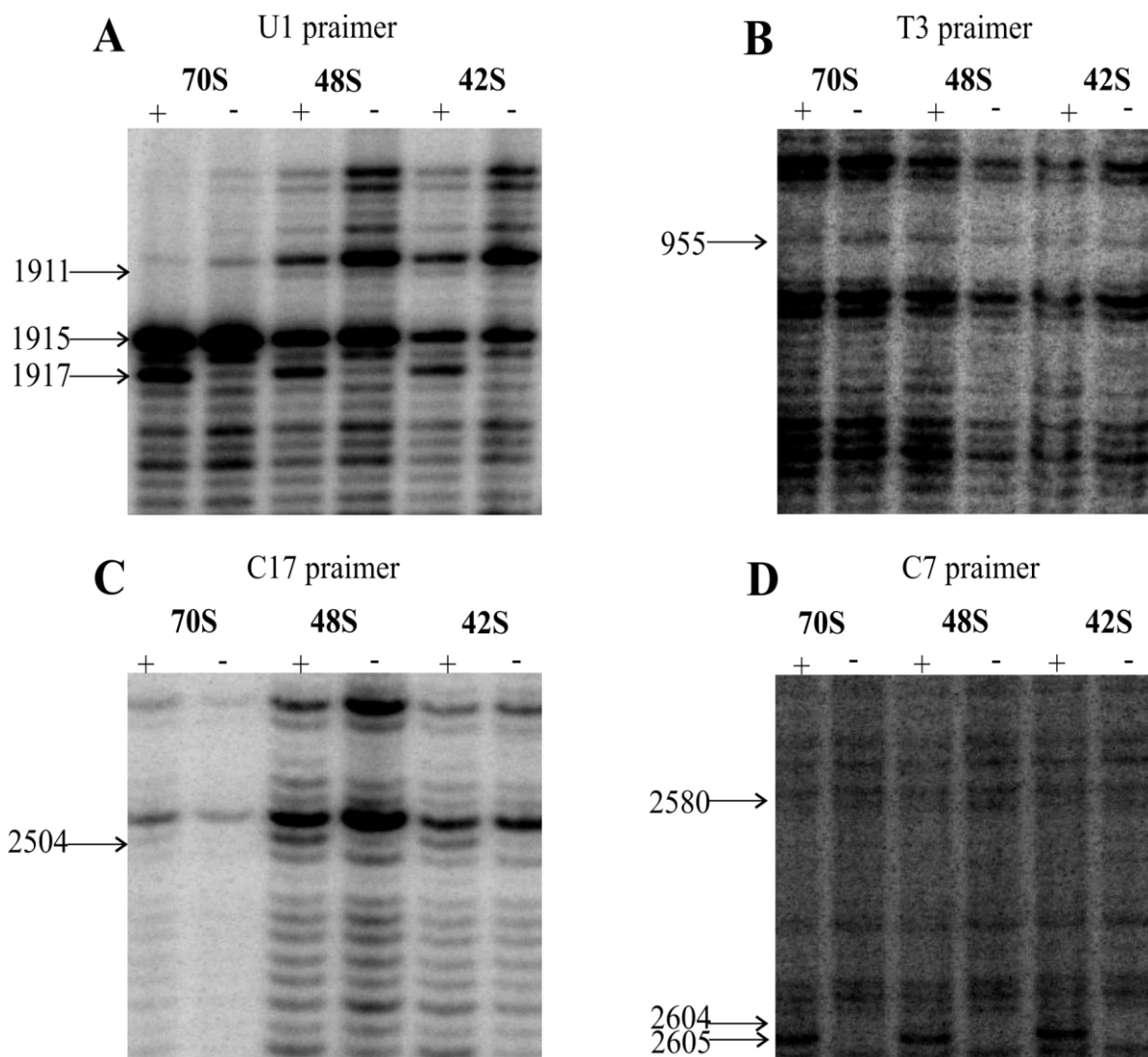
Et tuvastada pseudouridiinide koguhulka 50S subühikus, kasutati HPLC analüüsi. Paraleelselt analüüsiti M15 ja PRC tüve, milles ekspresseeriti kimäärset C4DK pseudouridiini süntaasi. Selleks, et täpsemalt uurida 50S subühiku assembleerumisdefekti, mille tõttu liigub 50S piik 30S piigi suunas, võimalikku seost pseudouridiinide hulgaga, kogusime 50S fraktsiooni kahes osas ja tähistasime need tinglikult 48S ning 42S (Joonis 6). HPLC kromatogrammil on näha, et pseudouridiinidele vastav piik suureneb vastavalt partikli sedimentatsiooni vähenemisele ( $\Sigma\Psi=70S<48S<42S$ ) (Joonis 10 A ja C). HPLC kromatogrammist pseudouridiinide koguarvu leidsime valemi järgi, mida on kirjeldatud meetodite osas (Valem 1) (Joonis 10 B ja D). 42S ribosomaalse subühiku RNA-sse on sünteesitud umbes 50 pseudouridiini, samas kui 48S subühiku ja 70S ribosoomi RNA-dest leidsime ainult vastavalt 35 ja 20 pseudouridiini (Joonis 10 B ja D). Tulemus näitab selgelt, et pseudouridiine on rohkem subühikutes, mis on mittekorrektsest kokku pakitud (Joonis 9 B ja C, Joonis 10 B ja D). M15 tüve puhul vastab D50S ja D30S pseudouridiinide summa (Joonis 10 D) PRC 70S pseudouridiinide hulgale (Joonis 10 B).



