

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

23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju ribosoomide biogeneesile

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia

12 EAP

Carolin Kattel

Juhendaja PhD Margus Leppik

TARTU 2019

INFOLEHT

23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju ribosoomide biogeneesile

Lühikokkuvõte: Ribosoomi funktsiooniks rakus on valkude biosüntees ehk translatsioon. *Escherichia coli* ribosoom koosneb väikesest (30S) ja suurest (50S) subühikust. Suur subühik koosneb 23S rRNA-st, 5S rRNA-st ja r-valkudest. 23S rRNA südamikdomeeniks on domeen 0, mis ühendab omavahel kõiki ülejäänud 23S rRNA domeene (I-VI). Bakalaureusetöö eesmärgiks oli selgitada 23S rRNA domeeni 0 heeliksiite 25a ja 72 rolli ribosoomide biogeneesis, kasutades suunatud mutageneesi. Domeeni 0 heeliksiite 25a ja 72 deletsioone sisaldavate 23S rRNA variantide ekspressioon põhjustab suurenenud 50S subühikute hulga rakus. Domeeni 0 heeliksis 72 punktmutatsiooni sisaldava 23S rRNA variandi ekspressioon põhjustab bakterirakkude pikenenud generatsiooniaega. Käesoleva töö tulemused viitavad, et mutatsioonid domeenis 0 põhjustavad suuremal või vähemal määral ribosoomi 50S subühiku assambleerimise defekte.

CERCS teaduseriala: P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: ribosoom, 50S subühik, 23S rRNA, domeen 0, ribosoomi assambleerimine

The effect of mutations in 23S rRNA domain 0 on ribosome biogenesis

Abstract: Ribosomes carry out a fundamental process in cells – the biosynthesis of proteins, also known as translation. Bacterial 70S ribosome is formed of the small subunit 30S and the large subunit 50S. *E. coli* large ribosomal subunit is composed of two rRNA molecules – 23S rRNA, 5S rRNA – and r-proteins. The center domain of the 23S rRNA is domain 0 which unites all other domains (I-VI) of 23S rRNA. The aim of this bachelor's thesis was to describe the role of 23S rRNA's helices 25a and 72 in ribosome biogenesis, using site-specific mutagenesis. The expression of 23S rRNA variants which contain deletions in domain 0's helices 25a and 72 result in an increased amount of free 50S subunits. The expression of 23S rRNA variant which contains a site-directed mutation results in decreased growth rate. The results of this thesis refer that mutations in 23S rRNA's domain 0 cause assembly defects of ribosomal 50S subunit.

CERCS research specialization: P320 nucleic acids, protein synthesis

Keywords: ribosome, 50S subunit, 23S rRNA, domain 0, ribosome assembly.

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Ülevaade prokarüootsest ribosoomist	7
1.2. 16S ja 23S ribosomaalse RNA struktuur	8
1.3. 23S rRNA domeenid	10
1.5. 30S ja 50S ribosomaalsete subühikute assambleerimine	15
1.5.1. In vivo assambleerimise intermediaarsed rRNA prekursorid ja rRNA protsessimine	16
1.5.2. rRNA modifikatsioonid	18
1.6. Translatsioon	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärk	23
2.2. Materjal	23
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> tüved ja plasmiidid	23
2.2.2. Söötmed ja puhvrid	24
2.2.3. Oligonukleotiidid	25
2.3. Metoodika	26
2.3.1. rRNA ekspressioonivektorite konstrueerimine	26
2.3.2. Bakterirakkude generatsiooniaegade määramine	33
2.3.3. Rakkude lüüsimine ja ribosoomi partiklite kogumine	33
2.3.4. rRNA puhastamine ribosomaalsetest partiklitest	34
2.3.5. Praimeri kineerimine	35
2.3.6. Minisekveneerimine kineeritud praimeriga	35
2.3.7. Mutantsete ribosoomide affiinsuspuhastamine	36
2.3.8. Oligonukleotiidi 23S MG pikendamine	37
2.3.9. Ribosomaalse RNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC meetodiga	37
2.4. TULEMUSED	39
2.4.1. rRNA ekspressioonivektorite konstrueerimine ja kontrollimine	39
2.4.2. Konstrueeritud 23S rRNA variantide mõju <i>E. coli</i> rakkude kasvule	39
2.4.3. Ribosoomide jaotus sahharoosgradiendis	41
2.4.4. 23S rRNA variantide jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides	42
2.4.5. Plasmiidilt pBAD-t Δ H72 ekspresseeritud 23S rRNA protsessituse ja nukleosiidse koostise analüüs	44
2.5. Arutelu	48
KOKKUVÕTE	50
SUMMARY	51

TÄNUSÕNAD	53
KASUTATUD ALLIKAD	54
LISAD	63
Lisa 1	63
Lisa 2	63
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	65

KASUTATUD LÜHENDID

aa-tRNA – aminoatsüül-tRNA

Amp – ampitsilliin

Ara – arabinoos

A-sait – ribosoomi aminoatsüül-tRNA sait

D – dihidrouridiin

DP – dissotsiatsiooni puhver

E. coli – *Escherichia coli* ehk soolekepike

E-sait – ribosoomi *exit*-sait

FS – formamiid STOP

ho⁵C – 5-hüdroksütsütidiin

HPLC – kõrgsurvedelikkromatograafia (ingl *high-pressure liquid chromatography*)

LLP – lüüsilahjenduspuhver

LP – lüüsipuhver

P-sait – ribosoomi peptidüül-tRNA sait

PTC - peptidüültransferaasne tsenter

S – Svedbergi ühik

SD – Shine-Dalgarno järjestus

SRL – sartsiin-ritsiin ling

TBE – tris-boorhape-EDTA puhver

U – ühik (ingl *unit*)

wt – metsiktüüp (ingl *wild type*)

Ψ - pseudouridiin

SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribosomaalsetest RNA-dest ja ribosomaalsetest valkudest koosnev kompleks, mis viib rakkudes läbi võtmetähtsusega protsessi - translatsiooni ehk valkude biosünteesi. Ribosoom koosneb alati kahest erineva suurusega subühikust. *Escherichia coli* ribosoom koosneb väikesest 30S ja suurest 50S subühikust. Väike subühik koosneb 21 ribosomaalsest valgust ja 16S ribosomaalsest RNA-st ning vastutab mRNAs sisalduva informatsiooni dekodeerimise eest. Suur subühik koosneb 33 ribosomaalsest valgust ja 5S ning 23S rRNA-st. 50S subühik vastutab peptiidsideme katalüüsamise eest.

Võtmesõna ribosoomi funktsionaalsuse mõistmisel on ribosomaalse RNA tertsiaarstruktuuril, mille struktuurset ülesehitust aga ei toetanud varasemalt teadaolev rRNA sekundaarstruktuuri mudel. 2013. aastal restruktureerisid Petrov jt ribosoomi suure subühiku 23S ning 5S rRNA sekundaarstruktuuri, mille käigus identifitseeriti kõiki teisi 23S rRNA domeene (I, II, III, IV, V, VI) omavahel ühendav kõrgelt struktureeritud südamik, mis defineeriti domeen 0-na (Petrov *et al.*, 2013). Varasemates sekundaarstruktuurides kujutati ribosoomi tsentraalset osa üksikahelalise ringina, mida ei defineeritud eraldi domeenina (Noller *et al.*, 1981).

Bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade prokarüootsest ribosoomist, ribosoomi koosseisu kuuluvatest rRNA-dest ja nende sünteesist, ribosomaalsete subühikute assambleerimisest, rRNA-le lisatavatest modifikatsioonidest ning translatsioonist. Töö eksperimentaalses osas selgitatakse 23S rRNA domeenis 0 mutatsioone sisaldavate 23S rRNA variantide ekspresseerimise mõju ribosoomi biogeneesile ja funktsionaalsusele.

Käesoleva töö üldeesmärgiks oli välja selgitada, kas mutatsioonid 23S rRNA domeenis 0 omavad mõju ribosoomide biogeneesile.

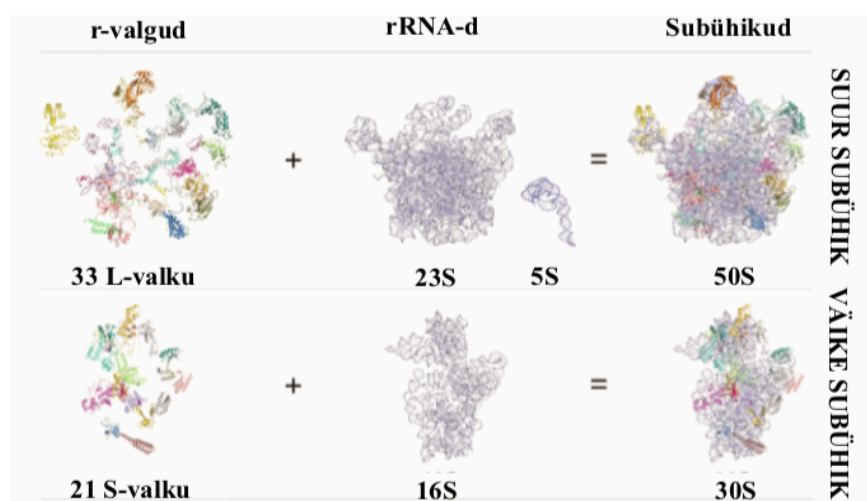
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ülevaade prokarüootsest ribosoomist

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ensüümid, mis kasutavad valkude biosünteesi ehk translatsiooni protsessis matriitsina (ingl *template*) mRNA-d (ingl *messenger RNA*) ning aminohapete transporteritena tRNA-d (ingl *transfer RNA*). Rakkudes toimuvat võtmetähtsusega protsessi – valkude biosünteesi – läbi viivad ensüümid koosnevad nii ribosomaalsetest RNA-dest (rRNA-dest) kui ka ribosomaalsetest valkudest (r-valkudest). Bakteriaalses ribosoomis on rRNA-de ja r-valkude massisuhe vastavalt ligikaudu 2:1 (Melnikov *et al.*, 2012).

Erinevalt valdavast enamusest rakulistest polümeraasidest põhineb ribosoomi katalüütiline aktiivsus RNA-l – tegemist on ribosüümiga (Noller *et al.*, 1992; Green ja Noller, 1997). Ribosoomide koostises olevad valgud toimivad seevastu pigem ribosoomide struktuursete komponentidena, asetsedes enamjaolt ribosoomi pinnal ja eemal funktsionaalsetest saitidest (Davies *et al.*, 1998).

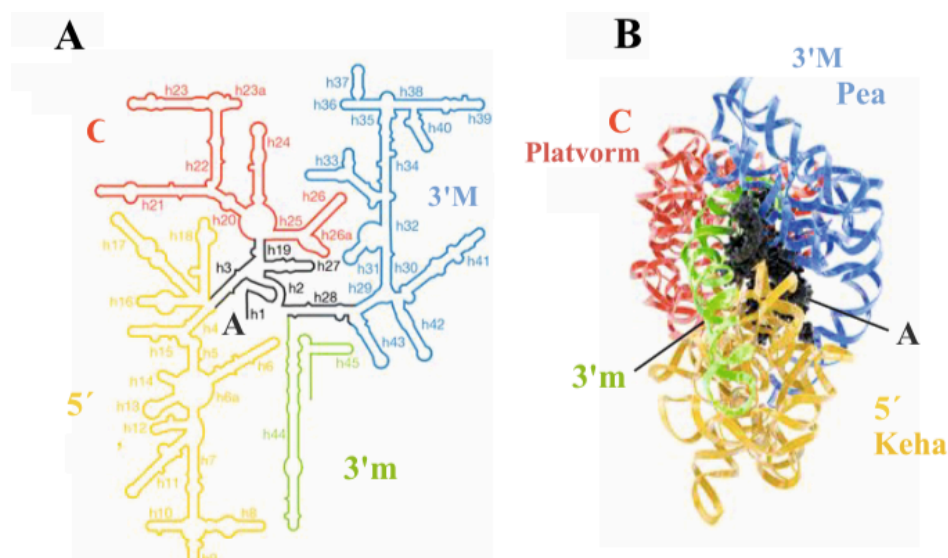
Funktsionaalne prokarüootne ribosoom koosneb väikesest 30S ja suurest 50S subühikust (Joonis 1). *Escherichia coli* ribosoomi 30S subühik koosneb 21 ribosoomi valgust (S1-S21) ja 16S rRNAst, mis sisaldab 1542 nukleotiidi. *Escherichia coli* 50S subühik koosneb 33 ribosoomi valgust (L1-L36) ning kahest rRNAst – 23S rRNAst, mis sisaldab 2904 nukleotiidi ning 5S rRNAst, mis sisaldab 120 nukleotiidi (Melnikov *et al.*, 2012; Wittmann, 1976). 30S ja 50S subühikud moodustavad subühikute kokkupuutepindasid kooshoidvate intermolekulaarsete sildade kaudu translatsiooniliselt aktiivse 70S ribosoomi (Yusupov *et al.*, 2001).



Joonis 1. Prokarüootse ribosoomi komponendid. r-valgud ja rRNA-d on kujutatud nii eraldi kui ka väikese ja suure subühiku koosseisus. r-valgud on joonisel tähistatud mitmevärvilisena ning rRNA-d hallina. Joonis kohandatud (Ero, 2012).

1.2. 16S ja 23S ribosomaalse RNA struktuur

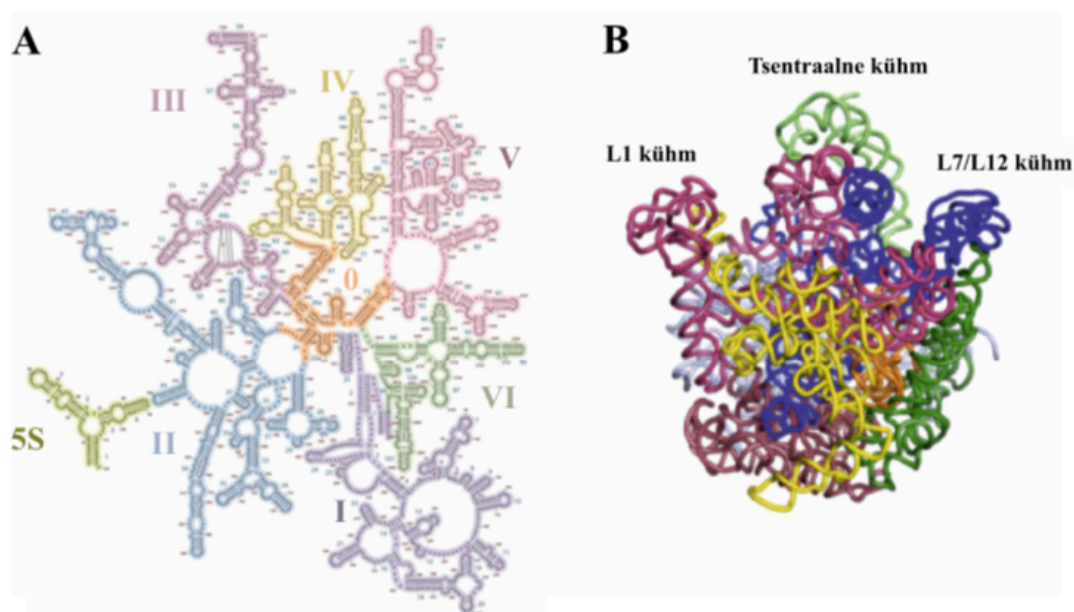
16S rRNA sekundaarstruktuuris eristuvad neli kompaktselt domeeni: tsentraalne domeen (C), 5' domeen (5'), 3'-mažoorne domeen (3'M) ja 3'-minoorne domeen (3'm), mida ühendab omavahel 16S rRNA keskne domeen A (Joonis 2A) (Gulen *et al.*, 2016). 16S rRNA tertsiaarstruktuuris on võimalik sekundaarstruktuuril kujutatud domeene selgelt omavahel eristada (Joonis 2B) (Gao *et al.*, 2003; Wimberly *et al.*, 2000). Kõik sekundaarstruktuuri domeenid, v.a. 3' minoorne domeen ja domeen A, moodustavad 16S rRNA tertsiaarstruktuuris morfoloogilise elemendi, millele on tinglikult antud nimed: pea, (16S rRNA 3'-mažoorne domeen), platvorm (tsentraalne domeen) ja keha (5' domeen) (Stagg *et al.*, 2013; Wimberly *et al.*, 2000). 16S rRNA 3'-otsas paikneb anti-Shine-Dalgarno (anti-SD) järjestus (5')A-C-C-U-C-C(3'), mis translatsiooni alustamisel paardub mRNA translatsiooni initsiatsiooni alguspunktist (nukleotiidsest järjestusest A-U-G) 5' suunas asuva komplementaarse Shine-Dalgarno (SD) järjestusega (5')G-G-A-G-G-U(3') (Shine ja Dalgarno, 1974).



Joonis 2. *E. coli* 16S rRNA sekundaar- ja tertsiaarstruktuur. (A) 16S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on märgitud 16S rRNA sekundaarstruktuuri elemendid: 5' domeen (kollane), domeen A (must), tsentraalne domeen (C) (punane), 3' mažoorne (3'M) (sinine) ja 3' minoorne domeen (3'm) (heleroheline). (B) 16S rRNA tertsiaarstruktuur. Tertsiaarstruktuuril on sekundaarstruktuuri elemendid kujutatud samade värvidega, mis paneelil A. Joonisel on lisaks märgitud 16S rRNA tertsiaarstruktuuris eristuvad morfoloogilised elemendid: keha – mis moodustub valdavalt 5' domeenist, platvorm – moodustub tsentraalsest domeenist, pea – moodustub 3' mažoorsest domeenist. Joonis kohandatud (Gulen *et al.*, 2016).

2013. aastal restruktureerisid Petrov jt 23S rRNA sekundaarstruktuuri, võttes aluseks rRNA 3D- ehk tertsiaarstruktuuri. *De novo* re-determinatsiooni põhjusena toodi välja asjaolu, et fülogeneetiliste uuringute järgi koostatud 23S rRNA sekundaarstruktuuri südamik (ingl *core*) on esitatud ringjalt asuvate pikendatud üksikahelatena, millest hargnesid välja kuus eristatavat 23S rRNA domeeni (Lisa 1) (Noller *et al.*, 1981), mis ei ole kooskõlas ribosoomi struktuursete

andmetega. Kristallstruktuurides on 23S rRNA keskne osa kõrgelt struktureeritud (Petrov *et al.*, 2013). 23S rRNA sekundaarstruktuuri südamiku restruktureerimise tulemusena valmis uus 23S rRNA sekundaarstruktuuri mudel, mis sisaldab endas eelneva kuue (I-VI) domeeni asemel seitset. Identifitseeriti kõiki teisi 23S rRNA domeene (I-VI) omavahel ühendav südamik, mis defineeriti domeen 0-na (Petrov *et al.*, 2013) (Joonis 3A). Seega, sarnaselt 16S rRNA sekundaarstruktuuriga, sisaldub ka 23S rRNA sekundaarstruktuuris tsentraalne, kõrgelt struktureeritud, südamikdomeen, millest ülejäänud rRNA domeenid välja hargnevad.



Joonis 3. *E. coli* 23S ja 5S rRNA sekundaar- ja tertsiaarstruktuur. (A) 23S ja 5S rRNA sekundaarstruktuurid. Joonisel on näidatud domeenid 0 (beež), I (helelilla), II (sinine), III (tumeroosa), IV (kollane), V (helerosa), VI (tumeroheline) ja 5S rRNA (heleroheline) (Petrov *et al.*, 2013). (B) 23S ja 5S rRNA tertsiaarstruktuur vaadatuna subühikutevahelisi kontakte andva pinna poolt. Tertsiaarstruktuuril on domeen I kujutatud siniselt, domeen II ja 5S rRNA heleroheliselt, domeen III tumeroheliselt, domeen IV kollaselt, domeen V punaselt ja domeen VI lillalt. Joonisel on märgitud struktuurist eristuvad kolm kühmu: L1 kühm, tsentraalne kühm ning L7/L12 kühm. Joonis kohandatud (Yusupov *et al.*, 2001).

23S rRNA moodustab tertsiaarstruktuuris globulaarse struktuuri, millel on eristatavad kolm kühmu – L1 kühm, tsentraalne ja L7/L12 kühm (Joonis 3B) (Ban *et al.*, 2000). Tsentraalne kühm koosneb 5S rRNAst ja sellega assotsieerunud valkudest, L1 kühm on seotud ribosomaalse valgu L1 ja L7/L12 kühm vastavalt L7 ning L12 ribosomaalsete valkudega (Ban *et al.*, 2000).

Erinevalt 16S rRNA-st, mille sekundaarstruktuuri elemendid moodustavad tertsiaarstruktuuris üksteisest selgelt eristatavad morfoloogilised elemendid, on 23S rRNA tertsiaarstruktuuri korral tegemist tihedalt läbipõimunud struktuuriga. See tähendab, et 50S alaühikus on 23S rRNA domeenid üksteisega tihedasti läbi põimunud ja ükski sekundaarstruktuuri domeen pole tertsiaarstruktuuris selgelt eristatav – tegemist on monoliitse struktuuriga.

Ribosoomi suure subühiku kaheksandaks domeeniks võib tinglikult pidada 5S rRNA-d, mis moodustab põhiosa 50S subühiku tsentraalsest külmust ja on 50S subühiku funktsionaalsuseks oluline komponent. 5S rRNA interakteerub 23S rRNA domeenidega II ja V ning osaleb 50S subühiku assambleerimise käigus peptidüültransferaasse tsentri (PTC) korrektse voltumises (Khaitovich ja Mankin, 1999).

1.3. 23S rRNA domeenid

Järgnevas peatükis antakse lühike ülevaade 23S rRNA domeenidest 0, I, II, III, IV, V ja VI. Töö temaatikast lähtudes keskendutakse põhjalikumalt domeenile 0.

Escherichia coli 23S ribosomaalne RNA koosneb 2904 nukleotiidist, mis sekundaarstruktuuris moodustab seitse domeeni (Joonis 3A). Suure subühiku kaheksandaks domeeniks võib tinglikult pidada 5S rRNA-d (Joonis 3A).

