

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

23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju *E. coli* kasvule ja ribosoomide biogeneesile

Bakalaureusetöö

12 EAP

Agnes Vaht

Juhendaja PhD Margus Leppik

TARTU 2022

INFOLEHT

23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju *E. coli* ribosoomidele

Lühikokkuvõte: Ribosoom on molekulaarne masin, mille ülesandeks on valgu biosüntees. Bakteriaalne ribosoom koosneb väiksest ja suurest alaühikust, mille ülesanneteks on vastavalt mRNA dekodeerimine ja peptiidsideme katalüüs. Käesolev uurimustöö keskendub bakteriaalse ribosoomi suure alaühiku koosseisus oleva 23S rRNA tsentraalsele regioonile (nimetatakse domeen 0) ning täpsemalt selle heeliksile 72. Töö eesmärgiks oli teada saada, kuidas mõjutavad domeeni 0 heeliks 72 nukleotiidid *E. coli* kasvu ja ribosoomi biogeneesi. Selleks sisestati bakterisse *E. coli* 23S rRNA H72 punktmutatsioone sisaldavaid vektorplasmide ning jälgiti konstrueeritud tüve kasvu ning ribosomaalsete alaühikute jaotumist sahharoosigradiendis. Töö tulemustest selgub, et ühegi 23S rRNA variandi ekspresseerimine ei põhjusta muutusi bakterirakkude generatsiooniajas. G2027A ja C2025U mutatsioonid põhjustavad ribosoomi biogeneesi defekti, mis väljendub ribosomaalsete partiklite gradiendiprofiilides, viidates H72 järjestuse olulisusele ribosoomide korrektse biogeneesi toimumiseks.

Märksõnad: bakteriaalne ribosoom, 23S rRNA, domeen 0, ribosoomi biogenees

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinahappesüntees, proteiinisüntees

Effects of mutations in 23S rRNA domain 0 on *E. coli* growth and ribosome biogenesis

Abstract: The ribosome is a molecular machine responsible for protein biosynthesis. The bacterial ribosome consists of a small and large subunit, which are responsible for mRNA decoding and catalysing peptide bond formation, respectively. This research focuses on the core region of 23S rRNA in bacterial large subunit. The aim of the study was to investigate the role of helix 72 nucleotides in growth and ribosome biogenesis of *E. coli*. To achieve this, plasmids carrying 23S rRNA helix 72 variants were inserted into the wild-type *E. coli* strain. Growth and the distribution of ribosomal subunits in a sucrose gradient were then monitored. Our results indicate that the expression of any constructed 23S rRNA variant does not significantly affect the generation time. Analysis of ribosome gradient profiles shows that the mutations G2027A or C2025U cause a defect in ribosome biogenesis, referring to the importance of H72 in ribosome biogenesis.

Keywords: bacterial ribosome, 23S rRNA, domain 0, ribosome biogenesis

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Prokariootne ribosoom	8
1.2. 23S rRNA struktuur.....	8
1.3. Prokariootse ribosoomi biogenees.....	11
1.4. Prokariootne translatsioon	13
2. Eksperimentaalosa	17
2.1. Töö eesmärk	17
2.2. Materjalid	17
2.3. Metoodika.....	20
2.3.1. 23S rRNA variantide konstrueerimine ja kontrollimine.....	20
2.3.2. Bakteritüvede kasvukõverate mõõtmine	23
2.3.3. Bakteritüvede kasvatamine ja lüüs	23
2.3.4. Ribosoomi partiklite lahutamine	24
2.3.5. Ribosomaalse RNA sadestamine ja puhastamine.....	24
2.3.6. Minisekveneerimine	25
2.4. Tulemused	27
2.4.1. 23S rRNA variantide konstrueerimine ja kontrollimine.....	27
2.4.2. 23S rRNA variantide ekspressiooni mõju rakkude kasvule	28
2.4.3. 23S rRNA variantide ekspressiooni mõju ribosoomi profiilidele	30
2.5. Arutelu.....	35
Kokkuvõte	38

Resüme	39
Tänuõnad	41
Kasutatud allikate loetelu	42
Lisad	50
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	51

Kasutatud lühendid

aa-tRNA – aminoatsüül-tRNA

Amp – ampitsilliin

ap – aluspaar

Ara – arabinoos

A-sait – ribosoomi suures subühikus asuv sait, mis on afiinne aminoatüül-tRNA-ga

BPB – broomfenoolsinine

DDT – 1,4-ditiotreitool

E-sait – ribosoomi suures subühikus asuv sait, mis on afiinne deatsetüleeritud tRNA-ga