**Joonis 10. Pseudouridiinide koguarvu määramine rRNA-s.** A ja C paneelidel on kujutatud vastavalt PRC ja M15 tüvede, milles ekspresseeriti C4DK kimäärset pseudouridiini süntaasi, HPLC analüüsi kromatogrammide. Nooltega on tähistatud standardsed nukleosiidid ja pseudouridiin. B ja D diagrammidel on toodud pseudouridiinide koguarv vastava partikli RNA molekulis. Pseudouridiinide kogused on arvatud HPLC kromatogrammi piikide pindade järgi, kasutades nukleotiidide ekstinktsioonikoefitsiente nagu kirjeldatud meetodites.

### 2.3.3 Heeliks-lingu 69 pseudouridiinide süntees

HPLC tulemus näitab, et C4DK ekspresseerimisel tuvastati M15 tüve 23S rRNA-st mõnevõrra rohkem pseudouridiine, kui PRC tüve 23S rRNA-st (Joonis 10 B ja D). Kuna PRC tüves puuduvad pseudouridiini süntaasid RluC ja RluD, viitab antud tulemus sellele, et kimäärne valk ei pruugi sünteesida pseudouridiine kõikidesse positsioonidesse, mis on normaalselt RluC ja RluD substraatideks. Tuvastamiseks pseudouridiine 23S rRNA piirkondadest, kuhu RluC ja RluD sünteesivad pseudouridiine, kasutasime CMCT-alus töötlust ja praimerit pikendamise reaktsiooni, selle töö raames korrati katset 5 korda. Praimerit pikendamisel ja produkti lahutamisel 7% UUREA-PAAG elektroforeesil saadakse pluss (+) ja miinus (-) rajad vastavalt sellele, kas proovi on CMCT-ga töödeldud või mitte. Aluseline töötlus tehakse kõigile proovidele. Pseudouridiinid asuvad positsioonides, kus + rajal asub spetsiifiline polümeraasi seiskumise tagajärjel tekkinud stop mis – rajal puudub. 23S rRNA heeliksi 69 piirkonnas tekivad kindlasti pseudouridiine positsioonides 1915 ja 1917 (Joonis 11 A). Üllataval kombel ei suutnud me tuvastada pseudouridiini positsioonist 1911. Selline pseudouridüleerimise muster iseloomustab kõigi subühikute 23S rRNA-sid (70S, 48S ja 42S) (Joonis 11 A). Siiski tuleb märkida, et 48S ja 42S (Joonis 11 A) partiklites on + rajal bänd nõrgem, mis viitab sellele, et vähem uridiine on muudetud pseudouridiinideks. Skaneerides 23S rRNA piirkondi, kus asuvad RluC spetsiifilised pseudouridiinid, leidsime, et positsioonides 955 ja 2580 puudub pseudouridiini spetsiifiline stop kõikides analüüsitud 23S rRNA-des (Joonis 11 B ja C) ja positsioonis 2504 on stop ainult 48S ja 42S subühikute 23S rRNA-des (Joonis 11 C). Ka positsiooni 2504 puhul on näha, et + rajal asuv bänd ei ole eriti tugev, mis viitab sellele, et suhteliselt väike hulk uridiine on pseudouridüleeritud (Joonis 11 C).



**Joonis 11. Pseudouridiinide määramine praimerrekstensiooniga 23S rRNA-s pärast CMCT-alus töötlust.** **A:** Joonisel on näha piirkond, mille pseudouridiinide tekkimise eest vastab RluD süntaas. **B, C** ja **D** paneelidel on näidatud piirkonnad, mille pseudouridiinide sünteesimise eest vastab RluC süntaas. Paneeli D all on näidatud kaks spetsiifilist pseudouridiini stopi positsioonides 2604 ja 2605, mille sünteesimise eest vastavad pseudouridiini süntaasid RluB ja RluF. + rajad on modifitseeritud CMCT-ga, ja – rajad on CMCT-ga modifitseerimata. Näidatud on ka praimerid, mida kasutati praimeripikendamise reaktsiooniks ja ribosoomipartiklid, mida analüüsiti.