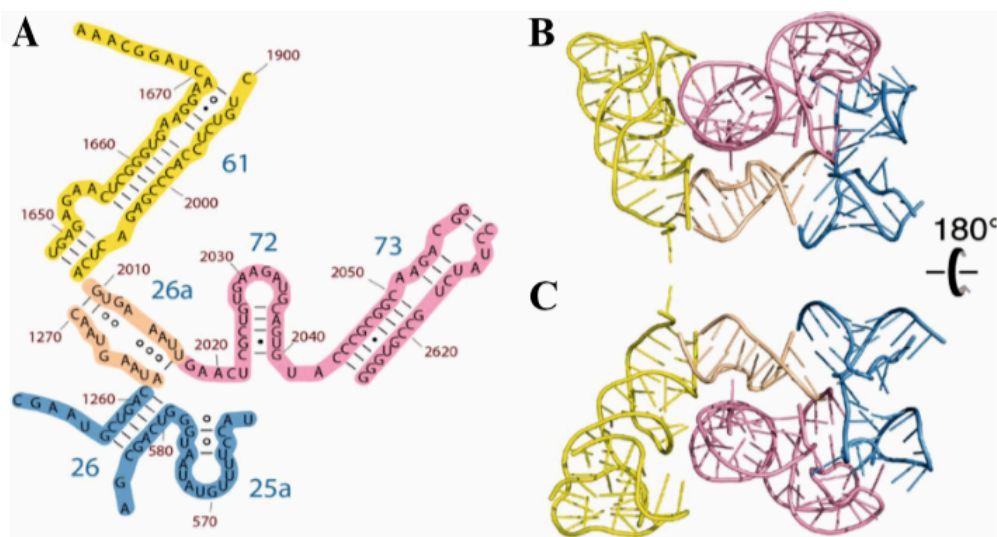
Varasemalt defineeriti rRNA domeeni kui struktuuri, mis on võimeline voltuma autonoomselt (Noller *et al.*, 1981). Tänapäeval on rRNA domeen defineeritud kui kompaktne ja modulaarne struktuur, mis on stabiliseeritud struktuurisestest molekulaarsete interaktsioonide poolt ja on võimeline voltuma autonoomselt (Petrov *et al.*, 2013). rRNA domeenisiseseid sekundaarstruktuure – heelikseid või juuksenõel- (ingl *hairpin*) struktuure vaadeldakse samuti autonoomsetena ja kuuluvatena ainult ühte domeeni (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen 0

Domeen 0 (23S rRNA nukleotiidid 562-586, 1251-1270, 1648-1678, 1990-2057, 2611-2625) defineeriti 50S subühiku kristallstruktuuri alusel (Petrov *et al.*, 2013). 23S rRNA tsentraalse rõnga üheaahelalistest regioonidest defineeriti domeen 0-i heeliksid 25a (nukleotiidid 562-578) ja 26a (nukleotiidid 1262-1270, 2010-2017) (Joonis 4A). Varasema definitsiooni järgi 23S rRNA sekundaarstruktuuri domeeni II kuulunud heeliks 26 (nukleotiidid 579-586, 1251-1261) määrati kuuluvaks domeen 0-i. Domeenist IV defineeriti domeen 0-i kuuluvaks heeliks 61 (nukleotiidid 1648-1678, 1900-2009) ja domeenist V heeliksid 72 (nukleotiidid 2018-2041) ning 73 (nukleotiidid 2042-2057, 2611-2625) (Petrov *et al.*, 2013).

Heeliksita 25a, 26, 26a, 61, 72 ja 73 valik domeeni 0 osadena põhines tertsiaarstruktuuris domeeni elementide tihedal seotusel üksteisega ja vähem ümbritseva rRNA-ga. Heeliks 26a moodustab domeen 0-i heeliksiga 26, 61 ja 73 ühe lämmastikalus-lämmastikalus paardumise,

kolm lämmastikalus-fosfaat või suhkur-fosfaat paardumist ja ühe RNA-Mg²⁺-RNA interaktsiooni. Lisaks interaktsioonidele heeliksiga 26a on heeliksid 61 ja 73 stabiliseeritud ka omavaheliste interaktsioonide kaudu. Heeliks 72 interakteerub heeliksiga 73. Heeliks 72 ja 73 vahele interkaleerub heeliks 25a, interakteerudes seejuures ka heeliksiga 26 (Bokov *et al.*, 2009; Petrov *et al.*, 2013). Joonisel 4A kujutatud heeliksi 61 üksikahelaline pikendus on tertsiaarstruktuuris (Joonised 4B, 4C) tihedalt keerdunud domeen 0-i teiste elementide ümber. Sarnaselt interakteeruvad ka heeliksi 26 üksikahelalised pikendused – voltudes tagasi nii üksteisele kui ka heeliksi 26 terminaalsele osale (Petrov *et al.*, 2013).



Joonis 4. 23S rRNA domeen 0, ribosoomi suure subühiku RNA südamik (ingl *core*), mis ühendab omavahel kõiki ülejäänud 23S rRNA domeene. (A) 23S rRNA domeen 0-i sekundaarstruktuur. Heeliksid on nende omavaheliseks eristamiseks nummerdatud ja erinevates toonides värvitud. Heeliksivärvused on alamjoonistel ühtivad. (B) Domeen 0-i tertsiaarstruktuur ribosoomi suure subühiku kristallstruktuurist. (C) Domeen 0 on võrrelduna alamjoonisega (B) pööratud 180° võrra. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen 0, moodustades suure subühiku südamiku, määrab ära ka ülejäänud 23S rRNA domeenide (I-VI) paigutuse. Domeenil 0 tundub olevat ka teine struktuurine roll. Ta hoiab peptidüültransferaasse tsentri (PTC) ribosoomi A- ja P-saidi regiooni üksteise läheduses. Lisaks sellele moodustab domeen 0 osa peptiidahela väljumistunnelist (Petrov *et al.*, 2013). Domeen 0 sisaldab vaid ühte RNA modifikatsiooni: m⁶A2030 (Golovina *et al.*, 2012).

Domeen I

Domeeni I moodustavad 23S rRNA heeliksid 1-25 (nukleotiidid 1-561 ja 2895-2904) (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Tertsiaarstruktuuris paikneb domeen I ribosoomi 50S subühiku tagaküljel, L1 kühmu all. Domeen I moodustab kontakte 23S rRNA domeenidega II, III, IV ning V (Ban *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001). Domeenis I puuduvad RNA modifikatsioonid (Petrov *et al.*, 2013)

Domeen II

Domeen II (23S rRNA nukleotiidid 587-1250) moodustub 23S rRNA heeliksitest 27-46 (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Domeen II on 23S rRNA domeenidest suurim, moodustades suurema osa 50S subühiku tagaküljest, vaadeldes subühikutevahelisi kontakte andva pinna poolt (Ban *et al.*, 2000). Selle domeeni tertsiaarstruktuuris on eristatavad kolm väljaulatuvat osa, millest ühe moodustavad rRNA heeliksid 42-44, mis moodustavad L7/L12 kühmu RNA komponendi ja interakteeruvad translatsiooni käigus elongatsioonifaktoritega; teine osa koosneb heeliksist 38, mille puhul on tegemist 23S rRNA pikima hargnemata elemendiga. Kolmanda väljaulatuva osa moodustavad heeliksid 32-35, annavad kontakte ribosoomi väikese subühikuga (Ban *et al.*, 2000). Domeen II sisaldab nelja RNA modifikatsiooni: m¹G745, Ψ746, m⁵U747 ja Ψ955 (Ofegand ja Del Campo, 2004).

Domeen III

Domeen III moodustub 23S rRNA heeliksitest 47-60 (23S rRNA nukleotiidid 1271-1647) (Petrov *et al.*, 2013). Domeen III moodustab, vaadatuna subühikutevahelisi kontakte andva pinna poolt, 50S subühiku vasakpoolse alumise regiooni (Joonis 3B). Domeen III omab kõige ulatuslikumaid kontakte domeeniga II, kuid interaktsioonid esinevad ka domeenidega I, IV ja VI. Erinevalt kõigist teistest 23S rRNA domeenidest ei anna domeen III mitte ühtegi interaktsiooni domeeniga V (Ban *et al.*, 2000). Domeen III sisaldab modifikatsiooni m⁶A1618 (Sergiev *et al.*, 2008)

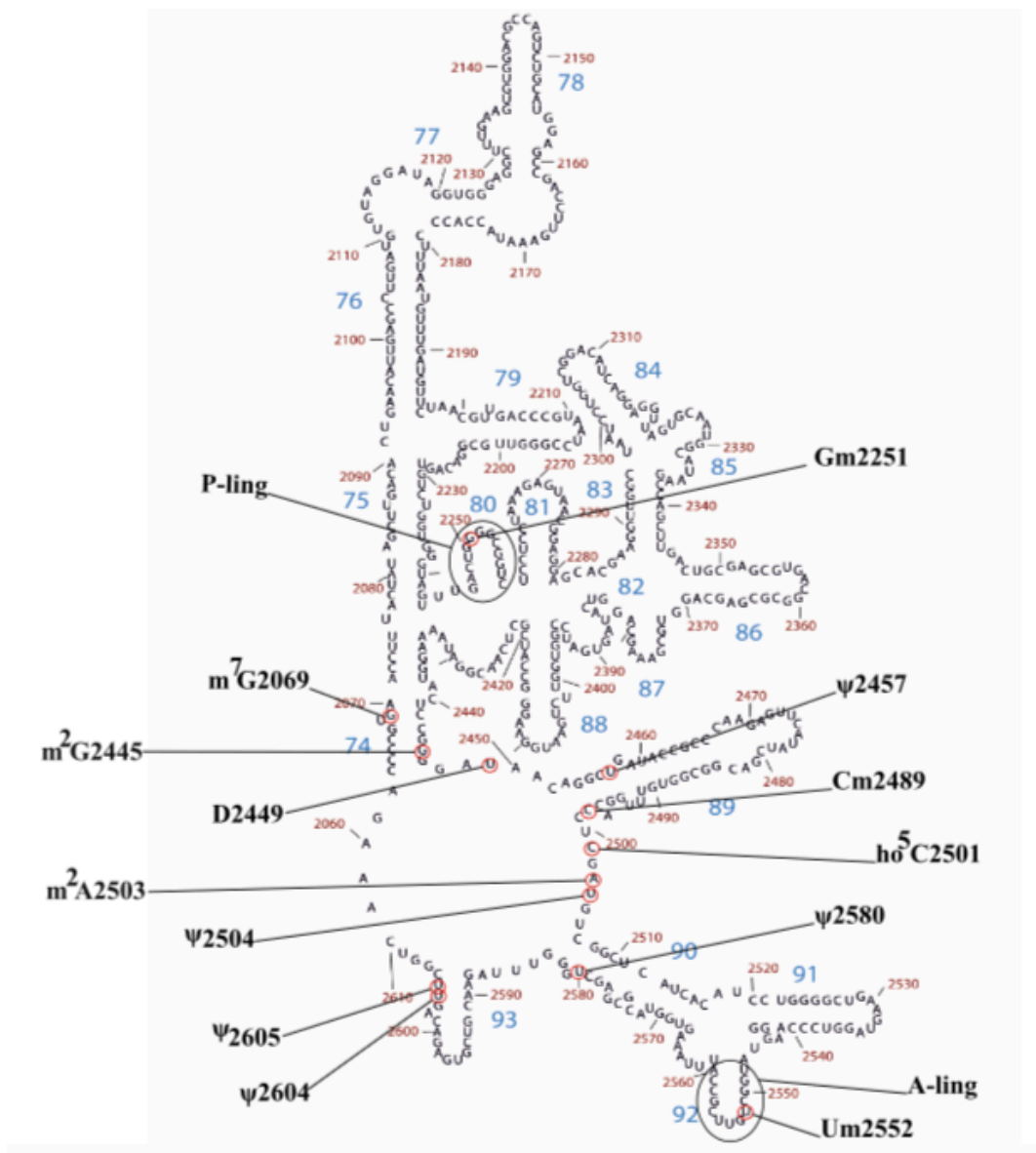
Domeen IV

Domeen IV (23S rRNA nukleotiidid 1679-1989) on moodustunud 23S rRNA heeliksitest 62-71 (Petrov *et al.*, 2013). Domeen IV moodustab valdava osa ribosoomi suure 50S subühiku kokkupuutepinnast väikese 30S subühikuga ja on 23S rRNA peamine subühikutevaheliste sildade moodustaja (Ban *et al.*, 2000). Domeen IV moodustab kontakte ka 23S rRNA domeenidega III ja V (Ban *et al.*, 2000). Domeen IV sisaldab 23S rRNA modifikatsioone m²G1835, Ψ1911, m³Ψ1915, Ψ1917, m⁵U1939 ja m⁵C1962 (Del Campo *et al.*, 2005; Ofengand, 2002).

Domeen V

Domeen V (23S rRNA nukleotiidid 2058-2610) on moodustunud 23S rRNA heeliksitest 74-93 (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Domeen V, mis on tertsiaarstruktuuris paigutatud suure subühiku keskele, 23S rRNA domeenide IV ja II vahele, on vastutav ribosoomi peptidüültransferaasse aktiivsuse eest (Garrett *et al.*, 1996). Tertsiaarstruktuuris on domeeni V võimalik jagada kolmeks peamiseks regiooniks: esimene regioon algab heeliksiga 75 ja moodustab seondumissaidi ribosomaalsele valgule L1; teine regioon koosneb heeliksitest 80-88 ning moodustab põhiosa tsentraalse kühmu RNA-st; kolmas regioon sisaldab heelikseid 89-93, ulatub ettepoole domeenini VI ja aitab stabiliseerida ribosoomi elongatsioonifaktorite seondumist (Ban *et al.*, 2000).

Domeenis V paikneb kõrgelt konserveerunud A-ling (23S rRNA heeliks-ling 92) (Joonis 5), mis osaleb aminoatsüül-tRNA sidumisel ribosoomi A-saiti. A-ling sisaldab kõrgelt konserveerunud RNA modifikatsiooni Um2552 (Blanchard ja Puglisi, 2001). Domeenis V paikneb ka rRNA P-ling (23S rRNA heeliks-ling 80) (Joonis 5), mis seondub peptidüül-tRNA 3' otsas asuva CCA järjestusega. P-ling sisaldab ühte modifikatsiooni positsioonis Gm2251 (Blanchard ja Puglisi, 2001). P-lingu läheduses paikneb ribosoomi E-sait (ingl k *E-site*), mille kaudu deatsüleeritud tRNA ribosoomist dissotsieerub (Moazed ja Noller, 1989). Domeenis V paikneb 25-st 23S rRNA modifikatsioonist 13 modifikatsiooni: m⁷G2069, Gm2251, m²G2445, D2449, Ψ2457, Cm2498, ho⁵C2501, m²A2503, Ψ2504, Um2552, Ψ2580, Ψ2604 ja Ψ2605 (Joonis 5) (Ofengand ja Del Campo, 2004).



Joonis 5. 23S rRNA domeen V. Joonisel on näidatud domeenis V sisalduvad modifikatsioonid. Punaste ringidega on märgitud 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide asukohad, märgitud on ka modifikatsiooni tüüp antud positsioonis. Siniste numbritega on märgitud 23S rRNA domeen V heeliksid. Lisaks on näidatud domeenis V paiknevad A- ja P-ling. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen VI

Domeen VI (nukleotiidid 2626-2894) moodustub heeliksitest 94-97 (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Tegemist on *E. coli* 23S rRNA kõige väiksema domeeniga, mille olulisim osa on kõrgelt konserveerunud sartsiin-ritsiin ling (SRL) (heeliks 95), mis on vajalik translatsioonifaktorite seondumiseks ja GTP hüdrolüüsiks. Ribosoomi on võimalik inaktiveerida SRL nukleotiidide G2661 ja A2662 vahelise fosfodiestersideme hüdrolüüsimisel α -sartsiooni poolt ning ka nukleotiidilt A2660 lämmastikaluse eemaldamisel ritsiini poolt, sellest ka antud lingu nimetus (Ban *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2012). *E. coli* 23S rRNA domeenis VI puuduvad teadaolevalt RNA modifikatsioonid (Fischer *et al.*, 2015).

1.4. Ribosomaalsete RNA-de süntees

Ribosomaalsete RNA-de süntees ja ribosoomide biogenees on otseses seoses bakterirakku ümbritsevate keskkonnatingimustega. Kiiresti kasvavates *Escherichia coli* rakkudes on ribosoomide arv ligikaudu 70 000 raku kohta, samas kui ebasoodsates kasvutingimustes on bakterirakkudes ribosoomide arv rakus alla 20 000 (Bremer *et al.*, 1996).

Escherichia coli ribosomaalseid RNA-sid kodeerivad geenid on organiseerunud operonidesse, mis paiknevad üksteisega mittekattuvalt üle kogu genoomi (Ellwood *et al.*, 1982). rRNA operone (rrn operone), millelt transkribeeritakse kolme rRNA geeni (16S, 23S ja 5S rRNA geeni) ning vähemalt ühte tRNA geeni, on *E. coli* genoomis kokku seitse - *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* ja *rrnH* (Maeda *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2004). tRNA-sid kodeerivad alad paiknevad rRNA-sid kodeerivate geenide vahel. Täpsemalt kahes intergeenses speisseris (ingl *intergenic spacer*) - 16S ja 23S rRNA-d kodeerivate geenide vahel ja ka 23S rRNA-d ja 5S rRNA-d kodeerivate geenide vahel (Takada *et al.*, 2016).

Iga rrn operoni ekspressiooni reguleeritakse kahelt tandeemselt paiknevalt promooterilt (ingl *promoter*) – P1 ja P2, mis paiknevad üksteisest ligikaudu 120 aluspaari kaugusel (Jinks-Robertson *et al.*, 1987). Transkriptsioon P1 promooteritelt on efektiivsem ja sellest tulenevalt on P1-l oluline roll eelkõige rRNA kõrgetasemelises sünteesis toitaineterohkes söötmes, bakterirakkude eksponentsiaalses kasvufaasis. Ekspressioon promooterilt P2 muutub oluliseks toitainete vähenemisel ja bakterirakkude jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi, kuna toitainetevaeses söötmes inhibeeritakse P2 promootereid vähem, kui P1 promootereid. Sellest tulenevalt vastutavad P2 promooterid rRNA transkriptsiooni eest ebasoodsates kasvutingimustes tagades bakterile ribosoomide ja valgusünteesi jaoks basaalse (ingl *basal*) rRNA taseme (Maeda *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2004).

rRNA transkriptsiooni käigus sünteesitakse kõiki kolme ribosomaalset RNA-d (16S, 23S ja 5S rRNA-d) ja vähemalt ühte tRNA-d sisaldav primaarne transkript (Williamson, 2003). rRNA-de sekundaarstruktuur hakkab moodustuma juba primaarse transkripti sünteesi käigus (Williamson, 2003).

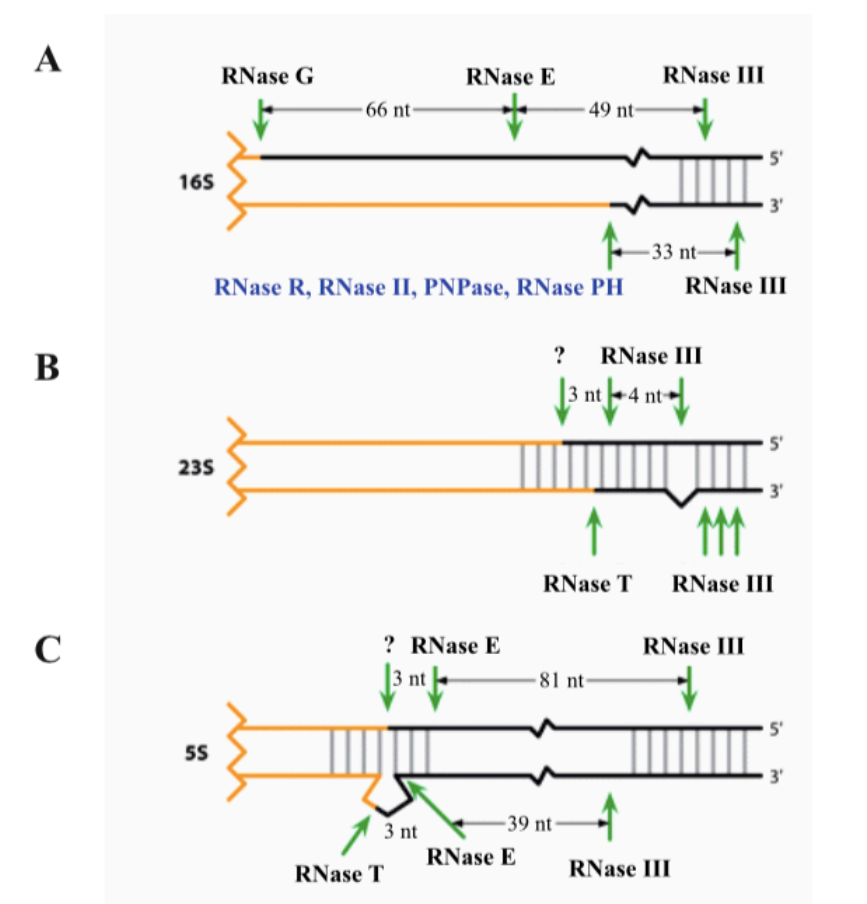
1.5. 30S ja 50S ribosomaalsete subühikute assambleerimine

Ribosomaalsete subühikute assambleerimise käigus leiab aset rRNA primaarsete transkriptide nukleolüütiline protsessimine küpseks 16S, 23S ja 5S rRNA-ks ning individuaalseks tRNA-ks rea nukleaaaside poolt (Apirion *et al.*, 1993; Srivasta *et al.*, 1990). Samaaegselt rRNA-de 5'- ja

3'-otste protsessimisega toimub ribosoomivalkude (r-valkude) järjestikune seondumine rRNA-dele ning rRNA nukleotiidide modifitseerimine (Zahra *et al.*, 2011). Seega ribosoomide biogenees on väga keeruline ja mitmeetapiline protsess.

1.5.1. In vivo assambleerimise intermediaarsed rRNA prekursorid ja rRNA protsessimine

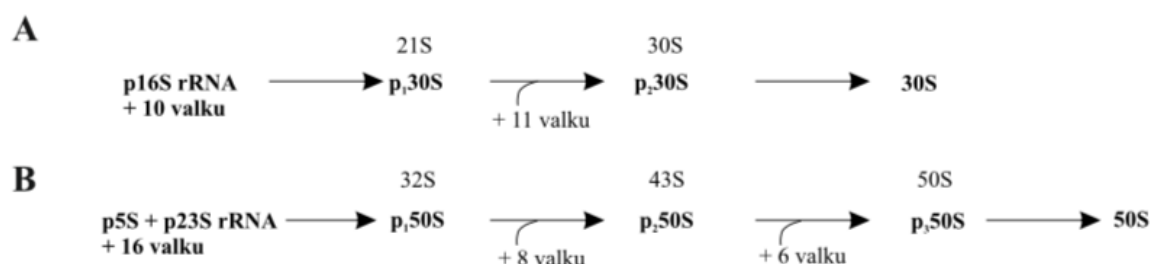
rRNA transkriptsioonile järgnevalt toimub primaarse transkripti nukleolüütiline protsessimine, milles osalevad vähemalt viis nukleasi. Esmane nukleolüütiline protsessimine viiakse läbi RNase III poolt selliselt, et tekivad 16S rRNA, 23S rRNA ja 5S rRNA prekursorid (Joonis 6). Vastavalt 17S rRNA, 25S rRNA ja 9S rRNA (Dunn ja Studier, 1973; Ginsburg ja Steitz, 1975; Nikolaev *et al.*, 1973). rRNA prekursoritele seonduvad kindlat järjekorda järgides ribosoomivalgud (Grondek ja Culver, 2004). Primaarsed r-valgud seonduvad stabiilselt otse vabale rRNA-le. Sekundaarsed ja tertsiaarsed r-valgud vajavad seandumiseks vastavalt kas ühe või mitme r-valgu eelnevat seandumist rRNA-le (Grondek ja Culver, 2004).