### 2.3.4 Arutelu

23S rRNA heeliks 69 on teadlastele pikalt huvi pakkunud. Kümnest pseudouridiinist, mis asuvad 23S ribosomaalses RNA-s, kolm asuvad H69-s positsioonides 1911, 1915 ja 1917. Kõik need kolm pseudouridiini isomeriseeritakse pseudouridiini süntaasi RluD poolt. Pseudouridiin positsioonis 1917 on universaalselt konserveerunud, esinedes kõigil organismidel (Ofengand jt., 2001). *In vivo* tunneb RluD 23S rRNA H69-s ära ainult need uridiinid, mis asuvad positsioonides, mis on tema looduslikeks substraatideks ja kõik kolm pseudouridiini sünteesitakse üheaegselt (Leppik jt., 2007).

Pseudouridiin on enim levinud modifikatsioon rRNA-s. Olgugi, et pseudouridiinid ja pseudouridiini süntaasid on olnud teada juba pikka aega, on enamiku süntaaside substraadi äratundmise mehhanism on jäänud saladuseks. Samuti ei ole veel teada pseudouridiini täpne roll ribosoomis (Ofengand jt., 2001).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida konstrueeritud kimäärse valggu (C4DK), mis sisaldas RluC S4-sarnast ja RluD katalüütilist domeeni, *in vivo* spetsiifikat *E. coli* rakkudes. Ribosoomipartiklite eraldamisel saadud sahharoosiprofiil näitas üllatuslikult, et kimäärse valggu ekspresseerimine bakterirakkudes põhjustab sahharoosigradiendis 50S subühiku piigi nihkumise 30S piigi poole (Joonis 9 B ja C). Samuti on näha vabade subühikute piikide suurenemine võrrelduna 70S piigiga ja 50S piigi vähenemise võrrelduna 30S piigiga (Joonis 9 B ja C). Vabade 50S ja 30S ribosomaalsete partiklite hulk võrrelduna 70S partiklitega on proportsionaalselt suurenenud (Joonis 9 B ja C), kuna 50S partiklite assambleerimine ei ole korrektne ja need ei ole enam võimelised assotseeruma 30S subühikuga. 50S partikleid on vähem võrreldes 30S-ga (Joonis 9 B ja C) ilmselt sellepärast, et valesti kokku pakitud 50S partikleid hakatakse selektiivselt lagundama, kuid seda väidet tuleb veel eksperimentaalselt kontrollida.

On kaks võimalust, miks 50S partikli assembleerimine võib olla häiritud, põhjustades 50S piigi nihkumise sahharoosi gradiendis (Joonis 9 B ja C). Üheks põhjuseks võib olla, et kimäärne valk ise mõjutab ribosoomi assambleerimist, seondudes assambleerumise ajal 23S rRNA-le ja põhjustades sellega kõrvalekaldeid tavalisest ribosoomi assambleerumise rajast. Ribosoomi assambleerimine järgib kindlat rada (Dohme ja Nierhaus, 1976). On võimalik, et kui assambleerumise protsessi alguses põhjustada assambleerumises häireid siis see mõjutab edasist protsessi, ehk kui varajases assambleerumises põhjustada viga, siis läheb ka edasine

assembleerumine valesi. Teiseks põhjuseks võib olla, et konstrueeritud kimäärne valk sünteesib pseudouridiine 23S rRNA sellistesse positsioonidesse, mis põhjustavad muutusi 50S subühiku struktuuris. Pseudouridiin on unikaalne, sest suhkru alus on seotud lämmastikalusega mitte tavapärase C-N, vaid C-C sidemega (Joonis 5). Selle tagajärjel tekib vaba N1-H, mis on võimeline andma lisa vesiniksideme ja võib osaleda RNA struktuuris lisa interaktsioonide tekkimises (Joonis 5) (Charette ja Gray, 2000) ja seetõttu võib pseudouridiin põhjustada konformatsioonilised muutused rRNA kõrgema järgu struktuurides.

Kui muteerida pseudouridiini süntaasi katalüütiline aspartaat, muudab see valgu inaktiivseks, ehk võimetuks sünteesida pseudouridiine (Ofengand, 2001). Selleks, et kontrollida, kas valesi kokku pakitud 50S subühikud tekivad kimäärse valgu seondumise tõttu assembleerimisele vaheproduktile või pseudouridiinide ülehulgast 23S rRNA-s, ekspresseeriti punktmutatsiooniga inaktiiveeritud C4DK valku *E. coli* rakkudes. Katsetulemused näitavad, et inaktiivse C4DK ekspressioon ei põhjusta nähtavaid defekte ribosoomi assembleerimises (M. Leppik avaldamata andmed), mis viitab üheselt sellele, et 50S ribosomaalse partikli assembleerimise defekt on põhjustatud pseudouridiinide ülehulgast mitte kimäärse valgu seondumisest 50S subühikute assembleerimisele vaheproduktidele. Selleks, et tuvastada pseudouridiinide hulga ja assembleerimise defektide vaheline korrelatsioon, kasutasin HPLC analüüsi.

HPLC tulemused on toodud joonisel 10. HPLC diagrammi järgi võin öelda, et nii PRC kui ka M15 tüvedes on 42S ja 48S partiklites rohkem pseudouridiine, kui 70S partiklis (Joonis 10 A ja C). Sellest järeldan, et pseudouridiinide hulk korreleerub assambleerimise defektiga, mis on jällegi tõestus sellele, et assembleerimis defekt on põhjustatud liigsete pseudouridiinide sünteesimisest 23S rRNA-sse. HPLC tulemustest selgub ka, et kimäärne C4DK pseudouridiini süntaas on võimeline isomeriseerima suurusjärgus 50 – 60 uridiini 23S rRNA molekuli kohta, mida on 5 – 6 korda rohkem, kui normaalses wt *E. coli* 23S rRNA-s (Joonis 10 B ja D). On väga tõenäoline, et nii suur pseudouridiinide ülehulk võib põhjustada probleeme 50S ribosoomi struktuuris. Nii suure hulga pseudouridiinide sünteesimine 23S rRNA molekuli viitab üheselt ka sellele, et kimäärne pseudouridiini süntees ei oma konkreetset spetsiifikat konkreetsete uridiinide suhtes vaid on kaotanud igasuguse spetsiifilisuse ja isomeriseerib kõiki uridiine, millele kimäärne süntaas rRNA struktuuris „ligi pääseb“.

Pseudouridiini hulga tulpdiagrammid näitavad, et PRC tüves (Joonis 10 B) on vähem  $\Psi$ -e, kui M15 tüves (Joonis 10 D). Tuleb märkida, et joonisel 10 D näidatud D30S ja D50S pseudouridiinide hulk kokku annab 70S partikli pseudouridiinide hulga, mida saab võrrelda joonisel 10 B näidatud 70S partikli pseudouridiinide hulgaga. Kuna M15 tüve 23S rRNA sisaldab rohkem pseudouridiine, võib oletada, et kimäärne C4DK ei sünteesi PRC tüves kõiki pseudouridiine, mille eest vastutavad tavaliselt RluC ja RluD. Et kontrollida C4DK spetsiifikat RluC ja RluD spetsiifiliste uridiinide suhtes tegime CMCT-alus töötluste ja praimeriekstensiooni.

Joonisel 11 on praimeriekstensiooni tulemused, mis näitavad kimäärse valgu spetsiifikat nende pseudouridiini süntaaside substraatnukleotiidide suhtes, millest kimäärne valk on kokku pandud. Kimäärne valk oli konstrueeritud niimoodi, et RluD süntaasist on võetud katalüütiline domeen ja RluC-st võeti S4-sarnane domeen. Pseudouridiini süntaas RluD sünteesib pseudouridiine positsioonidesse 1911, 1915 ja 1917 ja RluC positsioonidesse 955, 2504 ja 2580. CMCT-alus töötluste ja praimeriekstensiooni tulemuste järgi saab järeldada, et katalüütiline domeen mängib kimäärse pseudouridiini spetsiifika seisukohalt rohkem rolli, kui S4-sarnane domeen. Enamus RluD spetsiifilisi pseudouridiine on sünteesitud (Joonis 11 A), kuid uridiine kohtades, mille pseudouridiinideks muutmise eest tavaliselt vastutab RluC, pseudouridiine sisuliselt ei tuvastatud (Joonis 11 B ja D). Ainuke erand on positsioon 2504 (Joonis 11 C), kus  $\Psi$  on tekkinud 48S ja 42S partiklite 23S rRNA-desse, kuid siin ei saa me välistada võimalust, et selles positsioonis asuv uridiin pseudouridüleeritakse tänu sellele, et on toimunud kõrvalekaldeid 50S assambleerumises. Praimeriekstensioonil tekkiva bändi tugevus sõltub sellest, kui suur hulk uridiine on isomeriseeritud pseudouridiinideks (Ero jt., 2010). Positsioonis 1917 on tuvastatav hästi tugev bänd, võrreldes positsiooniga 2504 (Joonis 11 A ja C). See näitab üheselt, et positsioonis 1917 on enamus uridiine pseudouridiinideks muudetud, aga positsioonis 2504 on enamus uridiine isomeriseerimata. Positsioonis 1915 on tugev bänd nii plus, kui miinus rajal (Joonis 11 A). Antud tulemus on seotud sellega, et RlmH metüleerib pseudouridiini positsiooni 1915 ja seetõttu tekib geelelektroforeesis tugev polümeraasi stop nii CMCT plus, kui miinus rajal (Ero jt., 2010). Peab mainima, et urididiin positsioonis 1915 on RlmH-i jaoks äärmiselt halb substraat ja tugevat polümeraasi stop bändi ei tekita. Sarnaselt 1917 positsiooni bändiga on 70S subühiku rajal 1915 positsiooni spetsiifiline bänd tugevam, kui 48S ja 42S-i radadel (Joonis 11 A), põhjuseks võib olla see, et C4DK substraadiks on korrektselt assambleeritud 50S partikkel, mis on heas korrelatsioonis varasemate andmetega mis näitasid, et ka wt RluD-le on substraadina vajalik korrektselt