Joonis 6. Ribosomaalsete RNA-de transkriptsioonijärgne nukleolüütiline protsessimine. Joonisel on roheliste nooltega näidatud nukleasid lõikesaidid ja oranži värvusega lõpuni protsessitud rRNA. Roheliste noolte kohale on mustalt märgitud rRNA protsessimist *in vivo* läbi viivad nukleasid ning siniselt nukleasid, mille korral on *in vitro* näidatud, et oleksid vastavat lõikamist võimalised läbi viima. Küsimärgiga on näidatud seni teadmata nukleasid. Jooniste ülesehitus on alamjoonistel ühtiv. (A) 16S rRNA

transkriptsioonijärgne protsessimine. **(B)** 23S rRNA transkriptsioonijärgne protsessimine. **(C)** 5S rRNA transkriptsioonijärgne protsessimine. Joonis kohandatud (Zahra *et al.*, 2011).

Vastavalt rRNA-le seondunud valkude kompositsioonile, on võimalik eristada 30S ja 50S ribosomaalsete subühikute assambleerimise intermediaarseid prekursoreid. 30S subühiku assambleerumisel eristatakse kahte prekursorit: p₁30S ja p₂30S (Joonis 7A). p₁30S intermediaat moodustub kui 16S rRNA prekursori, 17S rRNA-ga, on seondunud väikese subühiku kuus primaarselt (S1, S4, S8, S15, S17, S20), kaks sekundaarselt (S13, S16) ja kaks tertsiaarselt (S5, S21) seonduvat r-valku (Lindahl, 1973, Lindahl, 1975). p₁30S sedimenteerub 21S partiklina (Joonis 7A) (Lindahl, 1973; Lindahl, 1975). Ülejäänud 11 väikese subühiku r-valgu, mille hulka kuuluvad üks primaarselt (S7), viis sekundaarselt (S6, S9, S12, S18, S19) ja viis tertsiaarselt (S2, S3, S10, S11, S14) seonduvat valku, lisandumisel kompleksile moodustub 30S subühiku teine intermediaat p₂30S (Joonis 7A) (Lindahl, 1973). p₂30S sedimenteerub 30S subühikuna ja sisaldab kõiki väikese subühiku valke ning RNase III poolt lõigatud 16S rRNA prekursorit (Hayes ja Hayes, 1971; Lindahl, 1973; Lindahl, 1975). Seejärel viiakse lõpuni 16S rRNA nukleolüütiline protsessimine.



Joonis 7. *In vivo* ribosomaalsete subühikute assambleerimise intermediaadid. Joonisel on näidatud prekursor rRNA-dele (p16S, p5S, p23S rRNA-dele) lisanduvate valkude arvud ning valkude lisandumisel tekivad intermediaadid. Intermediaatide kohale on märgitud ka vastavad sedimentatsioonikoefitsiendid. **(A)** 30S subühiku assambleerimine. 30S subühiku assambleerimisel tekib kaks intermediaati: p₁30S, p₂30S. **(B)** 50S subühiku assambleerimine. 50S subühiku assambleerimisel tekib kolm intermediaati: p₁50S, p₂50S, p₃50S. Joonis kohandatud (Zahra *et al.*, 2011).

Võrrelduna küpse 16S rRNA-ga sisaldab 17S rRNA 5'-otsas 115 lisanukleotiidi ning 3'-otsas 33 lisanukleotiidi (Joonis 6A) (Young ja Steitz, 1976). 16S rRNA 5'-otsa küpsemise (ingl *maturation*) eest vastutavad kaks nukleaasi – RNase E ja RNase G. RNase E lõikamisega eemaldatakse 16S rRNA 5'-otsas olevast 115-st nukleotiidist 49. Ülejäänud 66 lisanukleotiidi eemaldatakse RNase G poolt (Joonis 6A) (Li *et al.*, 1999). On näidatud, et 16S rRNA 5'-otsa küpsemine saab toimuda ka RNase E puudumisel, kuid sellisel juhul on 16S rRNA 5'-otsa küpsemise protsess aeglasem (Li *et al.*, 1999). 5'-otsa küpsemine toimub ajaliselt enne 3'-otsa küpsemist (Li *et al.*, 1999; Al Refaii ja Alix, 2009). Nukleaas, mis viib läbi *in vivo* 16S rRNA 3'-otsa lõplikku lõikamist on teadmata, kuid *in vitro* on näidatud, et neli nukleaasi (RNase R,

RNase II, PNPase RNase PH), mis on võimelised vastavat lõikamist läbi viima (Joonis 6A) (Smith *et al.*, 2018). On teada, õige pikkusega 16S rRNA saab moodustuda ka primaarse RNase III lõikamise puudumisel, kuid õige pikkusega 23S rRNA mitte (King ja Schlessinger, 1983).

50S subühiku assambleerimisel eristatakse kolme intermediaarset prekursorit, millest esimene, p₁50S, moodustub kui 23S ja 5S rRNA prekursoriga on seondunud suure subühiku esimesed 16 r-valku – L1, L4, L5, L9, L10, L13, L17, L18, L20-L22, L24-L27, L29, L30 (Hayes ja Hayes, 1971; Lindahl, 1973; Lindahl, 1975). p₁50S sedimenteerub 32S partiklina (Joonis 7B). Järgmise kaheksa (L3, L7, L11, L14, L15, L19, L23, L33) suure subühiku r-valgu seandumisel moodustub 50S subühiku teine intermediaat p₂50S, mis sedimenteerub kui 43S (Joonis 7B) (Hayes ja Hayes, 1971; Lindahl, 1973; Lindahl, 1975). p₃50S, mis sedimenteerub 50S subühikuna, sisaldab lisaks veel kuute r-valku (L2, L6, L16, L28, L31, L32) (Nierhaus, 1991; Nierhaus *et al.*, 1973). Sarnaselt 30S subühiku intermediaadiga p₂30S, sisaldab p₃50S kõiki suure subühiku koostisesse kuuluvaid r-valke (Joonis 7B), kaasa arvatud valke L34, L35 ja L36, mida intermediaatide koosseisust leida pole õnnestunud, ja RNase III poolt lõigatud 23S ja 5S rRNA prekursoreid (Lindahl, 1973).

25S rRNA sisaldab 5'-otsas seitset või kolme lisanukleotiidi ning 3'-otsas üheksat lisanukleotiidi võrrelduna küpse 23S rRNA-ga (Joonis 6B) (King *et al.*, 1986; Sirdeskmukh ja Schlessinger, 1985). 23S rRNA 5'-otsa lõpliku küpsemise eest vastutav ensüüm on teadmata, kuid 3'-otsa lõikamise viib läbi RNase T (Li *et al.*, 1999). 5S rRNA prekursor (9S rRNA) sisaldab 5'-otsas on 84 lisanukleotiidi ja 3'-otsas 42 lisanukleotiidi võrrelduna küpse 5S rRNA-ga (Joonis 6C) (Ghora ja Apirion, 1978, Ghora ja Apirion, 1979; Roy *et al.*, 1983). RNase E on võimeline lõikama nii 9S rRNA 5'- kui ka 3'-otsa, jättes kummagisse otsa kolm lisanukleotiidi (Misra ja Apirion, 1979). Sarnaselt 23S rRNA-ga, on 5S rRNA 5'-otsa viimase lõikamise eest vastutav nukleas teadmata ja 3'-otsa küpsemise eest vastutab RNase T (Li ja Deutscher, 1995). Bakteritüved, milles RNase T puudub, ei suuda produtseerida küpset 5S rRNA-d (Li ja Deutscher, 1995).

1.5.2. rRNA modifikatsioonid

Samaaegselt rRNA astmelise nukleolüütilise protsessimise ja voltumisega ning r-valkude seandumisega, leiab aset nukleotiidide post-transkriptsiooniline modifitseerimine, mis arvatakse olevat olulise tähtsusega ribosoomide struktuuri ja funktsiooni peenhäälestamisel (Apirion *et al.*, 1993; Sergejev *et al.*, 2012; Siibak ja Remme, 2010; Srivastava *et al.*, 1990). Bakteri rRNA-s on kolm peamist modifikatsioonitüüpi: lämmastikaluse metülatsioonid, riboosi

2'-hüdrosüülrühma metülatsioonid ja pseudouridiinide ehk 5-ribosüüluratsiilide (Ψ) sünteesid uridiinidest (Decatur ja Fournier, 2002). Lisaks on 23S rRNA-st leitud modifikatsioonid 5-hüdrosüütidiin (ho^5C), mille puhul on tegemist tsütosiini stabiilse oksüdatsiooniproduktiga ja dihydrouridiin (D), mis tekib uratsiili redutseerumisel (Zahn *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Ribosomaalse RNA nukleotiidide post-transkriptsioonilised modifikatsioonid sünteesitakse ribosoomi assambleerumise erinevatel etappidel. Vastavalt sellele, millises ribosoomi assambleerumise etapis vastav modifikatsioon sünteesiti, saab modifikatsioonid tinglikult jagada varasteks, keskmisteks ja hilisteks (Siibak ja Remme, 2010). Varajaste modifikatsioonide puhul suudab modifikatsioonien süüm ära tunda vaba RNA ja hiliste puhul peaaegu täielikult assambleeritud RNA-valk kompleksi. Seega ühel juhul tuntakse ensüümi poolt ära RNA primaarjärjestus, teisel juhul on vajalik ruumiline ehk 3D- struktuur (Siibak ja Remme, 2010).

Funktsionaalse *E. coli* 30S subühiku koosseisus olev 16S rRNA sisaldab endas kümme metüleeritud nukleotiidi ja ühte pseudouridiini. Funktsionaalse 50S rRNA koosseisus olev 23S rRNA sisaldab endas 14 metüleeritud nukleotiidi, üheksa pseudouridiini, ühe metüleeritud pseudouridiini ja lisaks veel ühe 5-hüdrosüütidiini ning dihydrouridiini. 5S rRNA-st ei ole modifikatsioone leitud (Ofengand ja Del Campo, 2004; Zahn *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Seega sisaldab kogu *E. coli* ribosomaalne RNA kokku 36 modifitseeritud nukleotiidi.

16S rRNA nukleotiidide Ψ 516 ja m^4Cm 1402 süntees algab ribosoomi assambleerimise varastel etappidel ja jätkub vastavalt keskmiste kuni hiliste etappideni. Keskmistel etappidel sünteesitakse veel nukleotiidi m^7G 527. Väikese subühiku assambleerimise hilises etapis sünteesitakse seitse modifikatsiooni m^2G 966, m^2G 1207, m^5C 1407, m^3U 1498, m^2G 1516, m^6_2A 1518, m^6_2A 1519 (Siibak ja Remme, 2010). Seega suure osa modifikatsioonide tekkimiseks on vajalik, et moodustunud oleks 16S rRNA korrektne struktuur.

E. coli ribosoomi suure subühiku assambleerumisel sünteesitavast 25-st modifikatsioonist sünteesitakse biogeneesi varastel etappidel 16 modifikatsiooni - m^1G 745, Ψ 746, m^5U 747, Ψ 955, m^6A 1618, m^2G 1835, m^5C 1962, m^6A 2030, m^7G 2069, m^2G 2445, Ψ 2457, m^2A 2503, Ψ 2504, Ψ 2580, Ψ 2604 ja Ψ 2605 (Siibak ja Remme, 2010). Nukleotiidid m^5U 1939, Gm2251 ja Cm2498 sünteesitakse ribosoomi suure subühiku assambleerimise keskmistel etappidel. 50S subühiku assambleerimise hilistes etappides toimub 23S rRNA heeliks 69 uridiinide (U1911, U1915 ja U1917) isomerisatsioon pseudouridiinideks ning ribosoomi suurele subühikule eelviimasena lisatava modifikatsiooni Um2552 süntees (Siibak ja Remme, 2010). 70S partiklis

lisatakse subühikule viimase modifikatsioonina metüülgrupp Ψ 1915 kolmandasse positsiooni (Ero *et al.*, 2008). Modifikatsioonide D2449 ja ho⁵C2501 sünteesi kohta andmed puuduvad.

1.6. Translatsioon

Translatsioon on tsükliline protsess, mille iga tsükel on jagatav nelja erinevasse faasi: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosoomi taaskasutus (ingl *recycling*) (Agirrezabala ja Frank, 2009).

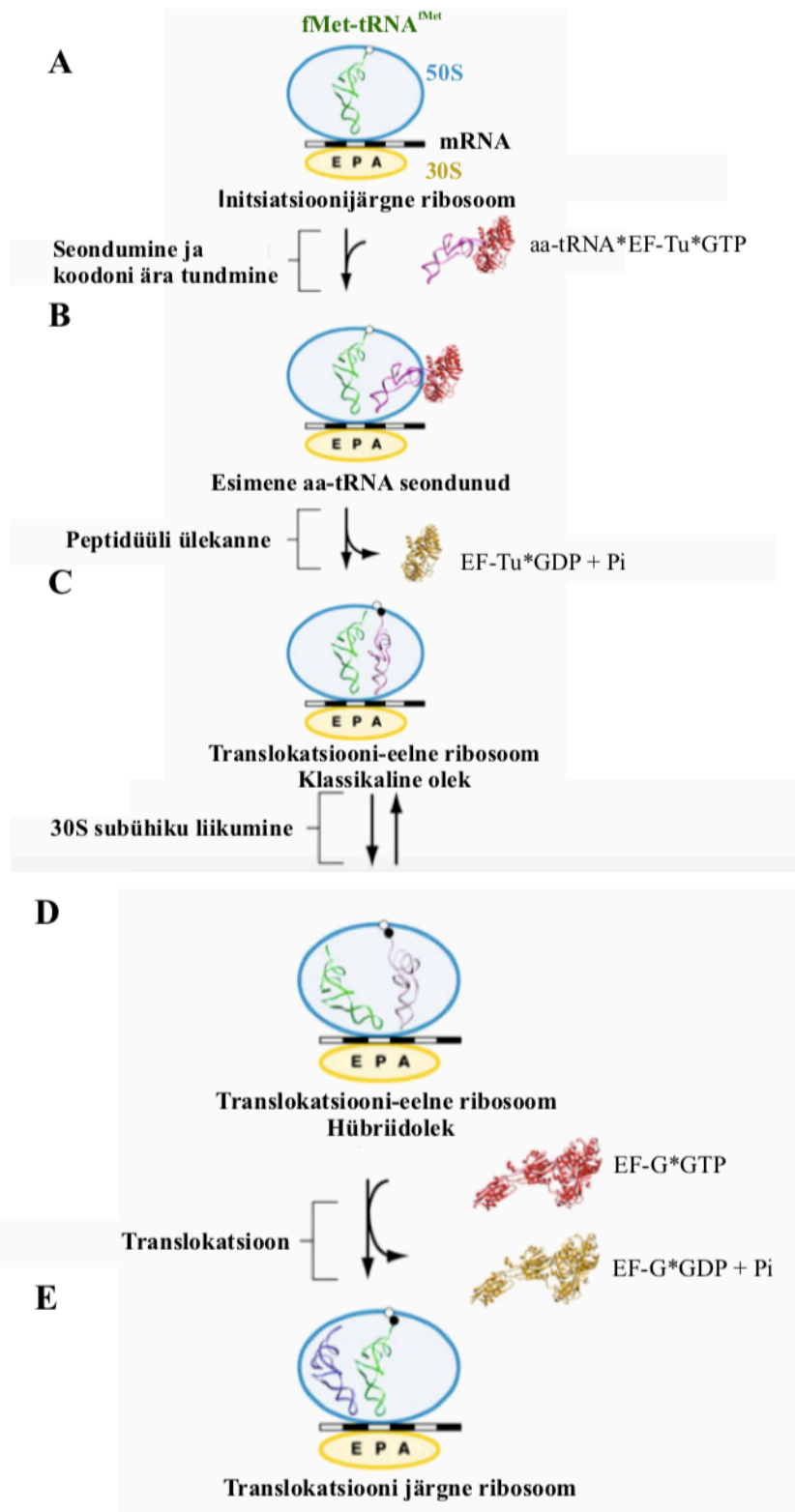
Translatsiooni initsiatsiooni käigus tuuakse kokku ribosomaalsed subühikud, mRNA ja initsiaator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}). Protsess on vahendatud initsiatsioonifaktorite IF1, IF2 ja IF3 poolt (Brock *et al.*, 1998; Hartz *et al.*, 1989; Hartz *et al.*, 1990). Initsiatsioonifaktor 1 (IF1), seondudes ribosoomi väikese subühiku A-saiti, takistab aminoatsüül-tRNA enneaegset seondumist subühiku A-saiti. Initsiatsioonifaktor 2 (IF2) seondub eelistatult initsiaator-tRNA-ga ja aitab kaasa selle seandumisele ribosoomi P-saiti (Brock *et al.*, 1998). Samaaegselt, sarnaselt IF1-ga, takistab IF2 elongaator aminoatsüül-tRNA osalemist initsiatsiooniprotsessis (Brock *et al.*, 1998). IF2 aktiivsus on moduleeritud IF1 poolt - IF2 affiinsus ribosoomi suhtes suureneb kui IF1 on ribosoomiga seondunud ning väheneb IF1 puudumisel (Gualerzi ja Pon, 1990). Initsiatsioonifaktor 3 (IF3) omab translatsiooni initsiatsioonis kahte funktsiooni: IF3 tugev seandumine 16S rRNA-le hoiab ära 50S subühiku seandumise 30S subühikule ja enneaegse 70S ribosoomi tekke, teiseks aitab IF3 kaasa initsiaator-tRNA selektsioonile, destabiliseerides teiste tRNA-de seondumist ribosoomi P-saiti (Hartz *et al.*, 1989; Hartz *et al.*, 1990).

Prokarüootse translatsiooni initsiatsioonil seondub 30S pre-initsiatsioonikompleks, mis koosneb 30S subühikust, kolmest initsiatsioonifaktorist ja mRNA-st, mRNA-l paikneva Shine-Dalgarno järjestusega (Laursen *et al.*, 2005). Viimane interakteerub anti-Shine-Dalgarno järjestusega 16S rRNA 3'-otsas, mille käigus paigutub translatsiooni initsiaatorikoodon AUG ribosoomi väikese subühiku P-saiti (Yusupova *et al.*, 2001). Sellele järgnevalt eralduvad initsiatsioonifaktorid IF1 ja IF3, samal ajal kui IF2 stimuleerib 50S subühiku seondumist kompleksile (Laursen *et al.*, 2005). 50S subühiku seandumisel hüdrolüüsitakse IF2-ga seotud GTP, mis põhjustab IF2 konformatsiooni muutuse ja IF2 vabanemise kompleksilt. Protsessi käigus paigutatakse initsiaator-tRNA P-saiti (Laursen *et al.*, 2005).

Kui 70S initsiatsioonikompleks, mis koosneb 30S-st, 50S-st, mRNA-st ja fMet-tRNA^{fMet}-st P-saidis, on moodustunud, algab esimene elongatsioonitsükel (Joonis 8A). Peamine mudel translatsiooni elongatsioonitsüklist koosneb kolmest sammust. Esmalt seotakse aminoatsüleeritud tRNA kompleksis EF-Tu ja GTP-ga ribosoomi A-saiti (Joonis 8B)

(Agirrezabala ja Frank, 2009). Korrektse koodon-antikoodon paardumise järel hüdrolyüsib EF-Tu GTP, põhjustades sellega iseenda dissotsieerumise ribosoomilt (Ramakrishnan, 2002). Sellele järgnevalt liigub EF-Tu küljest vabanenud tRNA 3'-aktseptorõlg ribosoomi suure subühiku peptidüültransferaasessesse tsentrisse ning A-saiti seondunud aa-tRNA α -aminorühm reageerib P-saidis oleva karbonüülse süsinikuga, moodustub peptiidside (Schmeing *et al.*, 2009). Vabanenud peptiidahel kantakse üle A-saidis olevale tRNA-le (Joonis 8C) (Agirrezabala ja Frank, 2009). Peptiidside tekkimise järel paikneb A-saidis peptidüül-tRNA ja P-saidis deatsetüleeritud tRNA. Elongatsioonitsükli kolmandaks sammuks on translokatsioon, mille käigus vabastatakse A-sait järgmise aminoatsüül-tRNA seondumiseks (Agirrezabala ja Frank, 2009). Translokatsioon toimub kahes etapis. Esimeses etapis leiab aset tRNA-de aktseptorotsade liikumine suure subühiku suhtes vastavalt - A-saidist P-saiti ja P-saidist E-saiti. tRNA-de antikoodon-otsad jäävad esialgu vastavalt väikese subühiku A- ja P-saidiga seotuks. Liikumise tulemusena on tRNA-de antikoodon struktuurid väikeses subühikus A- ja P-saitides, kuid tRNA aktseptorotsad suures subühikus interakteeruvad vastavalt P- ja E-saitidega (Joonis 8D) (Agirrezabala ja Frank, 2009). tRNA-de sellist asetust ribosoomis nimetatakse hübriidolekuks. Sellele järgnevalt seondub ribosoomiga GTPaas EF-G ja katalüüsib tRNA-de lõpliku translokatsiooni ribosoomi P- ja E-saiti (Joonis 8E) (Agirrezabala ja Frank, 2009). Elongatsioonitsükli kolme etappi dekodeerimist, peptiidahela ülekannet ja translokatsiooni, korratakse seni kuni kogu mRNA järjestus on dekodeeritud ning väikese subühiku dekodeeriv tsenter tunneb ära terminatsiooni määrava stopp koodoni (Agirrezabala ja Frank, 2009). Terminatsiooni määravat stopp koodonit tunnevad prokarüootses organismis kaks terminatsioonifaktorit – RF1 (ingl *release factor*) ja RF2 (Kisselev ja Buckingham, 2000). Nii RF1 kui RF2 tunnevad ära koodoni UAA, lisaks tunneb RF1 ära terminatsioonikoodoni UAG ja RF2 koodoni UGA. RF1 või RF2 seondumine ribosoomile, mille A-saidis paikneb stopp koodon, viib peptiidahela hüdrolyüsi ja vabastamiseni P-saidis paikneva tRNA küljest (Ramakrishnan, 2002).