assambleeritud 50S partikkel (Leppik jt., 2007). Positsiooniga 2504 on olukord vastupidine, kuna 70S-is ei ole võimalik üldse pseudouridiine tuvastada ja 48S ja 42S partiklites on plus rajal nõrk bänd tuvastatav (Joonis 11 C). Põhjuseks võib olla see, et positsiooni 2504 puhul mängib assambleerumine vastupidist rolli, kui 50S asambleerimine on valesti läinud, siis pseudouridiine sünteesitakse rohkem, aga kui 50S partikli asambleerimine on korrektne siis ei ole uridiin selles positsioonis enam kimäärse valgu C4DK jaoks substraadiks (Joonis 11 C). Meie andmed näitavad, et  $\Psi$ -e on rohkem kohtades, mille modifitseerimise eest vastutab RluD (1915 ja 1917), mis viitab sellele, et RluD katalüütiline domeen mängib kimäärse pseudouridiini süntaasi substraatide määramisel suuremat rolli, kui S4-sarnane domään, mis on pärit valgust RluC.

Antud töös kogutud andmed lubavad väita, et kimäärne pseudouridiini süntaas C4DK on äärmiselt ebaspetsiifiline valk, isomeriseerides väga suurt hulka uridiine 23S rRNA-s. Kimäärne C4DK pseudouridiini süntaas on siiski säilitanud väikese spetsiifilisuse positsioonide 1915 ja 1917 suhtes. Spetsiifilisuse opsitsioonide 1915 ja 1917 suhtes määrab ilmselt kimäärse valgu koosseisus olev RluD katalüütiline domeen.

## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kimäärse pseudouridiini süntaasi (C4DK), mis oli konstrueeritud RluC S4-sarnasest domeenist ja RluD katalüütilisest domeenist, *in vivo* spetsiifikat. Ribosoomipartiklite sahharoosigradiendi profiil näitas, et kimäärse valgu ekspressioon põhjustab 50S subühiku assambleerimise defekti, 50S nihkub 30S suunas. Vabade ribosomaalsete partiklite hulk annab alust arvata, et defekti tõttu ei assortseeru 50S 30S subühikuga. Käesolevas töös saadud tulemused näitavad, et 50S subühiku assambleerimise defekti põhjustab pseudouridiinide ülehulk 23S rRNA-s. Pseudouridiinide hulk suureneb vastavalt 50S assambleerimise defekti ulatusele.

Lisaks leidsime, et kimäärne valk on võimeline pseudouridiine sünteesima positsioonidesse 1917 ja 1915 (RluD süntaasi naturaalsed substraadid). C4DK modifitseerib ka positsioonis 2504 asuvat uridiini (RluC süntaasi naturaalne substraat) kuid seda ebaefektiivselt. Need tulemused kinnitavad, et RluD katalüütiline domeen mängib C4DK kimäärse valgu substraadi spetsiifika koha pealt suuremat rolli, kui RluC S4-sarnane domeen ja selle tagajärjel pseudouridüleeritakse eelistatult uridiine, mis on RluD looduslikud substraadid.

Hoolimata sellest, et C4DK kimäärne pseudouridiini süntaas näitab üles eelistust positsioonides 1915 ja 1917 asuvate uridiinide suhtes, viitab suur pseudouridiinide ülehulk sellele, et kimäärne valk on üldjoones ebaspetsiifiline. Selleks, et tuvastada kimäärse C4DK valgu spetsiifikat, on vajalik skaneerida terve 23S rRNA tekkivate pseudouridiinide suhtes.

## **Characterization of the specificity of the chimeric pseudouridine synthase.**

Natalja Garber

### **Summary**

The most abundant modification in RNA is pseudouridine and it is posttranscriptional modification. The number of pseudouridines varies between organisms. Pseudouridines have been found in various types of RNA: tRNA, rRNA and snRNA.  $\Psi$  is made from canonical U by enzyme-catalyzed isomerization reaction catalyzed by enzymes called pseudouridine synthases from specifically selected U residues. Most of *E. coli* nucleotide modifications are localized in functionally important regions of the ribosome. Pseudouridine at position 1917 (*E.coli* nomenclature) in 23S rRNA helix 69 is conserved between all organisms. Exact role of pseudouridine in the ribosome is unclear today, but it is proposed that  $\Psi$  might function as a conformational stabilization or switch (Charette and Gray, 2000).

The aim of this study was to investigate the specificity of the chimeric pseudouridine synthase (C4DK). Chimeric protein is made from the S4-like domain of the RluC and catalytic domain of the RluD pseudouridine synthase. Our results showed that this C4DK makes excessive pseudouridines into 23S rRNA. HPLC analysis showed that the number of pseudouridine was increased, because of the chimeric protein is expressed to the strain. M15 strain has more pseudouridines than PRC strain, because of a part of RluC and RluD pseudouridine synthases do not make all uridines to pseudouridines.

## **Tänuavaldused**

Täna eelkõige oma juhendajat Margus Leppikut ja professor Jaanus Remmet, kes on alati olnud abivalmis ning nõudlikud minu juhendamisel ja töö koostamisel. Lisaks tänan kogu molekulaarbioloogia ja biokeemia õppetooli rõõmsa meele ja heade nõuannate eest. Veel tänan oma vanemaid, kes võimaldasid mul tulla Tartusse õppima.

## **Kirjanduse loetelu**

### **Artiklid:**

**Ali, I. K., Lancaster, L., Feinberg, J., Joseph, S. and Noller, H. F.** (2006). Deletion of a conserved, central ribosomal intersubunit RNA bridge. *Mol Cell* 23:865-74.

**Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B. and Steitz, T. A.** (1999). Placement of protein and RNA structures into a 5Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400: 841-847.

**Brimacombe, R. and Stiege, W.** (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem J* 229: 1-17.

**Charette, M. and Gray, M. W.** (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life* 49: 341-351.

**Decatur, W. A. and Fournier, M. J.** (2002). rRNA modifications and ribosome function. *TIBS* 27: 344- 351.

**Dohme, F. and Nierhaus, K. H.** (1976). Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes in vitro. *J Mol Biol* 107: 585-599.

**Ero, R., Leppik, M., Liiv, A. and Remme, J.** (2010). Specificity and kinetics of 23S rRNA modification enzymes RlmH and RluD. *RNA* 16: 2075-2084.

**Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S. and Frank, J.** (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* 113: 789-801.

**Gutgsell, N.S., Deutscher, M.P. and Ofengand, J.** (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *RNA* 1: 1141-1152.

**Hirabayashi, N., Sato, N. S. and Suzuki, T.** (2006). Conserved loop sequence of helix 69 in *Escherichia coli* 23 S rRNA is involved in A-site tRNA binding and translational fidelity. *J Biol Chem* 281: 17203-17211.

- Hoang, C., Chen, J., Vizthum, C. A., Kandel, J. M., Hamilton, C. S., Mueller, E. G. and Ferré-D'Amaré, A. R.** (2006). Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure. *Mol Cell* 24: 535-545.
- Huang, L., Ku, J., Pookanjanatavip, M., Gu, X., Wang, D., Greene, P. J. and Santi, D.V.** (1998). Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry* 37: 15951–15957.
- Katunin, V. I., Muth, G. W., Strobel, S. A., Wintermeyer, W. and Rodnina, M. V.** (2002). Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol Cell* 10: 339-346
- Kipper, K., Sild, S., Hetényi, C., Remme, J. and Liiv, A.** (2011). Pseudouridylation of 23S rRNA helix 69 promotes peptide release by release factor RF2 but not by release factor RF1. *Biochimie* 93: 834-844.
- Leppik, M.** (2007). Pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifilisus *in vivo* ja *in vitro*. Tartu Ülikool. Magistritöö
- Leppik, M., Peil, L., Kipper, K., Liiv, A. and Remme, J.** (2007). Substrate specificity of the pseudouridine synthase RluD in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 274: 5759-5766.
- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, U. and Remme, J.** (2005). Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop by mutagenesis. *BMC Mol Biol* 6: 18.
- Liiv, A. and O'Connor, M.** (2006) Mutations in the intersubunit bridge regions of 23S rRNA. *J Biol Chem.* 281: 29850-19862.
- Moore, P. B. and Steitz, T. A.** (2003). The structural basis on the large ribosomal subunit function. *Annual review of biochemistry* 72: 813-850.
- Noller, H. F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R. R., Kopylov, A. M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D. A., Gupta, R. and Waese, C. R.** (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 9: 6167-6189.
- Ofengand, J.** (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 514: 17-25.

**Ofengand, J., Del Campo, M. and Kaya, Y.** (2001). Mapping pseudouridines in RNA molecules. *Methods* 25: 365-373

**Ofengand, J., Malhorta, A., Remme, J., Gutsell N.S, Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L. and Kaya, Y.** (2001). Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harb Symp on Quant Biol* 66: 147-159.

**Piekna-Przybylska D., Decatur W. A. and Fournier M. J.** (2008). The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis. *Nucleic Acids Res* 36: 178-183.

**Polacek, N. and Mankin, A. S.** (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 285-311

**Ramamurthy, V., Swann, S. L., Paulson, J. L., Spedaliere, C. J. and Mueller, E. G.** (1999). Critical aspartic acid residues in pseudouridine synthases. *J Biol Chem* 274: 22225-22230.

**Rander, A.** (2005). 111 aluspaarise deletsiooni mõju 23 S rRNA modifitseerimisele *Escherichia coli* rakkudes. Tartu Ülikool. Bakalaureusetöö.

**Raychaudhuri, S., Niu, L., Conrad, J., Lane, B. G. and Ofengand, J.** (1999). Functional effect of deletion and mutation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *J Biol Chem* 274: 18880-18886.

**Rodnina, M. V., Beringer, M. and Wintermeyer, W.** (2006). How ribosomes make peptide bonds. *TIBS* 32: 20-26.

**Sakakibara, Y. and Chow, C. S.** (2012) Role of pseudouridine in structural rearrangements of helix 69 during bacterial ribosome assembly. *ACS Chem Biol* 7: 871-878.

**Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Dahlberg, A. E. and Dontsova, O.** (2000). Mutations at position A960 of *E. coli* 23 S ribosomal RNA influence the structure of 5 S ribosomal RNA and the peptidyltransferase region of 23 S ribosomal RNA. *J Mol Biol* 299: 379-389

**Siibak T. and Remme J.** (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA* 16, 2023-2032.

**Silberklang, M., RajBhandary, U. L., Lück, A. and Erdmann, V. A.** (1983). Chemical reactivity of E. coli 5S RNA in situ in the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* 11: 605-617.

**Siravaman, J., Iannuzzi, P., Cygler, M. and Matte, A.** (2004). Crystal structure of the RluD pseudouridine synthase catalytic module, an enzyme that modifies 23 S rRNA and is essential for normal cell growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 335: 87-101

**Shpanchenko, O. V., Dontsova, O. A., Bogdanov, A. A. And Nierhaus, K. H.** (1998). Structure of 5S rRNA within the *Escherichia coli* ribosome: iodine-induced cleavage patterns of phosphorothioate derivatives. *RNA* 4: 1154-1164.

**Tissières, A. and Watson, J. D.** (1958). Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. *Nature* 182: 778-780.

**Vaidyanathan, P. P., Deutscher, M. P. and Malhorta, A.** (2007). RluD, a highly conserved pseudouridine synthase, modifies 50S subunits more specifically and efficiently than free 23S rRNA. *RNA* 13: 1868-1876.

**Wilson, D.N., Blaha, G., Connell, S. R., Ivanov, P. V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y. and Nierhaus, K. H.** (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Curr Protein Pept Sci* 3: 1-53.

**Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H.** (2003). The ribosome through the looking glass. *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 3464-3486.

**Woese, C. R., Magrum, L. J., Gupta, R., Siegel, R.B., Stahl, D. A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J., Gutell, R., Hogan, J. J. and Noller, H. F.** (1980). Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res* 8: 2275-2293.

**Raamatud:**

**Sergiev, P. V., Golovina, A. Y., Prokhorova, I. V., Sergeeva, O. V., Osterman, I. A., Nesterchuk, M. V., Burakovsky, D. E., Bogdanov, A. A. and Dontsova, O. A.** 2011. Modifications of ribosomal RNA: from enzymes to function, p. 97-110. *In* M. V. Rodnina, W. Wintermayer, and R. Green, *Ribosome structure, function and dynamics*, SpringerWien New York.

**Tymoczko, J. L., Berg, J.M. and Stryer, L.** 2013. Protein synthesis, p.645-650. *In* Tymoczko, J. L., Berg, J.M. and Stryer, L, *Biochemistry a short course*, W.H. Freeman and company, New York.

### **Kasutatud veebiaadressid**

[http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg\\_unit.html](http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg_unit.html)

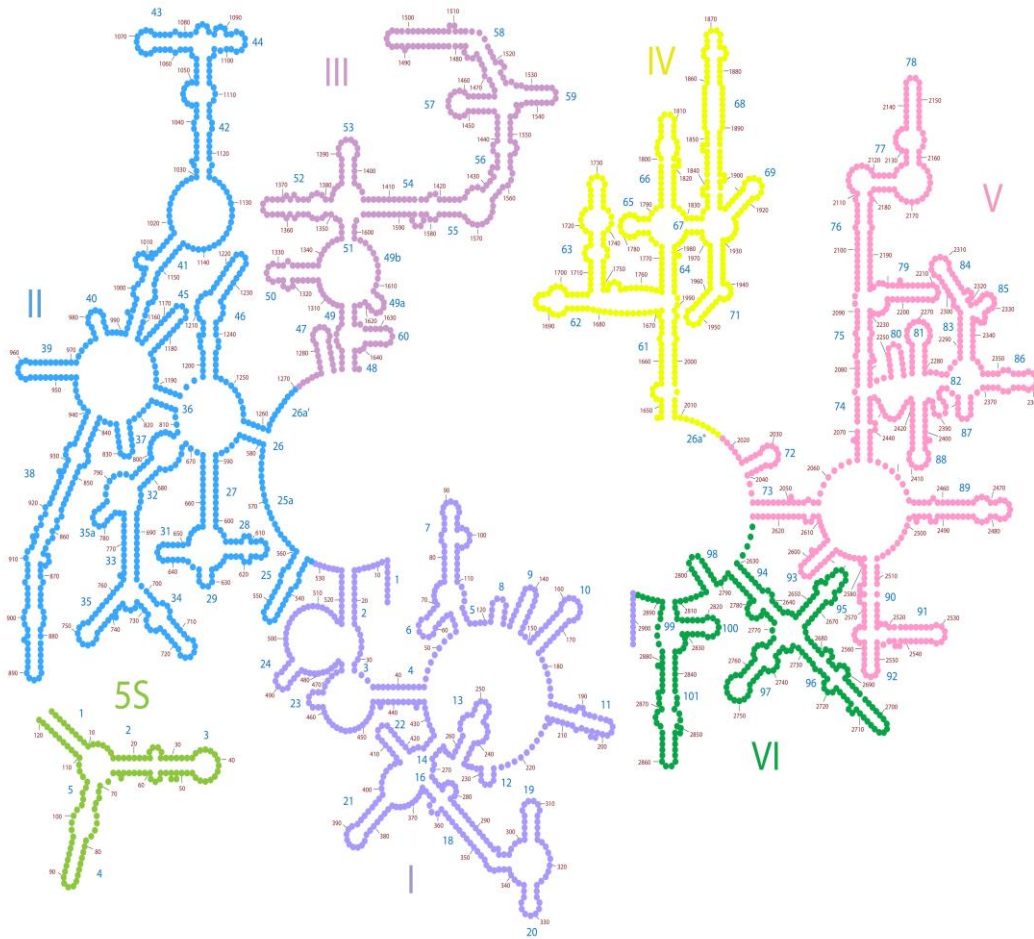
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/502158/ribosomal-RNA-rRNA>