Peale peptiidahela vabastamist jääb ribosoomi P-saiti deatsetüleeritud tRNA ja ribosoomiga on endiselt seotud translatsiooniks kasutatud mRNA (Ramakrishnan, 2002). Ribosoomi subühikute dissotsieerimiseks ja uue translatsioonitsükli toimumiseks on vajalikud ribosoomi taaskasutusfaktor (RRF) (ingl *ribosome recycling factor*) ja EF-G. RRF-i seondumine ja sellele järgnev EF-G katalüüsitud GTP hüdrolyüs viib ribosoomi dissotsieerumiseni subühikuteks. Sellele järgnevalt eemaldatakse IF3 abil ribosoomi väikese subühiku P-saidist deatsetüleeritud tRNA (Karimi *et al.*, 1999).



Joonis 8. Translatsiooni elongatsiooni skeem. (A) Initsiatsioonijärgne ribosoom. 30S subühik on ära tundnud translatsiooni initsiatsiooni alguskoha, moodustunud 70S kompleks, mis koosneb 30S-st, 50S-st, mRNA-st ja fMet-tRNA^{Met}-st ribosoomi P-saidis. (B) Ribosoomi A-saiti seondub esimene aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA). Korrektne koodon-antikoodon paardumine vallandab GTP hüdrolüüsi, mis omakorda põhjustab EF-Tu vabanemise. (C) Translokatsiooneelne ribosoom. aa-tRNA sobivuse ja seondumise korral järgneb peptiidsideme ülekanne. (D) Hübriidolek. 30S subühiku liikumise tulemusena tekib tRNA-de A/P ja P/E hübriidolek, kus tRNA-de antikoodon struktuurid on väikeses subühikus A- ja P-saitides, kuid tRNA-de aktseptorotsad suures subühikus interakteeruvad vastavalt P- ja E-saitidega. (E) Translokatsiooni järgne ribosoom. GTPaas EF-G katalüüsib lõpliku translokatsiooni. Joonis kohandatud (Agirrezabala ja Frank, 2009).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

23S rRNA domeeni 0 asukoht ribosoomi sekundaar- ja tertsiaarstruktuuris lubab oletada, et viimane on ribosoomi assambleerimise käigus, struktuuride moodustumisel, olulise tähtsusega. Käesoleva töö eesmärgiks oli kontrollida püstitatud hüpoteesi, mille kohaselt mutatsioonide tegemine 23S rRNA domeenis 0 omab efekti ribosoomide biogeneesile.

2.2. Materjal

2.2.1. Escherichia coli tüved ja plasmiidid

Tabel 1. Kasutatud *Escherichia coli* tüved.

Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K , m _K ⁻) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabel 2. Kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Olulised geenid ja omadused	Allikas
p7XB-wt	λ P _L promootori kontrolli all Xba-BamHI fragment <i>rrnB</i> operonist, Amp ^R	Lewicki <i>et al.</i> , 1993
p7XB-t-wt	λ P _L promootori kontrolli all Xba-BamHI fragment <i>rrnB</i> operonist, lisatud streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment, Amp ^R	Leppik, 2007
ptB-wt	<i>tac</i> promootori kontrolli all <i>rrnB</i> operon, Amp ^R	Leppik, 2007
ptB-t-wt	<i>tac</i> promootori kontrolli all <i>rrnB</i> operon, lisatud streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment, Amp ^R	Leppik, 2007
pBAD-wt	arabinoosiga indutseeritava promootori kontrolli all <i>rrnB</i> operon, Amp ^R	Piir <i>et al.</i> , 2011

pBAD-t-wt	arabinoosiga indutseeritava promootori kontrolli all <i>rrnB</i> operon, lisatud streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment, Amp ^R	Piir <i>et al.</i> , 2011
-----------	---	---------------------------

2.2.2. Söötmed ja puhvid

Tabel 3. Rakukultuuride inkubeerimiseks kasutatud söötmed.

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	1,6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Sambrook, Fritsch ja Maniatis, 1989
Luria-Betani (LB) agarsööde	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar	Bertani, 1951

Plasmiidi selektsioonmarkerina lisati vedelsöötmele antibiootikumi ampitsilliin (Amp) lõppkontsentratsioonis 100 µg/ml. Tardsöötmele lisati plasmiidi selektsioonmarkerina ampitsilliin lõppkontsentratsioonis 200 µg/ml.

Tabel 4. Töös kasutatud puhvid.

Puhver	Koostis
dNTP (-C)	110 µM dATP; 100 µM dGTP; 100 µM dTTP; 6 µM dCTP
DP	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotetanool
FS	80% deioniseeritud formamiid, 10 mM EDTA, 0,25% broomfenool sinine
5x HB	225 mM K-HEPES, pH 7, 450 mM KCl
HPLC puhver A	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 2,5% metanool; pH 5,3
HPLC puhver B	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 20% metanool; pH 5,1
HPLC puhver C	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 35% atsetonitril; pH 4,9
1x LP	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10 mM Tris HCl pH 8; 6 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotetanool
1x LLP (12 mM Mg)	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10 mM Tris HCl pH 8; 12 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotetanool
10x PCR puhver	750 mM TrisHcl pH 8,8; 200 mM NH ₂ SO ₄ ; 0,1% TritonX 100; 5% Ficoll 400; 10 mM tartasiin
5x RT-HB	255 mM K-HEPES pH 7; 450 mM KCl

10x RT-RB	1,3 M Tris pH 8,5; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT
RT-STOP	75 mM Na-atsetaat; 70% etanool
1xTBE	90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA
TEN puhver	10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl

2.2.3. Oligonukleotiidid

Tabel 5. Töös kasutatud oligonukleotiidid.

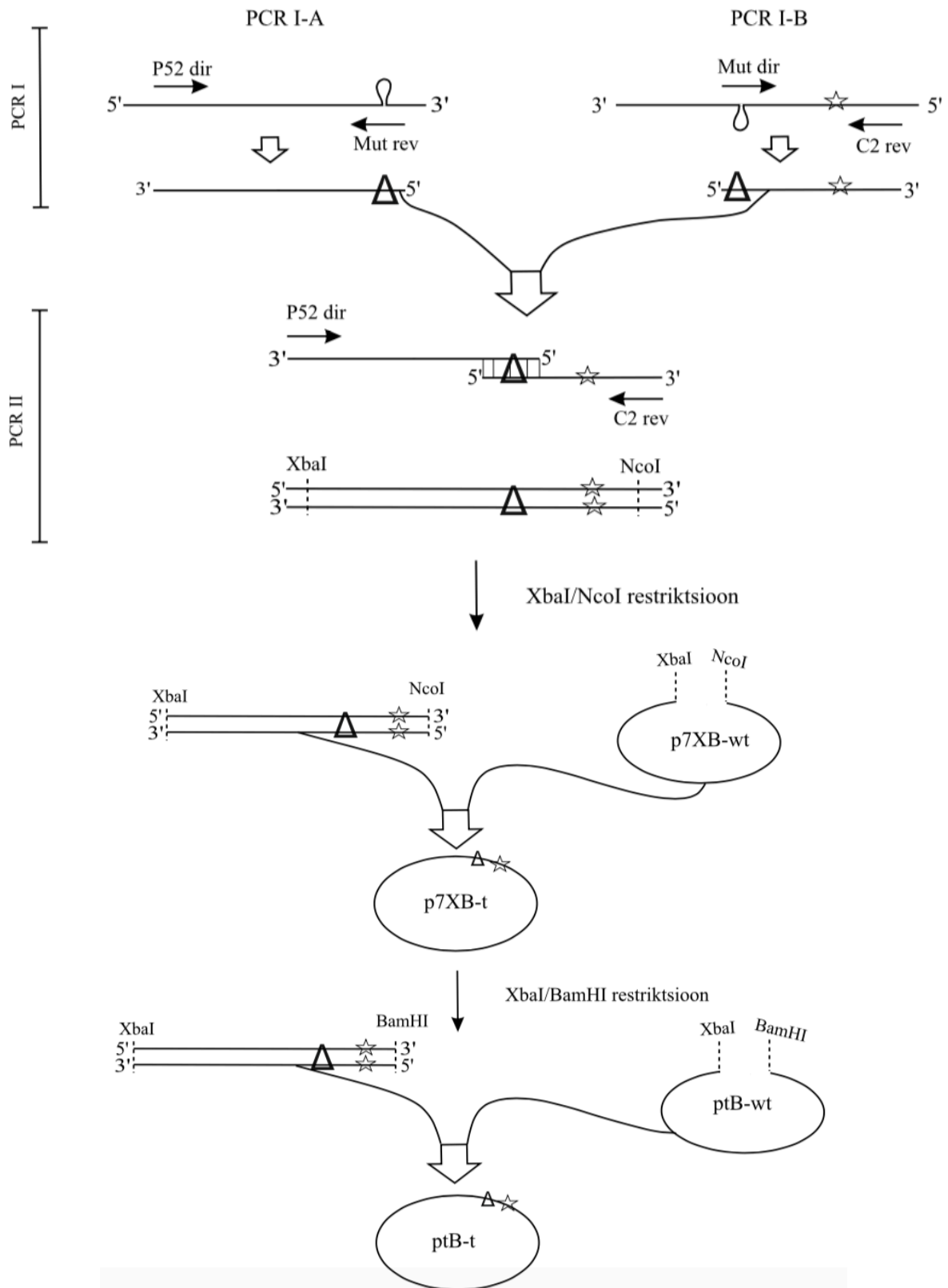
Praimeri nimi	5'-3' järjestus
H25a DIR	GGGAGCACGCTTAGGCGTGTGACTGCGTACGGGTCAGCGACTTATC
H25a REV	AACCTTGCTACAGAATATAAGTCGCTGACCCGTACGCAGTCACAC
H25aL DIR	AGCACGCTTAGGCGTGTGACTGCGTACCTTAATGGGTCAGCGAC
H25aL REV	TTGCTACAGAATATAAGTCGCTGACCCATTAAGGTACGCAGTCAC
H72 DIR	TCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATTGAACTCGTACCCGCGGCAAG
H72 REV	CACGGGGTCTTTCCGTCTTGCCGCGGGTACGAGTTCAATTTAC
H72 A2030T DIR	TTGAACTCGCTGTGTAGATGCAGTGTACCC
H72 A2030T REV	GGGTACACTGCATCTACACAGCGAGTTCAA
C2	GTCGGTTCGGTCCTCCAG
C6	CTTGGGCGGTATCAGCCTG
CD1	GAGATTCCCCCAGTAGCGGCG
P52	AGTGCTCACACAGATTGTCTG
Mini taq	CAAAGGTACGCAGTCACACGC

2.3. Metoodika

2.3.1 rRNA ekspressioonivektorite konstrueerimine

Mutatsioonide tekitamiseks 23S rRNA domeeni 0 heeliksitesse 25a ja 72 kasutati suunatud mutageneesi (Joonis 9; Joonis 11). Töö käigus konstrueeriti ekspressioonivektorid, mis sisaldasid *rrnB* operonis nelja erinevat 23S rRNA varianti: 1) $\Delta H25a$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 25a kodeeriv järjestus kogu pikkuses (Joonis 4A), 2) $\Delta H25aL$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 25a lingu osa kodeeriv järjestus (Joonis 4A), 3) $\Delta H72$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksist 72 kodeeriv järjestus kogu pikkuses (Joonis 4A), 4) A2030T, mille *rrnB* operonis on 23S rRNA heeliksi 72 positsioonis 2030 olev modifitseeritav nukleotiid A vahetatud T nukleotiidi vastu (Joonis 4A). Kõik konstrueeritud plasmiidid sisaldasid lisaks soovitud mutatsioonile streptavidiini siduvat *tag*-i.

Ekspressioonivektorite konstrueerimist alustati heeliksi 25a variantide kloneerimisega plasmidi *ptB-wt*. Kloneerimise skeem on toodud joonisel 9 (Joonis 9).



Joonis 9. *rrnB* 23S rRNA H25a variantide klonerimine ekspressioonivektorisse *ptB*. Joonisel on skemaatilisel kujutatud heeliks 25a mutatsioonide ja streptavidiini *tag*-i viimine plasmidi *ptB*-wt *rrnB* operoni. Mut rev ja Mut dir tähistavad „mutatsioonioligonukleotide“. Sümboliga Δ on tähistatud mutatsiooni asukoht heeliksis 25a ja tähekesega streptavidiini *tag*. PCR I ja PCR II tähistavad vastavalt kas esimest või teist PCR-i etappi. Esimeses PCR-i etapis sünteesitud DNA ahelaid kasutati teises PCR-i etapis matriitsina. PCR II produkti ja plasmidi p7XB-wt restrikteeriti ensüümidega XbaI ja NcoI ja plasmidis olev DNA fragment vahetati sünteesitud DNA fragmendi vastu ligatsiooni teel. Sellele järgnevalt restrikteeriti plasmidi p7XB-t ja plasmidi ptB-wt ensüümidega XbaI ja BamHI ning mutatsiooni ja streptavidiini *tag*-i sisaldav

DNA fragment kloneeriti ümber plasmidi ptB-wt. Tulemuseks oli ptB-t plasmid, milles *rrnB* operon sisaldab 23S rRNA heeliksi 25a variante ja streptavidiini *tag*-i.

DNA fragmentide amplifitseerimine PCR meetodil

Suunatud mutagenees toimus kahes osas, vastavalt joonisel 9 kujutatule. Suunatud mutageneesi PCR-i reaktsioonid viidi läbi *Eppendorf Mastercycles nexus* termotsükleris lõppmahus 50 µl kasutades 1U *Phusion* DNA polümeraasi (*Thermo Fisher*) tootja poolt ette nähtud puhvris tabelis 6 toodud tingimustel.

PCR I reaktsioonisegu sisaldas matriitsina 10 ng p7XB-t plasmidset DNA-d, 1 µl 10 mM dNTP (*Solis Biodyne*), 30 pmol praimerit dir, 30 pmol praimerit rev. PCR II reaktsioonisegu sisaldas 1 µl 10 mM dNTP, 10 pmol praimerit dir, 10 pmol praimerit rev ja DNA-na molaarselt võrdses kontsentratsioonid PCR I reaktsioonis saadud fragmente (PCR I-A, PCR I-B) (Joonis 9).

Tabel 6. PCR I ja PCR II tingimused

Etapp	PCR I, II	Temperatuur	Aeg (sek)	Tsükli arv
1	Algne denaturatsioon	+95°C	60	1
2	Denaturatsioon	+95°C	40	35
3	Praimerite seondumine	+57°C	40	
4	Elongatsioon	+72°C	60	
5	Lõplik elongatsioon	+72°C	300	1

Korrektse suurusega PCR produktide identifitseerimiseks ja puhastamiseks lahutati PCR-i produktid 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvris. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses ja pikkuste hindamiseks 1 kb DNA markerit (*Solis Biodyne*). Õige pikkusega DNA fragmendid puhastati agarosgeelist *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga kahe PCR reaktsiooni vahel ja enne töötlust restriksiooniensüümidega vastavalt tootja poolt ette nähtud juhendile. DNA kontsentratsioonid mõõdeti *Nanodrop (Thermo Scientific)* spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

Restriksioon

Soovitud mutatsioone ja streptavidiini *tag*'i sisaldavaid PCR-i fragmente ning plasmidi p7XB-wt restrikteeriti ensüümidega *XbaI* ja *NcoI (Thermo Fisher)* tootja poolt ette nähtud puhvris 1h, temperatuuril +37°C. Restriksiooniproduktid lahutati 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvris. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-

valguses ja pikkuste hindamiseks 100 bp DNA markerit (*Solis Biodyne*). DNA fragmendid puhastati geelist *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele. DNA kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

Ligatsioon

Restriksiooniensüümidega töödeldud DNA fragmendi ja plasmidi ligeerimiseks valmistati reaktsioonisegu (lõppmahuga 20 µl) 1x T4 ligaasi puhvris (*Thermo Scientific*), mis sisaldas 60 ng DNA fragmenti, 240 ng plasmidi keret, 1 µl 25 mM heksamiin-koobalt(III)kloriidi ja 5U T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Ligatsioon kestis 60 min toatemperatuuril.

Transformatsioon

Jääl sulatatud *E. coli* DH5α või TOP10 kompetentide rakususpensioonile lisati 10 µl ligatsioonisegu või 10 ng plasmidset DNA-d ning inkubeeriti 30 minutit jääl. Peale inkubatsiooni tehti rakkudele kuumašokk (ingl *heatshock*) ühe minuti vältel, temperatuuril +42°C. Sellele järgnevalt jahutati rakke 3-5 minutit jääl. Plasmidse DNA-ga transformeerimisel külvati rakususpensioon ampitsilliini (200 µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeeriti üleöö +37°C. Ligatsiooniseguga transformeerimise järel lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet ja inkubeeriti loksutil 2h, temperatuuril +37°C. Rakud koguti lauatsentrifuugis tsentrifuugimise teel (4000 rpm, 3 min). Supernatant eemaldati ja rakud resuspendeeriti 150 µl 2xYT söötmes. Rakususpensioon külvati ampitsilliini (200 µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeeriti üleöö +37°C.

Konstrueeritud plasmiidide kontrollimine ja puhastamine rakukultuurist

Koloonia-PCR

Kuna mutatsioonid domeen 0-i heeliksites 25a ja 72 tekitati ekspressioonivektorisse koos streptavidiini *tag*-iga, võimaldas *tag*-i olemasolu kontrollimine selekteerida plasmiidid, mis sisaldasid mutantset 23S rRNA varianti.

Streptavidiini *tag*-i olemasolu konstrueeritud plasmiidides kontrolliti koloonia-PCR meetodil. Bakterikolooniad suspendeeriti 10 µl MQ vees ja lüüsi 5 min temperatuuril +95°C. Rakususpensioonidele lisati 15 µl reaktsioonisegu (Tabel 7) ning seejärel viidi läbi PCR reaktsioon *Eppendorf Mastercycler nexus* termotsükleris vastavalt tabelis 8 toodud tingimustele.

Tabel 7. Koloonia-PCR reaktsioonisegu koostis.

Kogus ühe reaktsioonisegu kohta	
MQ vesi	7 µl
10x PCR puhver	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
Taq DNA polümeraas (5U/µl) (<i>TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool</i>)	0,5 µl
Praimer CD1 (dir)	10 pmol
Praimer C2 (rev)	10 pmol
KOKKU	15 µl

Tabel 8. Koloonia-PCR reaktsiooni tingimused.

Etapp	Temperatuur	Aeg (sek)	Tsükli arv	
1	Algne denaturatsioon	+95°C	60	1
2	Denaturatsioon	+95°C	40	24
3	Praimerite seondumine	+57°C	40	
4	Elongatsioon	+72°C	35	
5	Lõplik elongatsioon	+72°C	300	1

Streptavidiini *tag*-i olemasolu konstruktis hinnati koloonia-PCR-i reaktsioonil tekkinud DNA fragmentide pikkuse järgi (*tag*'i sisaldaval plasmiidilt amplifitseeritud fragment on kontrolliga võrreldes 68 bp võrra pikem) 2% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvis. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses. DNA fragmentide pikkuste hindamiseks kasutati 100 bp DNA markerit (*Solis Biodyne*).

Plasmidi puhastamine ja kontrollimine

Koloonia-PCR-i kontrollis streptavidiini *tag*-i osas positiivse tulemuse andnud kolooniad inokuleeriti 2 ml 2xYT söötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) ja kasvatati loksutis +37°C juures. Üleöökuultuurist puhastati plasmiidne DNA *FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-iga tootja poolt ette nähtud protokoll järgi. Plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks viidi läbi restriksioonanalüüs ensüümiga *AvaI* (*Thermo Fisher*) tootja poolt ette nähtud puhvis 1h jooksul, temperatuuril +37°C. DNA fragmendid

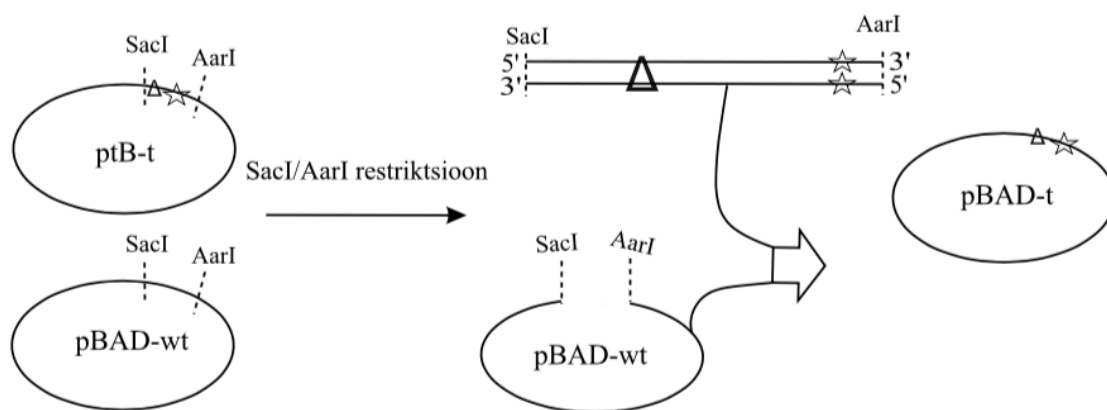
lahutati 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvril. Fragmentide pikkuste hindamiseks kasutati 1kb DNA markerit (*Solis Biodyne*). Korrektse restriksioonimustriga plasmiidide mutatsiooni sisaldav regioon kontrolliti sekveneerimise teel.

Ümberkloneerimine plasmidi ptB-wt

23S rRNA heeliks 25a variantide ja streptavidiini *tag*-i viimiseks plasmidi ptB-wt kasutati BamHI-XbaI (*Thermo Fisher*) DNA fragmendi klonereimist p7XB-t plasmiidist ptB-wt plasmidi. Peale restriksiooni lahutati DNA fragmendid 0,8% agarosgeelis, fragmendid puhastati geelist, ligeeriti ning plasmide kontrolliti nagu eelpool kirjeldatud.

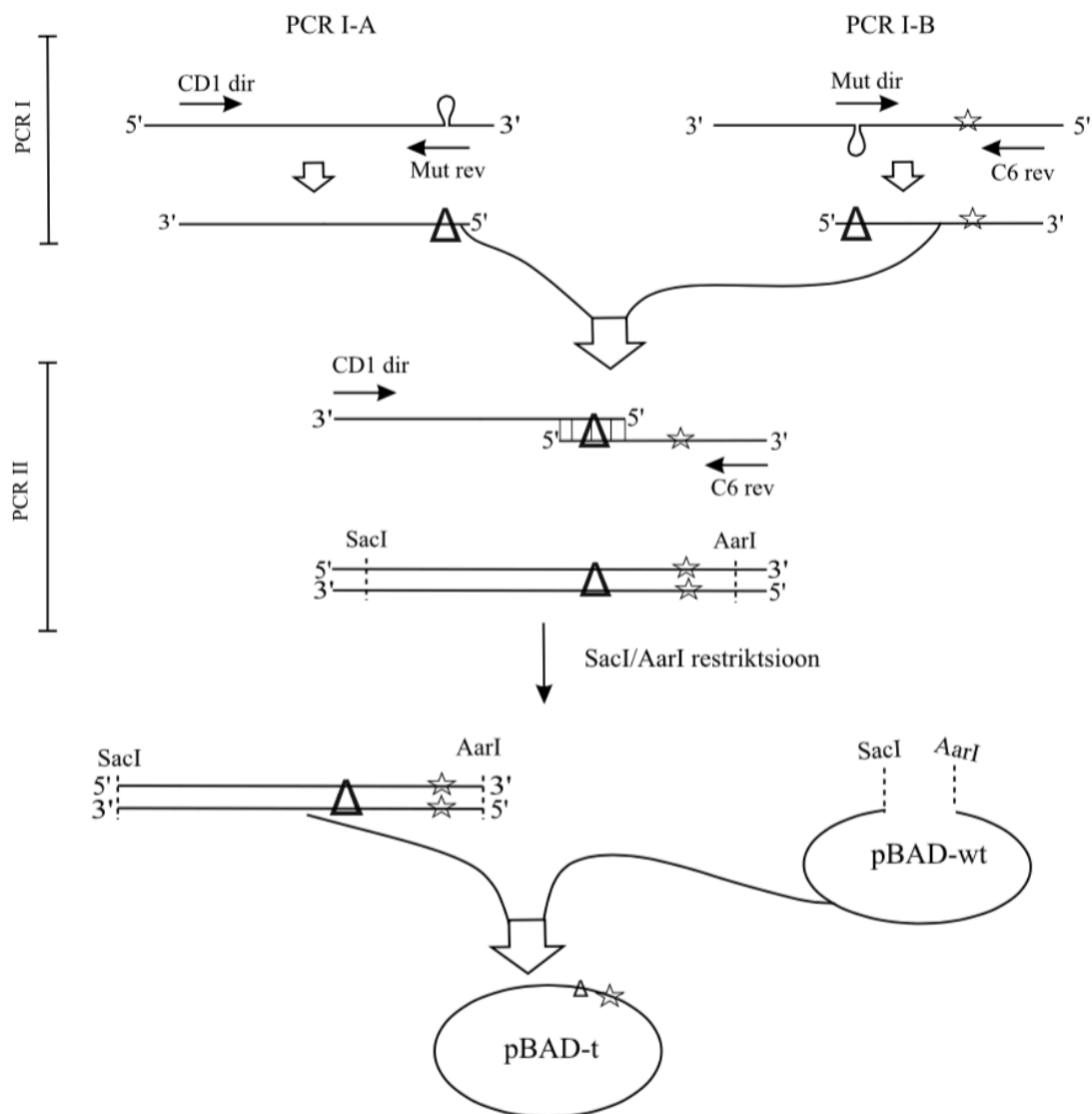
Ümberkloneerimine plasmidi pBAD-wt

23S rRNA heeliks 25a variantide ja streptavidiini *tag*-i viimiseks plasmidi pBAD-wt kasutati SacI-AarI (*Thermo Fisher*) fragmendi klonereimist plasmiidist ptB-t pBAD-wt plasmidi (Joonis 10). DNA fragmendid lahutati 0,8% agarosgeelis, fragmendid puhastati geelist, ligeeriti ja kontrolliti nagu eelpool kirjeldatud.



Joonis 10. Mutatsiooni 23S rRNA H25a piirkonnas sisaldava DNA fragmendi klonereimine plasmidi pBAD-wt. Joonisel on skemaatilisel kujutatud DNA fragmendi klonereimine plasmiidist ptB-t plasmidi pBAD-wt. Tähekesega on tähistatud streptavidiini *tag* ning sümboliga Δ mutatsioon. SacI ja AarI tähistavad restriksioonisaite, mille vahele DNA lõik ligeeriti. Tulemuseks on pBAD-t plasmid, milles *rrnB* operon sisaldab 23S rRNA heeliksi 25a variante ja streptavidiini *tag*-i.

Heeliksi 72 variandid klonereeriti ilma vahekloneerimiseta plasmidi pBAD-wt nagu näidatud joonisel 11 (Joonis 11).



Joonis 11. rrnB 23S rRNA H72 variantide ja streptavidiini tag-i klonereimine ekspressioonivektorisse pBAD. Joonisel on skemaatilisel kujutatud heeliks 72 mutatsioonide viimine plasmidi pBAD-wt rrnB operoni. Mut rev ja Mut dir tähistavad „mutatsioonioligonukleotiide“. Sümboliga Δ on tähistatud mutatsiooni asukoht heeliksis 72 ning tähekesega streptavidiini tag. PCR I ja PCR II tähistavad vastavalt kas esimest või teist PCR-i etappi. Esimeses PCR-i etapis sünteesitud DNA fragmente kasutati teises PCR-i etapis matriitsina. PCR II produkti ja plasmidi pBAD-wt restrikteeriti ensüümidega *SacI* ja *AarI* ja plasmidi algne fragment vahetati sünteesitud DNA fragmendi vastu. Tulemuseks on pBAD-t plasmid, milles rrnB operon sisaldab 23S rRNA heeliksi 72 variante ja streptavidiini tag-i.

Suunatud mutageneesi PCR-i reaktsioonid viidi läbi vastavalt eelnevalt kirjeldatule, kuid siiski mõningaste erinevustega: 1) PCR I reaktsioonisegu sisaldas matriitsina 10 ng ptB-t plasmidset DNA-d, 2) PCR II elongatsioonifaasi kestvus oli 70 sekundit.

Soovitud mutatsioone ja streptavidiini tag'i sisaldavaid PCR-i fragmente ning plasmidi pBAD-wt restrikteeriti ensüümiga *SacI* (*Thermo Fisher*) tootja poolt ette nähtud puhvril 1h, temperatuuril +37°C. Restriktsioonisegust puhastati puhvri vahetamiseks DNA *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele. Puhastatud DNA-d restrikteeriti ensüümiga *AarI* tootja poolt ette nähtud puhvril 1h, temperatuuril +37°C

(Joonis 11). DNA fragmendid lahutati 0,8% agarosgeelis, fragmendid puhastati geelist, ligeeriti ja kontrolliti nagu eelpool kirjeldatud.

2.3.2. Bakterirakkude generatsiooniaegade määramine

LB tassilt inokuleeriti üks koloonia kahes korduses 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) ning kasvatati loksutis üleöö temperatuuril +37°C. Üleöökultuurist tehti 20-kordne lahjendus 2 ml 2xYT vedelsöötmesse ja kasvatati temperatuuril +37°C ~ 1 h. Sellele järgnevalt lahjendati kultuuri kahes korduses 20-korda 2 ml 2xYT vedelsöötmesse. Ühele korduslahjendustest lisati induktor – 20 µl 20% arabinoosi. Rakukultuuri OD₆₀₀ mõõdeti 150 mikrolitrist rakukultuurist 96 kaevuga plaadilt mikroplaadilugejas *BMG Labtech POLARstar Omega*. Bakterirakkude generatsiooniaegade arvutamiseks kasvukõverate eksponentsiaalselt kasvavast osast kasutati valemit 1.

Valem 1. Valem generatsiooniaja arvutamiseks. k – kasvukiiruse „konstant“, x_1 – rakukultuuri algtihedus eksponentsiaalses kasvufaasis, x_2 – rakukultuuri lõpptihedus eksponentsiaalses kasvufaasis, t – x_1 ja x_2 vaheline aeg, t_{gen} – generatsiooniaeg.

$$k = \frac{\log(x_2) - \log(x_1)}{0,301 * t}$$
$$t_{\text{gen}} = \frac{1}{k}$$

2.3.3. Rakkude lüüsimine ja ribosoomi partiklite kogumine

2.3.3.1. *E. coli* rakkude kasvatamine ja lüüsimine

LB tassilt inokuleeriti üks koloonia 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) ning kasvatati loksutis üleöö, temperatuuril +37°C. Üleöökultuur lahjendati 100 ml 2xYT söötmesse (Amp 100 µl/ml) ning kasvatati kuni OD₆₀₀ ~ 0,3. Kultuurile lisati seejärel induktor (1 ml 20% arabinoosi) ja jätkati kasvatamist ~ 2 h. Rakud koguti tsentrifugimise teel *Sorvall RC5B Plus* tsentrifuugis *Sorvall GSA* rootoris 7 minuti jooksul 4000 rpm juures. Rakud jahutati jääl ja resuspendeeriti 1 ml 1x lüüsilahjenduspuhveris (LLP), millele lisati lüsotsüüm (*AppliChem*) ja DNaaSI (*Amresco*) (lõppkontsentratsioonid vastavalt 2mg/ml ja 40U/ml). Rakud lüüsi mehhaaniliselt 0,1 mm klaaskuulidega *Bertin Precellys24* homogeniseerijas vastavalt tootja poolsele protokollile (6000 rpm, 3x60 sek). Lüüsunud rakkude kestad ja klaaskuulid sadestati lauatsentrifuugis 13000 rpm 15 min.

Rakulüsaadi nukleiinhappesisaldus mõõdeti *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

2.3.3.2. Ribosomaalsete partiklite lahutamine sahharoosigradiendis ja ribosoomide kogumine

Ribosomaalsete partiklite lahutamiseks ja jaotumise analüüsimiseks sahharoosigradiendis kanti lineaarsele 15%-40% sahharoosigradiendile 40-70U (A_{260}) rakulüsaati ning ultratsentrifuugiti *Beckman Coulter L90K* ultratsentrifuugi rootoris SW28, 20000 rpm 19h ($\omega^2t = 3,0 \times 10^{11} \text{ rad s}^{-1}$), temperatuuril 4°C. Ribosoomi fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivoolu-spektrofotomeetrit *GE Healthcare Monitor UVis-920*, peristaltilist pumpa ja isekirjutajat *LKB Bromma 2210 recorder*. Sahharoosigradiendist koguti eraldi fraktsioonid, mis sisaldasid polüsoome, 70S partikleid, 50S ja 30S subühikuid,

2.3.3.3. Ribosomaalsete partiklite sadestamine

Ribosomaalsete partiklite sadestamiseks lisati sahharoosigradiendist kogutud ribosoomi partiklitele 2,5 mahtu 96% etanooli. Ribosoomi sadestati -20°C juures ~ 1h ja seejärel tsentrifuugides *Rotina 420* tsentrifuugis 4500 rpm 45 min, temperatuuril +4°C. Etanool eemaldati ribosoomi partiklite sademelt ja sadet kuivatati temperatuuril +37°C ~ 15 min. Ribosomaalsed partiklid resuspendeeriti 200 mikrolitris TEN puhvril. Nukleiinhappe koguse määramiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

rRNA nukleosiidse koostise analüüsimiseks HPLC meetodil sadestati sahharoosigradiendist kogutud 70S ja 50S ribosomaalsed partiklid ultratsentrifuugimisel *Beckman Coulter L90K* ultratsentrifuugi rootoris Ti41, 33000 rpm 24h ($\omega^2t = 1,0 \times 10^{12} \text{ rad s}^{-1}$), temperatuuril +4°C. Sadestatud 70S partiklid ja 50S subühikud resuspendeeriti 500 µl-s TEN puhvril.

2.3.4. rRNA puhastamine ribosomaalsetest partiklitest

Ribosomaalse RNA eraldamiseks räniga võeti ~ 3U (A_{260}) ribosoomi partikleid ja viidi lahuse maht TEN puhvriga 200 µl-ni. Lahusele lisati 800 µl kaotroopset soola sisaldavat PM (*Qiagen*) puhvrit ja lahust segati rRNA ekstraheerimiseks väristajal (2000 rpm) 20 minutit, toatemperatuuril. rRNA sidumiseks lisati lahusele 20 µl 50% ränisuspensiooni ja segati väristajal (2000 rpm) 10 minutit, toatemperatuuril. Ráni sadestati lauatsentrifuugis

tsentrifuugimise teel 13000 rpm 30 sekundit, temperatuuril +4°C, misjärel supernatant eemaldati. Sadet pesti kaks korda 1 milliliitri 70% etanooliga ja kuivatati seejärel 10 minutit temperatuuril +37°C. rRNA elueeriti räni küljest 40 µl MQ veega temperatuuril +37°C 3 minutit. Räni sadestati lauatsentrifuugis 13000 rpm 3 minutit ja rRNA vesilahus viidi uude reaktsioonituubi. RNA kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*) lainepikkusel 260 nm.

Ribosomaalse RNA puhastamiseks fenool-kloroform meetodil 10U-st (A_{260}) 50S subühikutest lisati proovile 15 µl 0,5% SDS-i ning segati toatemperatuuril vortexil 3 minutit, misjärel lisati proovile võrdne maht (~ 300 µl) fenooli (pH 5.5) ning segati toatemperatuuril vortexil 3 minutit. Valgud tsentrifuugiti lauatsentrifuugis fenoolfaasi (13000 rpm, 3 min). Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi. Fenoolfaasile lisati 100 µl MQ vett ja segati toatemperatuuril vortexil 3 minutit ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13000 rpm, 3 minutit. Vesifaasid segati kokku. Vesifaasi fenooltötlust korrati veel kaks korda. Fenooli eemaldamiseks lahusest, lisati rRNA vesilahusele võrdne maht kloroformi, segati toatemperatuuril vortexil 3 minutit ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 13000 rpm, 3 minutit. Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi ning rRNA sadestati 2,5 mahu 96% etanooli lisamisega, inkubeerides 30 minutit, temperatuuril -20°C ja tsentrifuugides lauatsentrifuugis 13000 rpm, 20 minutit, temperatuuril +4°C. Supernatant eemaldati ja rRNA sade kuivatati temperatuuril +37°C 5 minutit. Puhastatud rRNA elueeriti 50 µl MQ vees ja rRNA kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*) lainepikkusel 260 nm.

2.3.5 Praimeri kineerimine

Praimeri kineerimiseks võeti 60 pmol Mini taq praimerit, 5 µl värsket $\gamma^{32}\text{PdATP-d}$ (*Hartmann Analytic*), 20U T4 polünukleotiidi kinaasi (PNK) ja 5 µl 10x PNK puhvrit (*Thermo Scientific*). Reaktsioon viidi läbi lõppruumalas 50 µl 1,5h jooksul temperatuuril +37°C. Radioaktiivselt märgistatud oligonukleotiidi puhastamiseks kasutati *Qiageni Nucleotide removal Kit-i* vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele. Kineeritud praimer elueeriti 50 µl MQ veega.

Antud katse viis läbi Margus Leppik.

2.3.6. Minisekveneerimine kineeritud praimeriga

Ribosoomide segapopulatsioonist mutantsete, streptavidiini ligandi sisaldavate ribosoomide osakaalu määramiseks viidi läbi minisekveneerimine P32 märgitud Mini taq praimeriga.

Minisekveneerimise reaktsiooniks võeti 1-2 pmol 23S rRNA-d, 2 pmol kineeritud praimerit Mini taq ja 2 µl 1x hübridisatsiooni puhvrit (HB). Reaktsioonisegu maht viidi MQ veega 10 mikrolitri, misjärel proovi kuumutati, RNA denatureerimiseks, temperatuurini +90°C. Praimeri seondumiseks jahutati reaktsioonisegu aeglaselt temperatuurini +37°C, seejärel temperatuurini 0°C ja reaktsioonisegu jagati võrdselt kahe reaktsioonituubi vahel. Mõlemale reaktsioonisegule lisati 1 µl 10x pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhvrit (RT-RB), 1U AMV pöördtranskriptaasi (*Promega*), misjärel viidi reaktsioonisegude mahud MQ veega 9 mikrolitri. Ühele reaktsioonisegule kahest lisati 1 µl ddA nukleotiidide segu (125 mM dNTP (v.a. dATP) + 0,25 mM ddATP) (*Solis Biodyne*) ja teisele 1 µl ddG nukleotiidide segu (125 mM dNTP (v.a. dGTP) + 0,25 mM ddGTP) (*Solis Biodyne*). Pöördtranskriptsiooni reaktsioon viidi läbi 30 min temperatuuril +42°C. Reaktsiooni peatamiseks lisati segudele 120 µl RT-STOP lahust. RNA sadestati üleöö temperatuuril -20°C ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13000 rpm 15 min temperatuuril +4°C. Supernatant eemaldati ning nukleiinhappe sadet kuivatati 3 minutit, temperatuuril +37°C. Nukleiinhappe sade lahustati 10 µl formamiidi STOP-is (FS). Radioaktiivset märget sisaldavad DNA fragmendid lahutati ühest mikrolitrist proovist 12% UUREA-PAAG (1x TBE, 8M UUREA, 12% akrüülamiid-bis-akrüülamiid (19:1)) elektroforeesil pingel 2200V. Geelile kandmise eel denatureeriti proove temperatuuril +95°C kolm minutit. DNA fragmendid visualiseeriti *Phosphoimageriga* ja analüüsiti seejärel programmiga *Image Quant*.

Minisekveneerimise reaktsioonid viis läbi Margus Leppik. Tulemuste analüüsi viis läbi töö autor.

2.3.7. Mutantsete ribosoomide affiinsuspuhastamine

Ribosoomide segapopulatsioonist mutantsete, streptavidiini ligandi sisaldavate 50S subühikute puhastamiseks lahustati ribosoomide sade dissotsieerivas puhvris (DP). Mutantsete ribosoomide puhastamiseks võeti 1000 pmol 70S ribosoomi ja 50S subühikuid (1 AU₂₆₀ 70S = 24 pmol ja 1 AU₂₆₀ 50S 37 pmol). Proovidele lisati 100 µl 50%-list *Streptavidin Sepharose* maatriksit (*Amercham Biosciences*) DP puhvris, proovide maht viidi 1x DP-ga millilitri. Segu inkubeeriti *end-over-end* segajas üleöö, temperatuuril +4°C. Maatriksit pesti kolm korda 1x DP puhvriga, tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 2000 rpm üks minut ja eemaldati supernatant. *Streptavidin Sepharose* maatriksile seondunud 50S partiklid elueeriti 450 µl 5 mM biotiini lahusega 1x LLP puhvris. Elueeriti *end-over-end* segajas 16h, temperatuuril +4°C. *Streptavidin*

Sepharose eemaldati lahusest tsentrifuugides lauatsentrifuugis 13000 rpm kolm minutit ja ribosoomide lahus viidi uude reaktsioonituubi.

2.3.8. Oligonukleotiidi 23S MG pikendamine

Esimeses etapis segati kokku *annealing mix* lõppmahus 9 µl, mis sisaldas 2 pmol 23S rRNA praimerit MG, 2 µl 5x hübridisatsiooni puhvrit (HB) ja 2 pmol puhastatud rRNA-d. Reaktsioonisegu kuumutati rRNA denatureerimiseks temperatuurini +90°C, misjärel jahutati see aeglaselt temperatuurini +47°C, et võimaldada praimeril rRNA-ga seonduda. Reaktsioonisegule lisati 1,2 µl 10x pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhvrit (RT-RB), 0,2 µl α³²PdCTP-d (*Hartmann Analytic*), 0,8 µl dNTP(-C)-d (110 mM dATP, 110 mM dGTP, 110 mM dTTP, 6 mM dCTP) (nukleotiidid firmalt *Solis Biodyne*), 2U AMV pöördtranskriptaasi (*Promega*). Reaktsioonisegu ruumala viidi MQ veega 12 mikrolitri. Reaktsioonisegu inkubeeriti, ahelate märgistamiseks 32P märkega, 30 minutit +42°C, millele järgnevalt lisati DNA ahelate lõpuni sünteesimiseks 2 µl *chase mix*-i (1mM dNTP segu (*Solis Biodyne*)) ja jätkati inkubeerimist 15 minutit +42°C. Reaktsioon peatati 120 µl RT-STOP lahusega. RNA sadestati üleöö -20°C ning tsentrifugimise teel lauatsentrifuugis 13000 rpm, 15 minutit, +4°C. Supernatant eemaldati ja RNA sade kuivatati +37°C 10 minutit, misjärel sade lahustati 10 µl formamiidi STOP-is (FS). Radioaktiivset märke sisaldavad DNA fragmendid lahutati ühest mikrolitrist proovist 7% UUREA-PAAG (1x TBE, 8M UUREA, 7% akrüülamiid-bisakrüülamiid (19:1)) elektroforeesil, 2200V. Geelile kandmise eel denatureeriti proove temperatuuril +95°C 3 minutit. DNA fragmendid visualiseeriti *Phosphoimageriga* ja analüüsiti seejärel programmiga *Image Quant*.

2.3.9. Ribosomaalse RNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC meetodiga

Proovide nukleotiidse koostise analüüsiks ettevalmistamine ja HPLC tingimused

~ 2U (A₂₆₀) puhastatud rRNA hüdrolüüsamiseks nukleosiid-5'-monofosfaatideks lisati RNA-le 10 µl P1 nukleaasi (*Sigma*) (200U/ml). Reaktsioon toimus 0,6 mM lõppkontsentratsiooniga ZnSO₄ lahuses. Reaktsioon viidi läbi üleöö, temperatuuril +37°C. Fosfaatrühmade nukleotiidide küljest eemaldamiseks lisati 1U aluselist fosfataasi FastAP (*Thermo Scientific*). Reaktsioon viidi läbi 1x FastAP puhvris (*Thermo Scientific*) 3h jooksul, temperatuuril +37°C.

RNA nukleosiidse koostise määramiseks kasutati *Shimadzu Prominence HPLC* süsteemi, kolonni *Supercosil LC-18-S* (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) ja Gehrke ja Kuo poolt välja töötatud

meetodit (Gehrke ja Kuo, 1989). Nukleosiidide lahutamiseks kasutati HPLC puhvreid A, B ja C järgmistel tingimustel: (voolukiirusel 1,0 ml/min) 1) 100% HPLC puhver A 12 minutit, 2) üleminek 10%-le HPLC puhver B-le 8 minutiga, 3) üleminek 25% HPLC puhver B-le 4 minutiga, 4) üleminek 100% HPLC puhver B-le 9 minutiga, 5) 0%-100% HPLC puhver C-le 35 minutiga, hoides 100% HPLC puhver C-d 10 minutit. Nukleosiidide neeldumisprofiilid määrati lainepikkustel 260 nm ja 280 nm.

Erinevate rRNA nukleosiidide kompositsioon väljendus nukleosiidide piikide pindaladena. Piikidealuste pindalade normaliseerimiseks ja nukleosiidide hulga väljendamiseks metsiktüüpi 23S rRNA nukleosiidse kompositsiooni suhtes kasutati valemit 2.