<http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/>

## Lisad

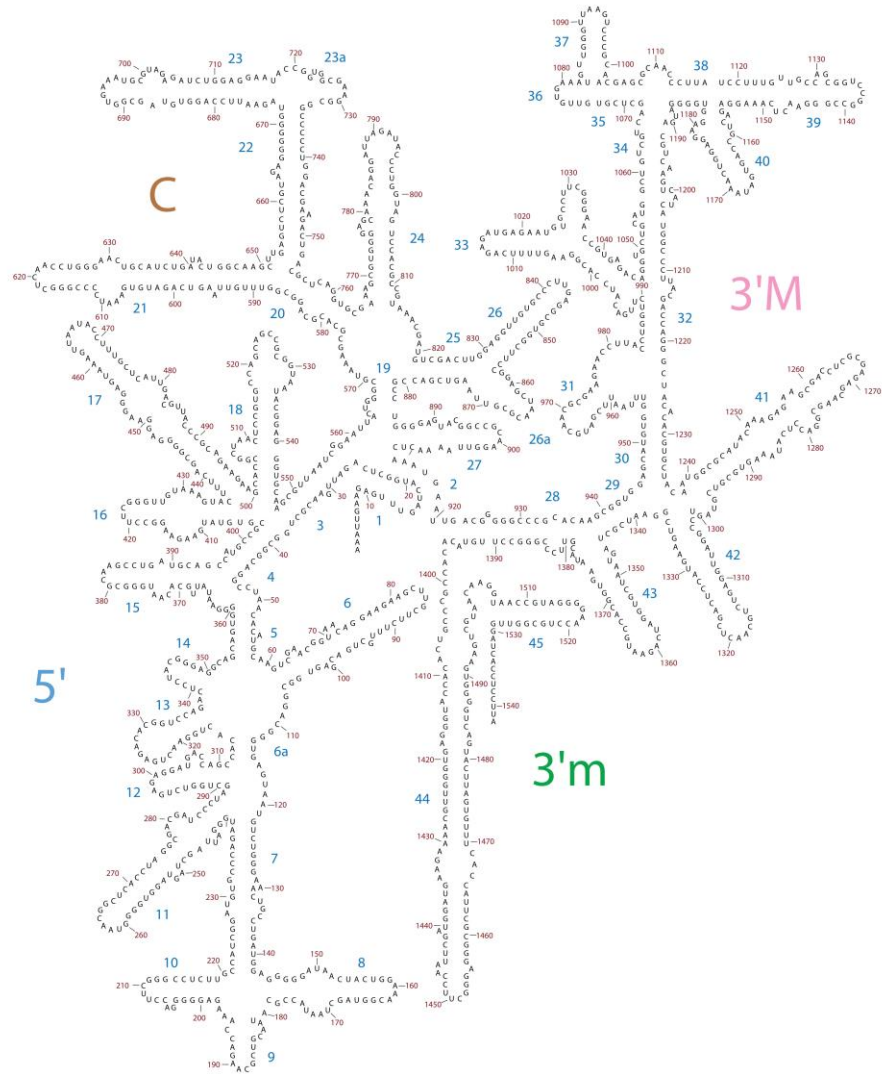
### Lisa 1.

*Escherichia coli* suure ribosomaalse rRNA subühiku sekundaarstruktuur (<http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/>). Sekundaarstruktuuri kuus domeenid ja 5S rRNA on vastavalt tähistatud.



## Lisa 2.

*Escherichia coli* väikse ribosomaalse RNA subühiku sekundaarstruktuur (<http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/>). Sekundaarstruktuuri 5', tsentraalne, 3' suur ja 3' väike domeen on vastavalt tähistatud.



## Lihtlitsents

Mina Natalja Garber

15.04.1991

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Kimäärse pseudouridiini süntaasi spetsiifika iseloomustamine

mille juhendaja on PhD Margus Leppik

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.14