Valem 2. S – mutantse 23S rRNA nukleosiidi pindala suhe metsiktüüpi 23S rRNA nukleosiidi pindalasse, $X_{1,n}$ – mutantse 23S rRNA standardnukleosiidi piigialune pindala, $X_{2,n}$ – metsiktüüpi 23S rRNA standardnukleosiidi piigialune pindala, $Y_{1,n}$ – mutantse 23S rRNA nukleosiidi piigialune pindala, $Y_{2,n}$ – metsiktüüpi 23S rRNA nukleosiidi piigialune pindala.

* $X_{1,n}$ ja $X_{2,n}$ jagatis teostatakse kõigi nelja standardnukleosiidi – A, T, G, C – korral ja saadud tulemustest võetakse seejärel keskmine.

$$S = \frac{Y_{1,n}}{[Average \left(\frac{X_{1,n}}{X_{2,n}} \right) * Y_{2,n}]}$$

2.4. TULEMUSED

2.4.1. rRNA ekspressioonivektorite konstrueerimine ja kontrollimine

Antud töö eesmärgiks oli kirjeldada *Escherichia coli* 23S ribosomaalse RNA domeenis 0 tekitatavate mutatsioonide mõju ribosoomide assambleerumisele ja funktsioneerimisele. Selleks konstrueeriti ekspressioonivektoritesse 23S rRNA variandid: 1) Δ H25a, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 25a (Joonis 4A) kodeeriv järjestus kogu pikkuses, 2) Δ H25aL, mille *rrnB* operonist puudub ainult 23S rRNA heeliksi 25a lünga osa kodeeriv järjestus, 3) Δ H72, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 72 kodeeriv järjestus kogu pikkuses ja 4) A2030T, mille *rrnB* operonis on 23S rRNA heeliksi 72 positsioonis 2030 tekitatud punktmutatsioon, millega vahetati domeeni 0 ainus modifitseeritav nukleotiid A (m^6 A2030) nukleotiidi T vastu. Kõik konstrueeritud plasmiidid sisaldasid lisaks soovitud mutatsioonile streptavidiini siduvat *tag*-i 23S rRNA heeliksis 25. Streptavidiini ligand võimaldas hinnata kloneerimise efektiivsust ja võimaldas ribosoomide segapopulatsioonist mutantsed ribosoomid välja puhastada.

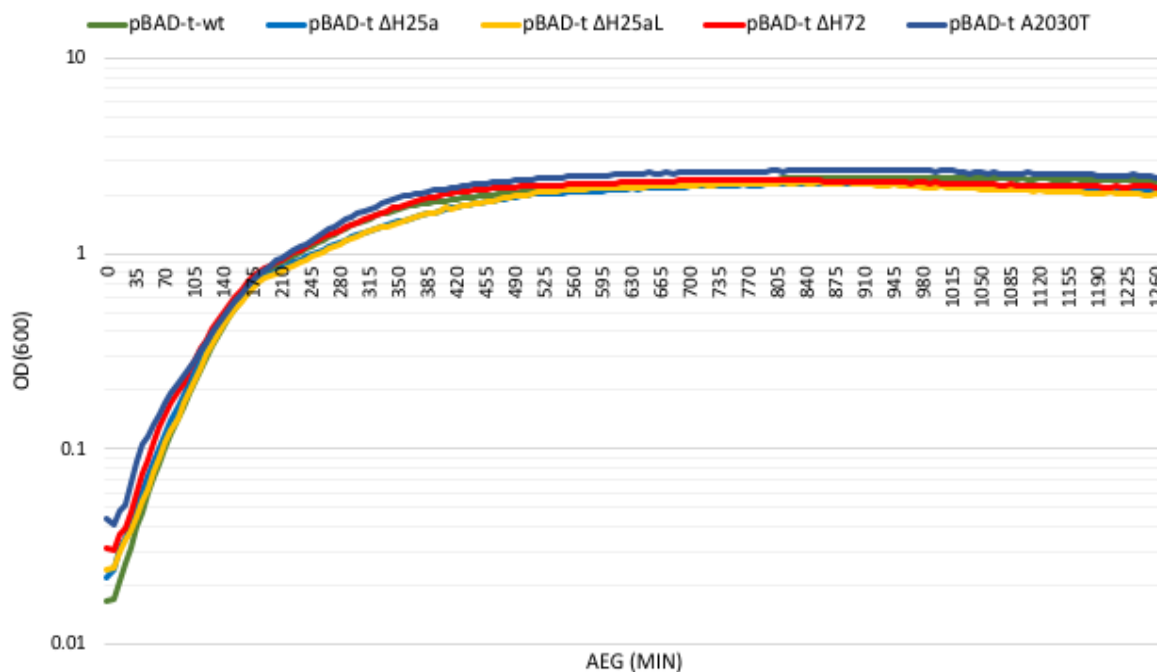
Ekspressioonivektorite konstrueerimist alustati 23S rRNA heeliksi 25a variantide (Δ H25a, Δ H25aL) kloneerimisega plasmidi *ptB*-wt restriksioonisaite *Xba*I-*Bam*HI vahele (Joonis 9). Streptavidiini ligandi ja sellega ka 23S rRNA variantide olemasolu konstrueeritud plasmiidides kontrolliti koloonia-PCR-iga vastavalt meetodites kirjeldatule. Plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks viidi läbi restriksioonanalüüs ensüümiga *Ava*I ja agarosgeelelektroforeesi meetodil. Korrekse restriksioonimustriga plasmiidide mutatsiooni sisaldav regioon kontrolliti sekveneerimise teel.

Kuna bakterirakkude transformeerimisel plasmiididega *ptB*-t Δ H25a ja *ptB*-t Δ H25aL kasvasid LB agarsöötmele korduvalt üles märgatavalt erineva suurusega bakterikolooniad, siis otsustati mutatsioone ja streptavidiini *tag*-i sisaldavad *Sac*I/*Aar*I fragmendid kloneerida ümber tugevamalt represseriva arabiinosi promooteri kontrolli alla, plasmidi *pBAD*-wt (Joonis 10). Plasmiidid puhastati ja kontrolliti nagu eelnevalt ja vastavalt meetodites kirjeldatule. 23S rRNA heeliksi 72 variandid (Δ H72, A2030T) kloneeriti koos streptavidiini *tag*-iga otse plasmidi *pBAD*-wt restriksioonisaite *Sac*I-*Aar*I vahele (Joonis 11). Plasmiidid puhastati ning kontrolliti vastavalt meetodites kirjeldatule.

2.4.2. Konstrueeritud 23S rRNA variantide mõju *E. coli* rakkude kasvule

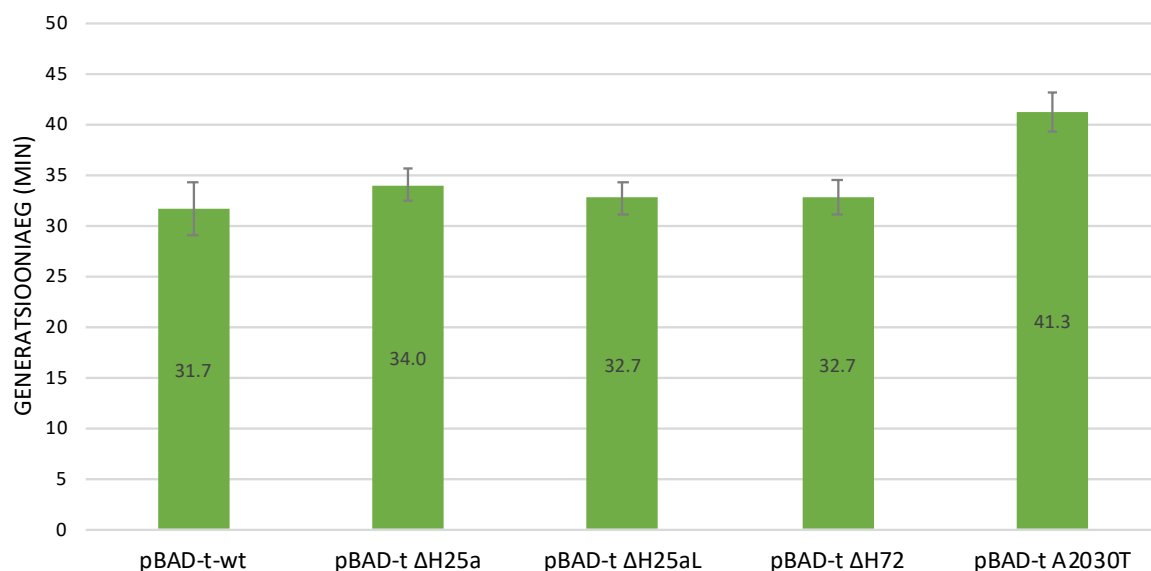
23S rRNA variantide ekspresseerimise mõju hindamiseks kasvufenotüübile ekspresseeriti konstrueeritud 23S rRNA variante *E. coli* TOP10 rakkudes. Kontrollina ekspresseeriti

metsiktüüpi 23S rRNA varianti, mis sisaldas streptavidiini siduva ligandi järjestust. Bakterirakud kasvatati ja bakterikultuuri tihedust mõõdeti vastavalt ptk. 2.3.2. kirjeldatule. Jooniselt 12 on näha, et 23S rRNA variantide $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$, A2030T ekspressioon ei oma kasvukõvera järgi omab bakterirakkude kasvule efekti.



Joonis 12. 23S rRNA variante *wt*, $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$, A2030T ekspresseerivate bakterirakkude kasvukõverad 2xYT söötmes, temperatuuril +37°C. Graafiku y-teljel on logaritmilises skaalas OD₆₀₀, graafiku x-teljel on aeg minutites. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti 21h jooksul. Katset on korratud kolm korda ja joonisel on esitatud üks näide.

Bakterirakkude kasvukõverate eksponentsiaalse faasi tõusu järgi arvutati generatsiooniajad, mis on toodud joonisel 13. Plasmiidilt pBAD-t *wt* metsiktüüpi 23S rRNA varianti ekspresseerivate bakterirakkude generatsiooniaeg on keskmiselt 31 minutit, mis on kooskõlas eelnevalt teada olevate *E. coli* generatsiooniaegadega. Metsiktüüpi 23S rRNA varianti ekspresseerivatest rakkudest statistiliselt erinev on ainult plasmiidilt pBAD-t A2030T mutantset 23S rRNA varianti ekspresseerivate rakkude generatsiooniaeg, mis on pikenenud umbes kümne minuti võrra. Teisi 23S rRNA variante ($\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$) ekspresseerivate bakterirakkude keskmised generatsiooniajad erinevad metsiktüüpi 23S rRNA varianti ekspresseerivate rakkude keskmisest generatsiooniajast 1 ($\Delta H25aL$, $\Delta H72$) kuni 2 ($\Delta H25a$) minuti võrra. Seega võib öelda, et 23S rRNA variantide $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$, A2030T ekspressiooni mõju bakterirakkude generatsiooniaegadele on väike või puudub.

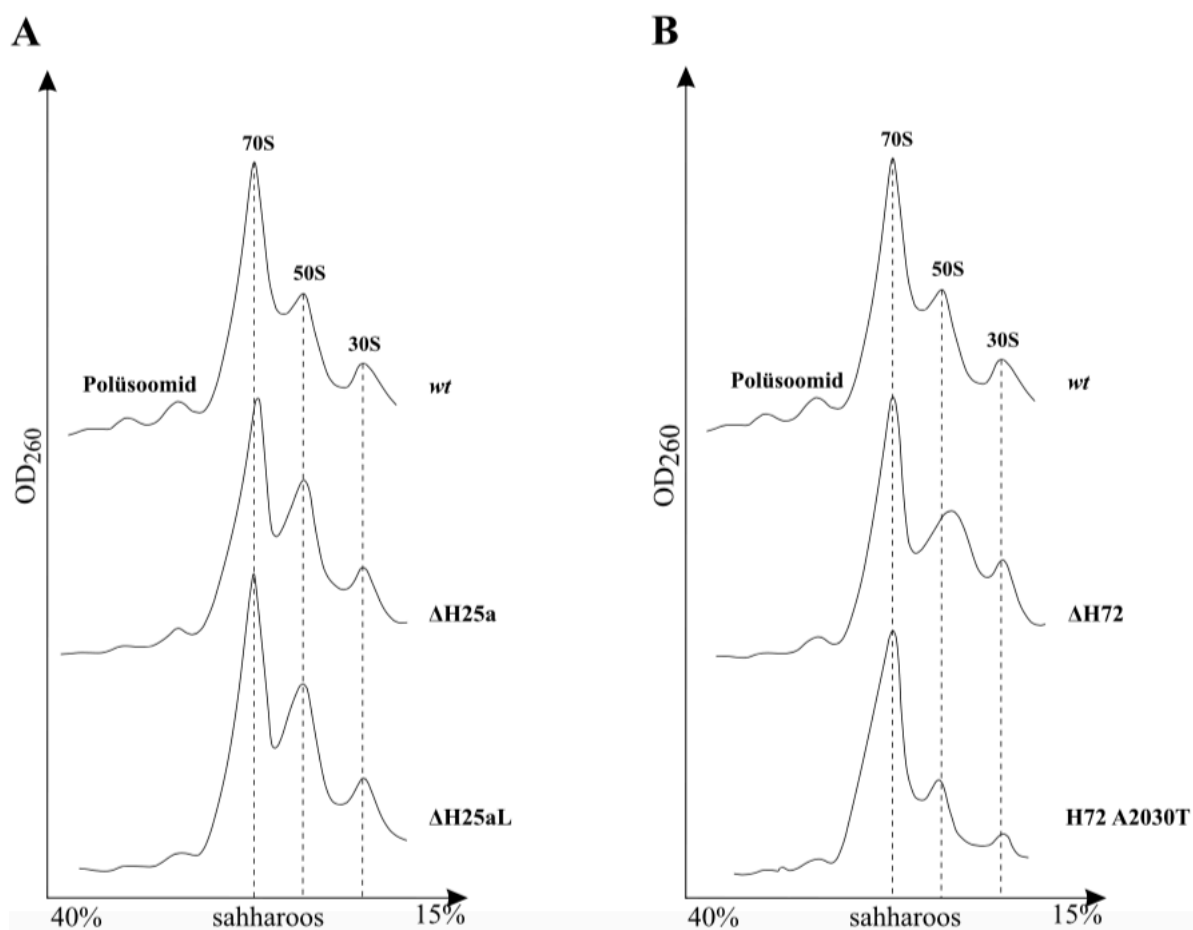


Joonis 13. 23S rRNA variante *wt*, Δ H25a, Δ H25aL, Δ H72 ja A2030T plasmiidilt pBAD-t ekspresseerivate bakterirakkude keskmised generatsiooniajad 2xYT söötmes, temperatuuril +37 °C. Generatsiooniajad on arvatud valemi 1 järgi kasutades kolme katse tulemusena saadud kasvukõveraid. Joonisel on veapiiridena näidatud standardviga (90% usalduspiirides) 3 katse põhjal.

2.4.3. Ribosoomide jaotus sahharoosgradiendis

Selgitamaks 23S ribosomaalse RNA domeeni 0 mutatsioonide mõju 70S ribosoomi moodustumisele *in vivo*, ekspresseeriti *E. coli* TOP10 rakkudes konstrueeritud 23S rRNA variante (Δ H25a, Δ H25aL, Δ H72, A2030T) ja kontrollina metsiktüüpi 23S rRNA varianti, mis sisaldab streptavidiini siduva ligandi järjestust. Bakterirakud kasvatati ja lüüsi vastavalt pkt 2.3.3.1. kirjeldatule. Ribosoomiprofiilide analüüsimiseks formeeriti 15%-40% sahharoosgradient, milles lahutati ultratsentrifuugimise teel rakulüsaadis sisalduvad ribosomaalsed partiklid vastavalt peatükis 2.3.3.2. kirjeldatule.

Jooniselt 14A on näha, et 23S rRNA variantide Δ H25a, Δ H25aL ekspressioon põhjustab vabade 50S subühikute piigi väikest suurenemist, mis võib viidata subühiku assotsiatsiooni defektidele. Jooniselt 14B ilmneb, et ribosoomiprofiilile kõige suuremat defekti omab 23S rRNA variandi Δ H72 ekspressioon. On näha, et 50S piik on võrreldes metsiktüübiga 50S piigiga märgatavalt ümardunud, mis viitab 50S partiklite heterogeensusele. Lisaks sellele on võrreldes metsiktüübiga märgata 50S piigi üldist suurenemist ja ka paremale nihkumist, mis omakorda vihjab üheselt 50S subühiku assambleerimise defektidele. 23S rRNA varianti A2030T ekspresseerivate rakkude ribosoomiprofiili üldpilt on metsiktüüpi plasmidi ekspresseerivate rakkude omale kõige sarnasem (Joonis 14B). Tuleb märkida, et polüsoomide fraktsiooni vähenemine on täheldatav kõikide mutantset 23S rRNA-d ekspresseerivate variantide puhul, mis viitab vähenenud valgusünteesi tasemele rakkudes.



Joonis 14. Ribosoomide 15%-40% sahharoosgradiendi A260 profiilid. Joonisel on märgitud polüsoomide, 70S partikli ja 50 ning 30S subühikute piigid. x-teljel on märgitud sahharoosigradiendi muutumine suunal 40%-15%, y-teljel on märgitud OD(260). Esimeses reas on nii tulbas A kui ka tulbas B näidatud kontrollina plasmiidilt pBAD-t metsiktüüpi rRNA-d ekspresseerivate bakterirakkude ribosoomiprofiil. **(A)** 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone heeliksis 25a - Δ H25a ja Δ H25aL. **(B)** 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone heeliksis 72 - Δ H72 ja A2030T.

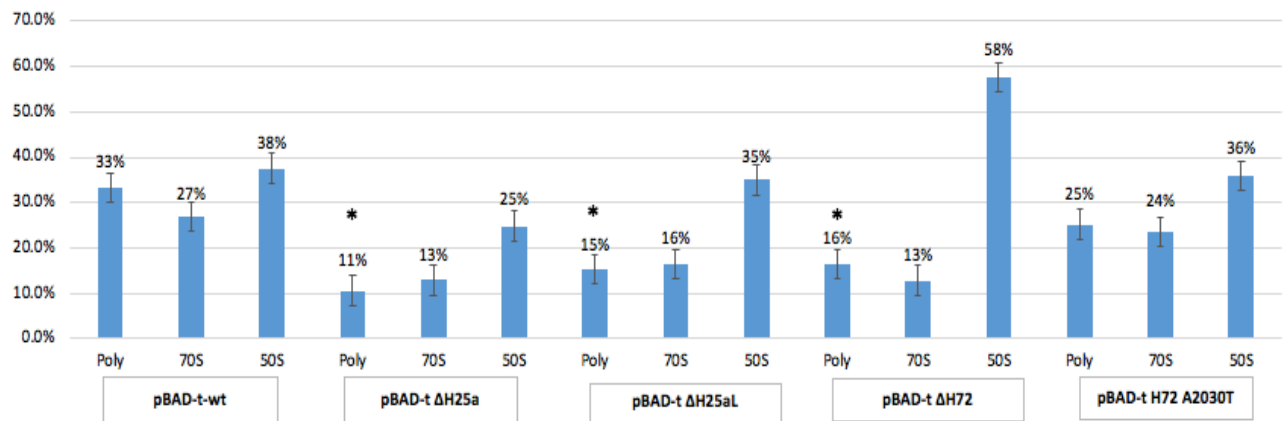
2.4.4. 23S rRNA variantide jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides

Selleks, et välja selgitada, kas 23S rRNA variandid *wt*, Δ H25a, Δ H25aL, Δ H72 ja A2030T lülituvad ka transleerivatesse 70S ja polüsoomide fraktsioonidesse, ekspresseeriti *E. coli* TOP10 rakkudes konstrueeritud mutantseid 23S rRNA variante ning kontrollina metsiktüüpi 23S rRNA varianti, mis sisaldab streptavidiini siduva ligandi järjestust. Bakterirakud kasvatati, lüüsi ja saadud rakulüsaat ultratsentrifuugiti ribosomaalsete partiklite lahutamiseks vastavalt peatükkides 2.3.3.1 ja 2.3.3.2. kirjeldatule. Sahharoosigradiendist koguti eraldi polüsoomide, 70S partiklite ja 50S subühikute fraktsioonid, millest puhastati rRNA räniga puhastamise meetodil vastavalt peatükis 2.3.4. kirjeldatule. Eraldatud rRNA-st streptavidiini *tag*-i sisaldavate 23S rRNA variantide osakaalu määramiseks viidi läbi streptavidiini *tag*-i algusesse seonduva radioaktiivselt märgitud oligonukleotiidi Mini tag minisekveneerimise reaktsioon radioaktiivselt märgitud praimeriga vastavalt pkt. 2.3.6. kirjeldatule. Streptavidiini *tag*-i sisaldavate 23S rRNA variantide ja *tag*-ita metsiktüüpi 23S rRNA-de erineva järjestuse tõttu

tekkisid minisekveneerimisel erineva pikkusega fragmendid (Lisa 2), mille radioaktiivse signaali kvantiseerimine võimaldas hinnata *tag*-i sisaldavate 23S rRNA variantide ja metsiktüüpi 23S rRNA-de osakaalu.

Tuleb märkida, et Δ H25a, Δ H25aL ja Δ H72 23S rRNA variante ekspresseerivate rakkude polüsoomide fraktsioonist eraldatud rRNA kogus jäi väga väikeseks, mis mõjutab ka radioaktiivse signaali tugevust ja tulemuse usaldusväärsust ning on seetõttu nii tekstis kui ka joonisel 15 tähistatud tärniga.

Jooniselt 15 on näha, et võrreldes plasmiidilt pBAD-t wt ekspresseeritava metsiktüüpi 23S rRNA-ga, mis lülitub enamvähem võrdselt kõikidesse ribosomaalsetesse fraktsioonidesse, on plasmiididelt pBAD-t Δ H25a ja pBAD-t Δ H25aL ekspresseeritavate rRNA-de jaotuses täheldatav langev trend suunal 50S-70S-polüsoomid (Joonis 15). Kõige rohkem on Δ H25a ja Δ H25aL 23S rRNA-d 50S fraktsioonis (keskmiselt vastavalt 25% ja 35%), sellele järgneb 70S fraktsioon ligikaudu poole võrra väiksema mutantse rRNA kogusega (keskmiselt vastavalt 13% ja 16%) ning kõige vähem Δ H25a ja Δ H25aL 23S rRNA-d on polüsoomide fraktsioonis (keskmiselt vastavalt 11%* ja 15%*) (Joonis 15). Seega jõuab translatsiooniliselt aktiivsetesse polüsoomidesse ja 70S partiklitesse vastavaid rRNA-sid väga vähesel hulgal. Δ H72 23S rRNA variandi ekspresseerimisel on selgelt näha mutantse 23S rRNA akumulereerumise, kus 50S fraktsioonis on plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA hulk väga suur - keskmiselt 58%, mis on ligikaudu 20% võrra suurem metsiktüüpi plasmiidilt ekspresseeritavast rRNA kogusest samas fraktsioonis (Joonis 15). Kõige vähem on Δ H72 23S rRNA-d on 70S fraktsioonis (keskmiselt 13%) (Joonis 15). Seega, sarnaselt plasmiididelt pBAD-t Δ H25a ja pBAD-t Δ H25aL ekspresseeritava 23S rRNA-ga, jõuab väga väheses koguses Δ H72 23S rRNA-d translatsiooniliselt aktiivsetesse polüsoomidesse ja 70S partiklitesse. Kõige sarnasem 23S rRNA jaotus metsiktüüpi plasmiidilt ekspresseeritava 23S rRNA jaotusele on plasmiidilt pBAD-t A2030T ekspresseeritava rRNA jaotus (Joonis 15). Sarnaselt metsiktüübiga on kõige rohkem A2030T 23S rRNA-d 50S fraktsioonis (keskmiselt 36%), sellele järgneb polüsoomide fraktsioon (keskmiselt 25%) ning kõige vähem A2030T 23S rRNA-d leidub 70S fraktsioonis (keskmiselt 24%) (Joonis 15). Seega, võrreldes teiste mutantsete 23S rRNA variantidega, lülitub 23S rRNA varianti A2030T rohkem ka translatsiooniliselt osalevatesse partiklitesse – polüsoomidesse ja 70S partiklitesse.



Joonis 15. Plasmiidelt pBAD-t wt, pBAD-t ΔH25a, pBAD-t ΔH25aL, pBAD-t ΔH72 ja pBAD-t A2030T ekspresseeritud 23S rRNA variantide jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides. Joonisel on välja toodud polüsoomide (Poly), 70S ja 50S ribosomaalsete fraktsioonide jaotuse suhted. Tärniga on näidatud ribosomaalsed fraktsioonid, millest eraldatava rRNA kogus jäi analüüsimise usaldusväärsuseks liiga väikeseks. Joonisel on veapiiridena näidatud standardviga (90% usalduspiirides) 3 katse põhjal.

2.4.5. Plasmiidilt pBAD-t ΔH72 ekspresseeritud 23S rRNA protsessituse ja nukleosiidse koostise analüüs

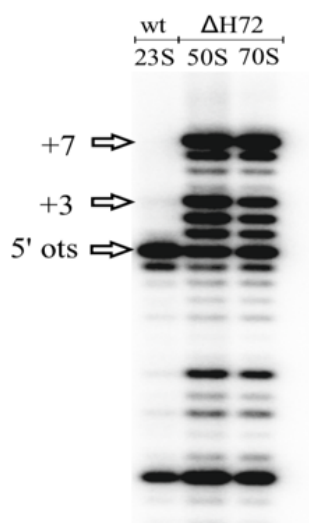
Kõige suurem efekt nii ribosoomiprofiilide kui ka mutantse 23S rRNA jaotuse osas ribosomaalsetes fraktsioonides ilmnes 23S rRNA variandi ΔH72 ekspresseerimisel. Selleks, et 23S rRNA varianti põgusalt analüüsida, viidi plasmiidilt pBAD-t ΔH72 ekspresseeritud ΔH72 23S rRNA-ga läbi 23S rRNA 5'-otsa analüüs praimerekstentsiooniga, et selgitada välja, kuidas rRNA on protsessitud, ja nukleosiidide analüüs HPLC meetodiga.

2.4.5.1. ΔH72 23S rRNA 5'-otsa protsessitus *in vivo*

Mutantse 23S rRNA 5'-otsa nukleolüütilise protsessituse välja selgitamiseks ekspresseeriti *E. coli* TOP10 rakkudes 23S rRNA varianti ΔH72. Bakterirakud kasvatati, lüüsiiti ja saadud rakulüsaat ultratsentrifuugiti vastavalt peatükkides 2.3.3.1 ja 2.3.3.2. kirjeldatule. Sahharoosigradiendist koguti eraldi 70S partiklite ja 50S subühikute fraktsioonid ning sadestati vastavalt ptk 2.3.3.3. kirjeldatule. Sadestatud ribosomaalsetest fraktsioonidest affinsuspuhastati mutantsed, streptavidiidi *tag*-i sisaldavad, ribosoomid vastavalt ptk. 2.3.7. kirjeldatule. Mutantsetest ribosoomidest eraldati rRNA fenool-kloroform meetodil vastavalt ptk. 2.3.4. kirjeldatule, misjärel viidi 5'-otsa nukleolüütilise protsessimise uurimiseks läbi 23S rRNA 5'-otsa lähedale seonduva oligonukleotiidi 23S MG pikendamise reaktsioon vastavalt ptk. 2.3.8. kirjeldatule. Kontrollina kasutati reaktsioonis metsiktüüpi 23S rRNA-d.

Jooniselt 16 selgub, et võrreldes metsiktüüpi 23S rRNA-ga, leidub nii 50S kui ka 70S ribosomaalsetest fraktsioonidest eraldatud ΔH72 23S rRNA-de hulgas nii on seitsme kui ka

kolme nukleotiidi võrra pikemaid rRNA eellaseid. See näitab, et 23S rRNA 5'-otsa esmase lõikamise eest vastutav RNase III on lõikuse läbi viinud, kuid 5'-otsa viimast lõikamist läbi viiv, seni *in vivo* tuvastamata ensüüm mitte (Joonis 6). Seega on nii 50S kui ka 70S fraktsioonidest eraldatud $\Delta H72$ 23S rRNA-de 5'-otsad lõpuni protsessimata. Võrreldes ka geelelektroforeesil tekkinud triipude (ingl *band*) intensiivsust, võib öelda, et 70S fraktsioonist eraldatud $\Delta H72$ 23S rRNA korral on rRNA eellaste hulk, võrreldes 50S fraktsioonist eraldatud 23 rRNA-ga, mõnevõrra väiksem ning protsessitud 5'-otsaga rRNA-de hulk on mõnevõrra suurenenud (Joonis 16).



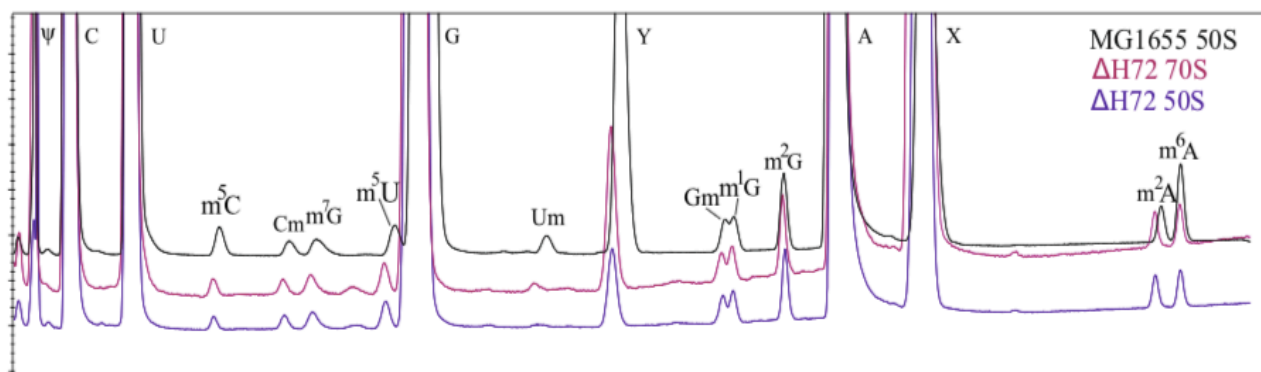
Joonis 16. 23S rRNA variandi $\Delta H72$ 5'-otsa protsessimise analüüs. Joonisel on toodud metsiktüüpi 23S rRNA ja 50S kui ka 70S ribosomaalsetest fraktsioonidest eraldatud mutantsed $\Delta H72$ 23S rRNA-d. Nooltega on näidatud lõpuni protsessitud 5'-otsa asukoht ning 3 (+3) ja 7 lisanukleotiidi (+7) asukohad lõpuni protsessitud 5'-otsast. Katset on tehtud üks kord.

2.4.5.2. Plasmiidilt pBAD-t $\Delta H72$ ekspresseeritud 23S rRNA nukleotiitse koostise analüüs

Affinsuspuhastatud mutantse 23S rRNA-ga, mille eraldamist kirjeldati peatükis 2.3.7, viidi läbi ka nukleotiitse koostise analüüs HPLC meetodil vastavalt ptk 2.3.9. kirjeldatule. Kontrollina kasutati *E. coli* tüve MG1655 50S ribosomaalse subühiku 23S rRNA-d

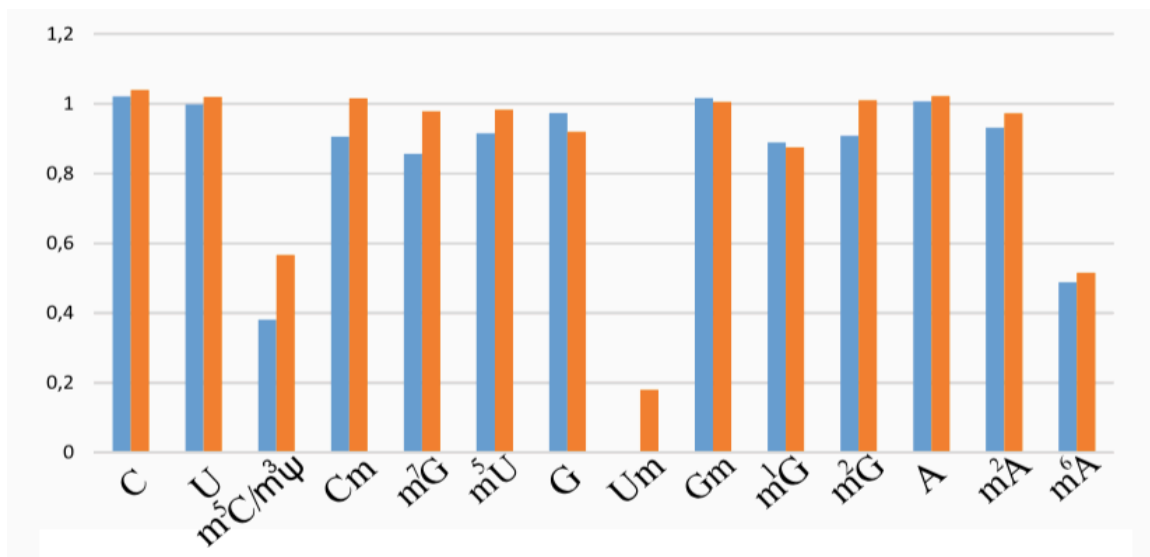
Jooniselt 17 on näha, et võrreldes kontrolltüve 23S rRNA-ga, on modifikatsiooni m⁶A piik 23S rRNA variandi $\Delta H72$ puhul oodatavalt ligikaudu poole võrra vähenenud. See tulemus on kinnituseks, et analüüsitud 23S rRNA-st on deleteeritud vastava modifikatsioonien süümi poolt äratuntav sait ning heeliksis 72 paiknevat modifikatsiooni m⁶A2030 ei ole olnud võimalik sünteesida. Samas on eeldatavalt olnud võimalik ribosoomi varases assambleerimise faasis sünteesitava (Siibak ja Remme, 2010) modifikatsiooni m⁶A1618 domeenis III (Sergiev *et al.*, 2008). Lisaks on 50S ribosomaalsest fraktsioonist eraldatud $\Delta H72$ 23S rRNA nukleosiidses

kompositsioonis täielikult puudu subühiku assambleerimisel eelviimasena lisatava modifikatsiooni Um(2552) piik (Siibak ja Remme, 2010). Samas kui 70S fraktsioonist eraldatud Δ H72 23S rRNA koostises on Um nukleosiidi piik olemas, kuid tunduvalt väiksem metsiktüüpi 23S rRNA vastava piigist. Samuti on nii 50S kui 70S ribosomaalsest fraktsioonist eraldatud 23S rRNA variandi Δ H72 nukleosiidses kompositsioonis märgatav modifikatsiooni m^5C piigi vähenemine (Joonis 17).



Joonis 17. 23S ribosomaalse RNA variandi Δ H72 nukleosiidses koostise analüüsi HPLC kromatogramm. rRNA nukleosiidses koostise analüüsimiseks kasutati Gehrke ja Kuo poolt välja töötatud protokoll (Gehrke ja Kuo, 1989). Joonisel on kontrolltüve MG1655 kromatogramm märgitud musta, 50S partiklist eraldatud Δ H72 23S rRNA kromatogramm roosa ja 70S partiklist eraldatud Δ H72 23S rRNA kromatogramm sinise värviga. Piikide juurde on märgitud standardsed nukleosiidid (C, U, G, A) ja modifikatsioonid. Y ja X on proovide töötlemisest tulenevad tundmatud komponendid. Piigid on normaliseeritud standard nukleosiidide piikide kõrguste järgi. Katset on tehtud üks kord.

Joonisel 17 märgitud piikide pindalade normaliseerimiseks ja nukleosiidide hulga väljendamiseks metsiktüüpi 23S rRNA nukleosiidses koostises kasutati valemit 2. Saadud tulemused on esitatud joonisel 18, millest selgub, et võrreldes kontrolltüve 23S rRNA-ga on nii 50S kui 70S ribosomaalsetest partiklitest eraldatud 23S rRNA nukleosiidses koostises näha modifikatsiooni m^6A hulga vähenemist ligikaudu 50% võrra. Jooniselt 18 on näha ka, et modifikatsioon Um on 50S ribosomaalsest fraktsioonist eraldatud mutantse 23S rRNA nukleosiidses koostises täielikult puudu. Samal ajal kui 70S ribosomaalsest fraktsioonist eraldatud mutantse 23S rRNA koostises on modifikatsiooni Um hulk võrreldes metsiktüüpi 23S rRNA-ga vähenenud rohkem kui 80% võrra. Võrreldes kontrollribosoomidega on modifikatsiooni m^5C piik vähenenud keskmiselt 50% võrra (Joonis 18). Modifikatsiooniga m^5C samas piigis (Joonis 17) liigub ka ribosoomile 70S partiklis lisatav modifikatsioon $m^3\Psi$ (Ero *et al.*, 2008). Seega eeldatavasti on m^5C piigi vähenemine seotud ribosoomi assambleerimise hilises faasis lisatava modifikatsiooniga $m^3\Psi$ ning mitte ribosoomi varases assambleerimise faasis lisatava modifikatsiooni m^5C (Siibak ja Remme, 2010) vähenemisega.



Joonis 18. Δ H72 23S rRNA nukleosiidse koostise analüüs. Joonisel on näidatud ribosomaalsetest partiklitest eraldatud 23S rRNA variandi Δ H72 erinevate nukleosiidide suhe võrrelduna MG1655 23S rRNA nukleosiididega. x-teljel on 23S rRNA nukleosiidid ja y-teljel suhtarvud võrrelduna metsiktüüpi 23S rRNA nukleosiididega. Sinisega on märgitud 50S ribosomaalsest partiklist ja oranžiga 70S ribosomaalsest partiklist eraldatud 23S rRNA nukleosiidne koostisioon. Tulemused on normaliseeritud standardnukleosiidide pindalade järgi.

2.5 Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli kontrollida hüpoteesi, mille kohaselt mutatsioonide tegemine 23S rRNA domeenis 0 omab efekti ribosoomide biogeneesile. Selleks konstrueeriti ekspressioonivektorid, mille kodeeritav *rrnB* operon sisaldas nelja erinevat 23S rRNA varianti: $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$ ja A2030T.

Töö tulemustest selgub, et 23S rRNA domeeni 0 heeliksites 25a ja 72 deletsioone omavate 23S rRNA variantide $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$ ekspresseerimine põhjustab bakterirakkude ribosoomiprofiilides vabade 50S ribosomaalsete subühikute hulga suurenemise (Joonis 14), mille põhjuseks võib olla asjaolu, et vastavate 23S rRNA variantide ekspresseerimisel tekivad defektid funktsionaalse ribosoomi assambleerimisel. Kuna ribosoomi assambleerimise puhul on tegemist astmelise protsessiga (Zahra *et al.*, 2011), siis vead varases assambleerimise faasis avaldavad mõju kogu edasisele assambleerimise protsessile, kas seda aeglustades või viies protsessi tupikusse. 23S rRNA domeeni 0 heeliks 72 punktmutatsiooni sisaldava rRNA variandi, A2030T, ekspresseerimisel on bakterirakkude ribosoomiprofiili üldpilt plasmiidilt pBAD-t metsiktüüpi 23S rRNA-d ekspresseerivate rakkude omale kõige sarnasem, kuid erinevalt metsiktübist on nii A2030T kui ka $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$ ja $\Delta H72$ 23S rRNA variante ekspresseerivate bakterirakkude ribosoomiprofiilides täheldatav polüsoomide fraktsiooni vähenemine (Joonis 14). Polüsoomide hulk on korrelatsioonis translatsiooni aktiivsusega, see tähendab, et kui rakkudes on polüsoomide fraktsioon suur, siis on valgusünteesi aktiivsus kõrge. Seega võib nende andmete põhjal oletada, et mutantseid 23S rRNA variante ekspresseerivates bakterirakkudes on translatsiooni aktiivsus langenud.

Jooniselt 15 on selgelt näha efekt 23S rRNA variandi $\Delta H72$ ekspresseerimisel, kus 50S ribosomaalses fraktsioonis on plasmiidilt pBAD-t $\Delta H72$ ekspresseeritud 23S rRNA hulk väga suur, kuid sarnaselt plasmiididelt pBAD-t $\Delta H25a$ ja pBAD-t $\Delta H25aL$ ekspresseeritava 23S rRNA-ga, jõuab väga väheses koguses deletsiooni sisaldavat 23S rRNA-d translatsiooniliselt aktiivsetesse polüsoomidesse ja 70S partiklitesse (Joonis 15). Antud tulemuste alusel võib spekuloida, et deletsioonidega 23S rRNA variante ($\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$) sisaldavad 50S subühikud ei assambleeru õigesti ja seetõttu moodustub nende subühikute baasil translatsiooniliselt aktiivseid 70S ribosoomi väga vähesel määral. $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$ ja $\Delta H72$ 23S rRNA variantide vähene osalemine translatsioonis on korrelatsioonis ka vastavaid rRNA variante kandvaid plasmide ekspresseerivate bakterirakkude keskmiste generatsiooniaegadega, mis erinevad metsiktüüpi plasmidi ekspresseerivate rakkude keskmisest generatsiooniajast minimaalselt - ühe kuni kahe minuti võrra (Joonis 13).

Sarnaselt metsiktüüpi plasmiidiga, lülitub plasmiidilt pBAD-t A2030T ekspresseeritud 23S rRNA kõikidesse ribosomaalsetesse fraktsioonidesse (Joonis 15). Seega jõuab arvestatavas koguses 23S rRNA varianti A2030T ka translatsioonil osalevatesse partikkelitesse – polüsoomidesse ja 70S partikkelitesse. Kuna plasmiidilt pBAD-t A2030T 23S rRNA varianti A2030T ekspresseerivate bakterirakkude ribosoomiprofiil erineb metsiktüüpi 23S rRNA-d ekspresseerivate rakkude ribosoomiprofiilist peasjalikult polüsoomide fraktsiooni poolest, siis võib oletada, A2030T 23S rRNA variandi baasil assambleeritud ribosoomis esineb defekte translatsiooni elongatsioonifaasis. See selgitab 23S rRNA varianti A2030T ekspresseerivate rakkude ligikaudu 10 minutit pikemat generatsiooniaega.

Δ H72 23S rRNA-ga läbi viidud rRNA 5'-otsa analüüsi tulemustest selgus, et nii 50S kui ka 70S ribosomaalsetest fraktsioonidest eraldatud Δ H72 23S rRNA-de hulgas leidub valdavalt 5'-otsast lõpuni protsessimata rRNA eellaseid (Joonis 16). 70S ribosomaalsest fraktsioonist on vastavate rRNA eellaste hulk mõnevõrra väiksem, kuid rRNA on siiski valdavalt protsessimata (Joonis 16), mis näitab, et 23S rRNA nukleolüütiline protsessimine on jätkunud ka peale 50S subühiku, oletatavasti defektset, assambleerimist. Δ H72 23S rRNA-ga viidi läbi ka nukleosiidse koostise analüüs HPLC meetodiga, millest selgus, et Δ H72 23S rRNA nukleotiidsest kompositsioonist ribosoomi 50S subühiku hilises assambleerimise etapis lisatav modifikatsiooni Um (Siibak ja Remme, 2010) hulk vähenenud 80-100%. Modifikatsiooni Um või selle modifikatsiooni sünteesimise eest vastutava ensüümi puudumist on ka eelnevalt seostatud ribosoomi assambleerimise defektidega (Caldas *et al.*, 2000). Eeldatavasti on 23S rRNA nukleotiidsest kompositsioonist puudu ka kõige hilisem, ribosoomi 70S partiklis lisatav, modifikatsioon $m^3\Psi$ (Joonis 17). Selle modifikatsiooni sünteesimiseks on 23S rRNA tertsaarstruktuur väga oluline (Ero *et al.*, 2008). Ribosoomile eelviimasena ja viimasena lisatavate modifikatsioonide puudumine rRNA nukleosiidsest kompositsioonist toetab eelnevalt püstitatud hüpoteesi, mille kohaselt Δ H72 23S rRNA baasil toimuv ribosomaalse 50S subühiku assambleerimine on defektne.

Kokkuvõtlikult avaldub tulemustest, et kõik antud töös analüüsitud mutatsioonid 23S rRNA domeenis 0 põhjustavad suuremal või vähemal määral ribosomaalse 50S subühiku assambleerimise defekte.

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli kirjeldada *Escherichia coli* 23S ribosomaalse RNA domeenis 0 tekitatavate mutatsioonide mõju ribosoomide assambleerumisele. Selleks konstrueeriti ekspressioonivektorid, mille kodeeritav *rrnB* operon sisaldas nelja erinevat 23S rRNA varianti: 1) $\Delta H25a$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 25a kodeeriv järjestus kogu pikkuses (Joonis 4A), 2) $\Delta H25aL$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 25a lünga osa kodeeriv järjestus, 3) $\Delta H72$, mille *rrnB* operonist puudub 23S rRNA heeliksi 72 kodeeriv järjestus kogu pikkuses, 4) A2030T, mille *rrnB* operonis on 23S rRNA heeliksi 72 positsioonis 2030 olev modifitseeritav nukleotiid A vahetatud T nukleotiidi vastu. Kõik konstrueeritud plasmiidid sisaldasid lisaks soovitud mutatsioonile streptavidiini siduvat *tag*-i.

Tulemustest selgub, et domeeni 0-i heeliksi deletsioone sisaldavate 23S rRNA variantide ($\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$) ekspresseerimine ei põhjusta märkimisväärseid erinevusi bakterirakkude generatsiooniaegades. Selle põhjustele viitab asjaolu, et deletsioone sisaldavat 23S rRNA-d leidub eelkõige 50S mittetransleerivas ribosomaalses fraktsioonis. Seega jõuab deletsioone sisaldavat 23S rRNA-d translatsioonil osalevatesse 70S ribosoomidesse väheses koguses. Tuginedes töö tulemustele võib spekuloida, et $\Delta H25a$, $\Delta H25aL$ või $\Delta H72$ mutantset 23S rRNA-d sisaldavad 50S subühikud ei assambleeru õigesti ning seetõttu pole võimelised ka 30S subühikuga väga efektiivselt assotsieeruma, mis omakorda põhjustab mutantsete 50S subühikute kogunemise rakus, mida näitasid ka vastavad ribosoomiprofiilid.

Seevastu punktmutatsiooni 23S rRNA domeeni 0 heeliksis 72 sisaldavat 23S rRNA varianti A2030T lülitub arvestatavates kogustes ka teistesse ribosomaalsetesse fraktsioonidesse peale 50S fraktsiooni, mille alusel võib spekuloida, et A2030T 23S rRNA assambleerumine on sellevõrra olnud korrektsem. Seda kinnitab ka plasmiidilt pBAD-t A2030T ekspresseerivate rakkude ribosoomiprofiil, mis erineb metsiktüüpi 23S rRNA-d plasmiidilt pBAD-t *wt* ekspresseerivate rakkude ribosoomiprofiilist peaaesjalikult polüsoomide fraktsiooni poolest. Tulemuste põhjal võib oletada, et punktmutatsioon A2030T põhjustab mõningast häiritust translatsiooni elongatsioonil, mis selgitaks ka mutantset 23S rRNA varianti ekspresseerivate rakkude ligikaudu 10 minutit pikemat generatsiooniaega.

50S subühiku assambleerimise defektidele vihjasid ka plasmiidilt pBAD-t $\Delta H72$ ekspresseeritud mutantse 23S rRNA-ga eraldi läbi viidud analüüs, millest selgus, et deletsiooni sisaldava 23S rRNA 5'-ots on lõpuni protsessimata ja 23S rRNA-st puuduvad ribosoomi hilises assambleerimise faasis lisatavad modifikatsioonid Um2552 ning m³Ψ.

The effect of mutations in 23S rRNA's domain 0 on ribosome biogenesis

Carolin Kattel

SUMMARY

Ribosomes carry out a fundamental process in cells – the biosynthesis of proteins. Prokaryotic 70S ribosome is formed of the small subunit 30S and the large subunit 50S. *E. coli* large ribosomal subunit is composed of 23S rRNA, 5S rRNA and r-proteins. The center domain of the 23S rRNA is domain 0 which unites all other domains (I-VI) of 23S rRNA. The aim of this bachelor's thesis was to describe the effect of mutations in 23S rRNA's domain 0 on ribosome assembly. For this purpose, expression vectors containing four different 23S rRNA variants in the encoded *rrnB* operon, were constructed: 1) Δ H25a, which's *rrnB* operon has no sequence coding the 23S rRNA helix 25a (Fig. 4A), 2) Δ H25aL, which's *rrnB* operon has no sequence coding the loop of the 23S rRNA helix 25a, 3) Δ H72, which's *rrnB* operon has no sequence coding the 23S rRNA helix 72, 4) A2030T in which the *rrnB* operon has a nucleotide T instead of modified nucleotide A at position 2030 of the 23S rRNA helix 72. All constructed plasmids contained a streptavidin binding tag in addition to the desired mutation.

The results show that the expression of 23S rRNA variants (Δ H25a, Δ H25aL and Δ H72) containing deletions in domain 0's helices does not cause significant changes in the generation times of bacteria. This phenomenon can be explained by the fact that the 23S rRNA containing deletions is primarily found in the 50S nontranslating ribosomal fraction. Thus, a small amount of 23S rRNA containing the deletions reaches the 70S ribosomes involved in the translation process. Based on the results, it can be speculated that ribosomal 50S subunits containing Δ H25a, Δ H25aL and Δ H72 23S rRNA do not assemble correctly and therefore are unable to associate with the 30S ribosomal subunit effectively, which in turn results in the accumulation of mutant 50S ribosomal subunits, also shown by the corresponding ribosome profiles.

In contrast, 23S variant A2030T, containing a site-directed mutation in 23S rRNA domain 0's helix 72, is switched into other ribosomal fractions in considerable amounts, suggesting that the assembly of the A2030T 23S rRNA has thus been more correct. This is also confirmed by the ribosomal profile of the cells expressing the 23S rRNA variant A2030T, which mainly differs from the ribosomal profile of cells expressing wild-type 23S rRNA in polysome fraction. The results suggest that the site-directed mutation A2030T causes some interference in translation elongation, which would also explain the generation time of the cells expressing the mutant 23S rRNA variant being about 10 minutes longer.

A separate analysis of the mutant 23S rRNA expressed from plasmid pBAD-t Δ H72 also implicated in defects in the assembly of the 50S subunit, which revealed that the 5'-end of the 23S rRNA containing a deletion is incomplete and that the modifications Um2552 and m³Ψ, added at a later stage of ribosome assembly, are missing.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Margus Leppikut suurepärase juhendamise ja kannatlikkuse eest. Veel soovin tänada TÜMRI molekulaarbioloogia labori professorit Jaanus Remmet heade soovitude ja intrigeeriva lõputöö teema eest.

Samuti soovin tänada oma vanemaid, kes võimaldasid mul Tartusse õppima asuda.

Täna ka TÜMRI molekulaarbioloogia ja üldise mikroobibiokeemia meeldivat ja abivalmit seltskonda.

KASUTATUD ALLIKAD

Artiklid

Agirrezabala, X., Frank, J. (2009). Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 42(3), 159–200.

Al Refaii, A., Alix, J. H. (2009). Ribosome biogenesis is temperature-dependent and delayed in *Escherichia coli* lacking the chaperones DnaK or DnaJ. *Mol. Microbiol.*, 71, 748–762.

Apirion, D., Miczak, A. (1993). RNA processing in prokaryotic cells. *Bioassays*, 15, 113-120.

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.

Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62, 293-300.

Blanchard S. C., Puglisi J. D. (2001). Solution structure of the A loop of 23S ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3720-3725.

Bokov, K., Steinberg, S. V. (2009). A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA. *Nature*, 457, 977-980.

Bremer, H., Dennis, P. P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2, 1553–1569.

Brock, S., Szkaradkiewicz, K., Sprinzl, M. (1998). Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Molecular microbiology*, 29, 409-17.

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 23S ribosomal RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18562–18566.

Davies, C., Bussiere, D., Golden, B., Porter, S., Ramakrishnan, V., White, S. (1998). Ribosomal proteins S5 and L6: High-resolution crystal structures and roles in protein synthesis and antibiotic resistance. *Journal of molecular biology*, 279(4), 873–888.

Del Campo, M., Recinos, C., Yanez, G., Pomerantz, S. C., Guymon, R., Crain, P. F., ... Ofengand, J. (2005). Number, position, and significance of the pseudouridines in the large subunit ribosomal RNA of *Haloarcula marismortui* and *Deinococcus radiodurans*. *RNA*, 11(2), 210–219.

Dunn, J. J., Studier, F. W. (1973). T7 early RNAs are generated by site-specific cleavages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 1559-1563.

Ellwood, M., Nomura, M. (1982). Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 149, 458–468.

Ero, R., Peil, L., Liiv, A., Remme, J. (2008). Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*. *RNA*, 14(10), 2223-2233.

Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., Stark, H. (2015). Structure of the *E. coli* ribosome - EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, 520(7548), 567–570.

Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., ... Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 113(6), 789-801.

Gehrke, C. W., Kuo, K. C. (1989). Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 471, 3-36.

Ghora, B. K., Apirion, D. (1979). Identification of a novel RNA molecule in a new RNA processing mutant of *Escherichia coli* which contains 5S ribosomal RNA sequences. *J. Biol. Chem.*, 254, 1951–1956.

- Ghora, B. K., Apirion, D. (1978). Structural analysis and in vitro processing to p5 ribosomal RNA of a 9S RNA molecule isolated from an RNE mutant of *Escherichia coli*. *Cell*, 15, 1055–1066.
- Ginsburg, D., Steutz, J. A. (1975). The 30 S ribosomal precursor RNA from *Escherichia coli*. A primary transcript containing 23S, 16S, and 5S sequences. *J. Biol. Chem.*, 250, 5647-5654.
- Golovina, A. Y., Dzama, M. M., Osterman, I. A., Sergiev, P. V, ... Dontsova, O. A. (2012). The last rRNA methyltransferase of *E. coli* revealed: the yhiR gene encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A2030 of 23S ribosomal RNA. *RNA*, 18(9), 1725–1734.
- Green, R., Samaha, R., Noller, H. (1997). Mutations at nucleotides G2251 and U2585 of 23 S rRNA perturb the peptidyl transferase center of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 266(1), 40–50.
- Grondek, J. K., Culver, G. M. (2004). Assembly of the 30S ribosomal subunit: positioning ribosomal protein S13 in the S7 assembly branch. *RNA*, 10, 1861-1866.
- Gualerzi, C. O., Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29, 5881–5889.
- Gulen, B., Petrov, A. S., Okafor, C. D., Vander Wood, D., O'Neill, E. B., Hud, N. V., Williams, L. D. (2016). Ribosomal small subunit domains radiate from a central core. *Scientific Reports*, 6:20885.
- Gustafsson, C., Persson, B. C. (1998). Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m1G745-deficient mutant. *Journal of Bacteriology*, 180(2), 359–365.
- Hartz, D., McPheeters, D. S., Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev.*, 3, 1899–1912.
- Hartz, D., Binkley, J., Hollingsworth, T., Gold, L. (1990). Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. *Genes Dev.*, 4, 1790-1800.

- Hayes, F., Hayes, D. H. (1971). Biosynthesis of ribosomes in *E. coli*. I. Properties of ribosomal precursor particles and their RNA components. *Biochimie*, 53, 369–382.
- Jinks-Robertron, S., Nomura, M. (1987). Ribosomes and tRNA. In Neidhardt FC, et al. (eds.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. *American Society for Microbiology*, 1358–1385.
- Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H., Ehrenberg, M. (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell*, 3, 601-609.
- Khaitovich, P., Mankin, A. S. (1999). Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5 S rRNA. *Journal of molecular biology*, 291, 1025-34.
- King, T. C., Schlessinger, D. (1983). S1-nuclease mapping analysis of ribosomal-RNA processing in wild-type and processing deficient *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 258, 2034–2042.
- King, T. C., Sirdeskmukh, R., Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, 50, 428–451.
- Kisselev, L. L., Buckingham, R. H. (2000). Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 561-566.
- Leppik, M., Liiv, A., Remme, J. (2017). Random pseudouridylation in vivo reveals critical region of *Escherichia coli* 23S rRNA for ribosome assembly. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 6098–6108.
- 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, 581-593.
- Lindahl, L. (1973). Two new ribosomal precursor particles in *E. coli*. *Nat. New Biol.*, 243, 170-172.
- Lindahl, L. (1975). Intermediates and time kinetics of in vivo assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.*, 92, 15-37.

- Li, Z., Deutscher, M. P. (1995). The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 6883–6886.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M. P. (1999). Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA*, 5, 139–146.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M. P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.*, 18, 2878–2885.
- Madsen, C. T., Mengel-Jorgensen, J., Kirpekar, F., Douthwaite, S. (2003). Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 4738–4746.
- Maeda, M., Shimada, T., Ishihama, A. (2015). Strength and Regulation of Seven rRNA Promoters in *Escherichia coli*. *PloS one*, 10(12), 1-19.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19(6), 560–567.
- Misra, T. K., Apirion, D. (1979). RNase E, and RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 254, 1154–1159.
- Moazed, D., Noller, H. F. (1987). Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie*, 69(8), 879–884.
- Moazed, D., Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, 342, 142-148.
- Murray, H., D., Appleman, J., A., Gourse, R., L. (2003). Regulation of the *Escherichia coli* *rrnB* P2 promoter. *J. Bacterio.*, 185, 28–34.
- Murray, H., D., Gourse, R., L. (2004). Unique roles of the *rrn* P2 rRNA promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 52, 1375–1387.
- Nierhaus, K. H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie*, 73, 739–755.

- Nierhaus, K. H., Bordsch, K., Homann, H. E. (1973). Ribosomal proteins. 43. In vivo assembly of *Escherichia coli* ribosomal proteins. *J. Mol. Biol.*, 74, 587-597.
- Nikolaev, N., Silengo, L., Schlessi, D. (1973). Role for ribonuclease-III in processing of ribosomal ribonucleic acid and messenger ribonucleic-acid precursors in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 248, 7967-7969.
- Noller, H. F., Hoffarth, V., Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256(5062), 1416–1419.
- Noller, H. F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R. R., Kopylov, A. M., ... Woese, C. R. (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 9(22), 6167–6189.
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Letters*, 514, 17-25.
- Ofengand, J., Del Campo, M. (2004). Modified Nucleosides of *Escherichia coli* Ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, 1(1), 1-25.
- Paul, B., J., Ross, W., Gaal, T., Gourse, R., L. (2004). rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 749–770.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., ... Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 41(15), 7522-7535.
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, A., Maiväli, T. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO reports*, 12(5), 458-462.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108, 557-572.
- Roy, M. K., Singh, B., Ray, B. K., Apirion, D. (1983). Maturation of 5-S ribosomal-RNA: ribonuclease E cleavages and their dependence on precursor sequences. *Eur. J. Biochem.*, 131, 119–127.

Schmeing, T. M., Voorhees, R. M., Kelley, A. C., Gao, Y.-G., Murphy, F. V., Weir, J. R., Ramakrishnan, V. (2009). The Crystal Structure of the Ribosome Bound to EF-Tu and Aminoacyl-tRNA. *Science*, 326(5953), 688–694.

Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A. (2008). The ybiN gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23 S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), 291–300.

Sergiev, P. V., Golovina, A. Y., Sergeeva, O. V., Osterman, I. A., ... Dontsova, O. A. (2012). How much can we learn about the function of bacterial rRNA modification by mining large-scale experimental datasets? *Nucleic acids research*, 40, 5694-5705.

Shi, X., Khade, P. K., Sanbonmatsu, K. Y., Joseph, S. (2012). Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *Journal of molecular biology*, 419, 125-38.

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 of the United States of America*, 71, 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.

Sirdeshmukh, R., Schlessinger, D. (1985). Ordered processing of *Escherichia coli* 23S rRNA in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 13, 5041–5054.

Smith, B. A., Gupta, N., Denny, K., Culver, G. M. (2018). Characterization of 16S rRNA Processing with Pre-30S Subunit Assembly Intermediates from *E. coli*. *Journal of Molecular Biology*, 430(12), 1745-1759.

Srivastava, A. K., Schlessinger, D. (1990). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 105–129.

Stagg, S. M., Mears, J. A., Harvey, S. C. (2003). A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 328, 49-61.

Zahn, K. E., Averill, A., Wallace, S. S., Doublet, S. (2011). The miscoding potential of 5-hydroxycytosine arises due to template instability in the replicative polymerase active site. *Biochemistry*, 50, 10350-10358.

Takada, H., Shimada, T., Dey, D., Quyuun, M. Z., Nakano, N., Ishiguro, A., Yoshida, A., Yamamoto, K., Sen, R., Ishihama, A. (2016). Differential regulation of rRNA and tRNA transcription from the rRNA-tRNA composite operon in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 11(12), e0163057.

Williamson, J. R. (2003). After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *RNA*, 9, 165-167.

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. J., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonnheim, C., ... Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327-339.

Witmann, H.-G. (1976). Structure, Function and Evolution of Ribosomes. *European Journal of Biochemistry*, 61(1), 1-13.

Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B. G., Ofengand, J. (1995). A dual -specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *RNA*, 1(4), 437-448.

Young, R. A., Steitz, J. A. (1978). Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 3593–3597.

Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, 106, 233-241.

Yu, F. T., Tanaka, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Nakamura, A., Hirano, N., Suzuki, T., Yao, M., Tanaka, I. (2011). Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 19593-19598.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883–896.

Raamatud ja diplomitööd

Ero, R. Modifier view of the bacterial ribosome. 2012. Tartu Ülikool.

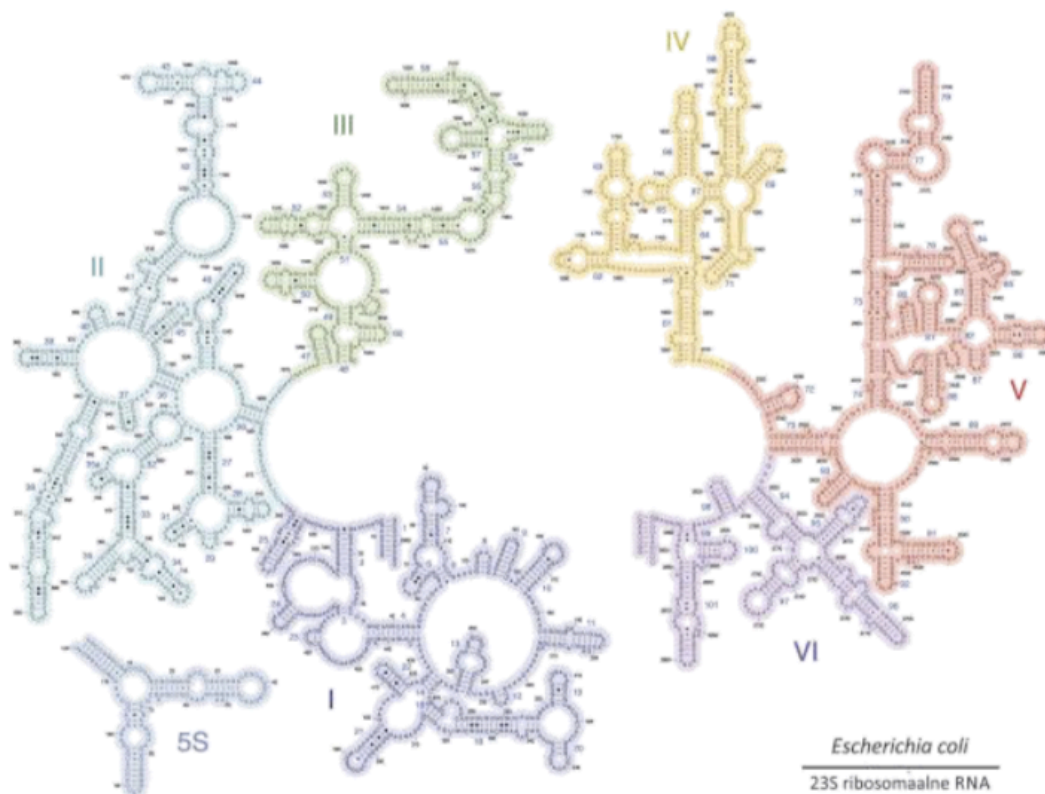
Garrett, R. A., Rodriguez-Fonseca, C. Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis. 1996. CRC Press, Boca Raton, FL.

Leppik, M. Pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifilisus *in vivo* ja *in vitro*. 2007. Tartu Ülikool.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and T. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

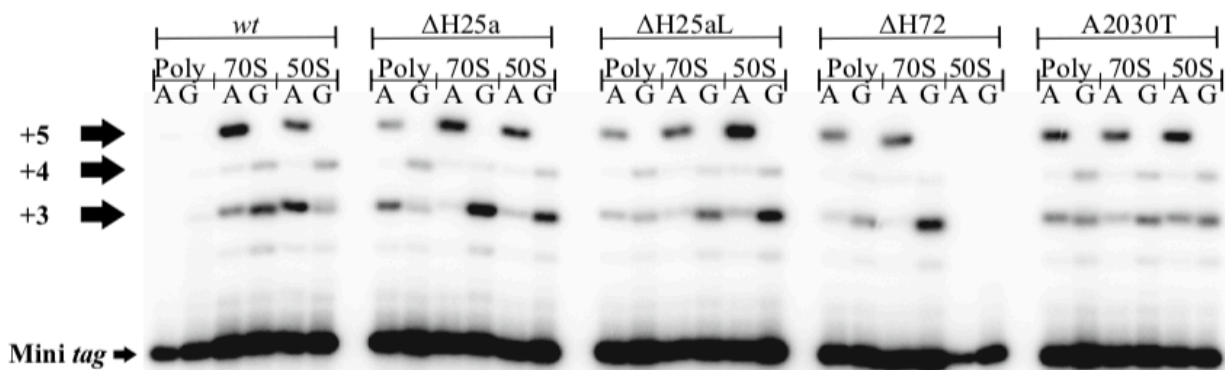
LISAD

Lisa 1



E. coli fülogeneesi järgi tuletatud 23S rRNA sekundaarstruktuur (Noller *et al.*, 1981). Joonisel on erinevate värvidega kujutatud 23S rRNA domeenid I, II, III, IV, V, VI ja 5S rRNA. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Lisa 2



Minisekvenerimine 23S rRNA variantide jaotuse analüüsiks ribosomaalsetes fraktsioonides. Joonisel on toodud metsiktüüpi (*wt*) ja konstrueeritud 23S rRNA variante ($\Delta H25a$, $\Delta H25aL$, $\Delta H72$ ja A2030T) ekspresseerivatest rakkudest eraldatud rRNA minisekvenerimise geelelektroforeesi pilt. Joonisel on eelnimetatud rRNA variantid toodud eraldi tulpadena, millest igas tulpas on eraldi välja toodud polüsoomide (Poly), 70S ja 50S fraktsioonidest eraldatud rRNA minisekvenerimise reaktsioonis tekkinud fragmendid.

Minisekveneerimise reaktsioonis kasutati didesoksünukleotiide ddA ja ddG (mis on joonisel iga ribosomaalse fraktsiooni tähise alla märgitud tähtede A ning G-ga), praimerit Mini tag (mille asukoht joonisel on tähistatud noolega). Minisekveneerimise reaktsioonil tekkinud +5, +4 ja +3 fragmendid on joonisel samuti märgitud nooltega. Metsiktüüpi genotüübile vastavad triibud (ingl bands) (dd)A +3 ja (dd)G +5. Streptavidiini *tag*-i olemasolule vastavad triibud (dd)A +4 ja (dd)G +3.

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Carolin Kattel (02.06.1996),

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

“23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju ribosoomide biogeneesile”,

mille juhendaja on PhD Margus Leppik,

Reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace lisamise eesmärgil kuni autoriõiguste kehtivuse tähtaja 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 3.0, 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 rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Carolin Kattel

27.05.2019