FS – formamiidi STOP-lahus

LLP – lüüsilahjenduspuhver

LP – lüüsi-*puhver*

PAAG – polüakrüülamiidgeel

P-sait – ribosoomi suures subühikus asuv sait, mis on afiinne peptidüül-tRNA-ga

RBS – ribosoomi seondumise järjestus (ingl. k. *ribosome binding site*)

S – Svedbergi ühik; sedimentatsioonikoefitsient

U – ühik (ingl. k. *unit*)

WT – metsiktüüp (ingl. k. *wild-type*)

2xYT – kahekordne pärmiekstrakti ja trüptooni sööde

Sissejuhatus

Ribosoom on kõikides rakkudes sisalduv makromolekulaarne masin, mille ülesandeks on valkude biosüntees ehk translatsioon. Funktsionaalne ribosoom on kokku pandud suurest ja väiksest alaühikust, mis prokariootide puhul sedimenteeruvad vastavalt 50S ja 30S partiklina. 50S subühik koosneb 23S ja 5S rRNA-dest ning 33 r-valgust ning 30S subühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 r-valgust. Käesolev töö keskendub prokariootse 50S alaühiku koostises olevale 23S rRNA-le, mille ülesandeks on katalüüsida peptiidsideme teket, mille abil lisatakse valgusünteesi käigus kasvavale polüpeptiidahelale uus aminohape.

1981. aastal esitasid Noller ja Gutell 23S rRNA sekundaarstruktuuri mudeli, mis põhineb katsetel, kus üksikahelalist 23S rRNA-d töödeldi üksikahelalise RNA spetsiifilise eksoribonukleaasi RNAas T-ga (Noller *et al.*, 1981). Selle mudeli kohaselt jaotati 23S rRNA sekundaarstruktuur kuueks rRNA domeeniks ehk rRNA regiooniks, millesse kuuluvad sekundaarstruktuuri elemendid on regiooni siseselt üksteisega tihedalt seotud. Küll aga on selle mudeli kohaselt 23S rRNA sekundaarstruktuuri südamikuks tsentraalne üksikahelaline RNA silmus, mida ei käsitletud eraldi domeenina. See muutus 2013. aastal, kui Petrov *et al.* esitasid korrigeeritud 23S rRNA sekundaarstruktuuri mudeli, mis põhineb ribosoomi 3D struktuuridel, võimaldades viia sekundaarstruktuuri paremasse kooskõlla tegelikult looduses esinevate struktuuridega (Petrov *et al.*, 2013). Korrigeeritud mudelis defineeritakse 23S rRNA-s kokku 7 domeeni. Lisaks varasemalt teada olnud kuuele domeenile tutvustati uue domeenina kõige väiksemat, kõrgelt struktureeritud ja konserveerunud domeeni 0, mis on 23S rRNA südamikuks ning pakuti, et selle ülesandeks on tagada ülejäänud kuue domeeni korrektne paiknemine ribosoomi tertsiaalstruktuuris (Petrov *et al.*, 2013).

Lisaks struktuursele rollile on otsitud vihjeid selle kohta, millised ülesanded võiksid domeenil 0 olla ribosoomide biogeneesis. On näidatud, et 23S rRNA-s asub kokku 18 positsioonis uridiin, mille pseudouridülatsioonil häirub ribosoomi suure subühiku biogenees, kusjuures 10 nendest positsioonidest asuvad domeenis 0, sealhulgas kõik kolm heeliksis 72 asuvat uridiini (Leppik *et al.*, 2017). Selliste pseudouridülatsioonile tundlike positsioonide kontsentreeritus 23S rRNA kõige väiksemas domeenis viitab asjaolule, et domeenil 0 on oluline roll ribosoomi assambleerumisel (Leppik *et al.*, 2017). Samuti on näidatud, et 23S rRNA variandi, milles puudub heeliks 72, ekspressioon põhjustab rakkudes metsiktüübist erinevat ribosoomi partiklite jaotumist sahharoosi

gradiendis, mis viitab samuti ribosoomi assambleerumise defektile (Kattel, 2019). Üldjoontes on siiski domeen 0 rolli kohta ribosoomide biogeneesis veel vähe teada.

Käesolev töö on jätkuks Katteli (2019) uurimistööle, et suunatud mutageneesi abil välja selgitada, kas ja kuidas mõjutavad heeliksi 72 erinevad nukleotiidid *E. coli* rakkude kasvu ning ribosoomide biogeneesi.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Prokarüootne ribosoom

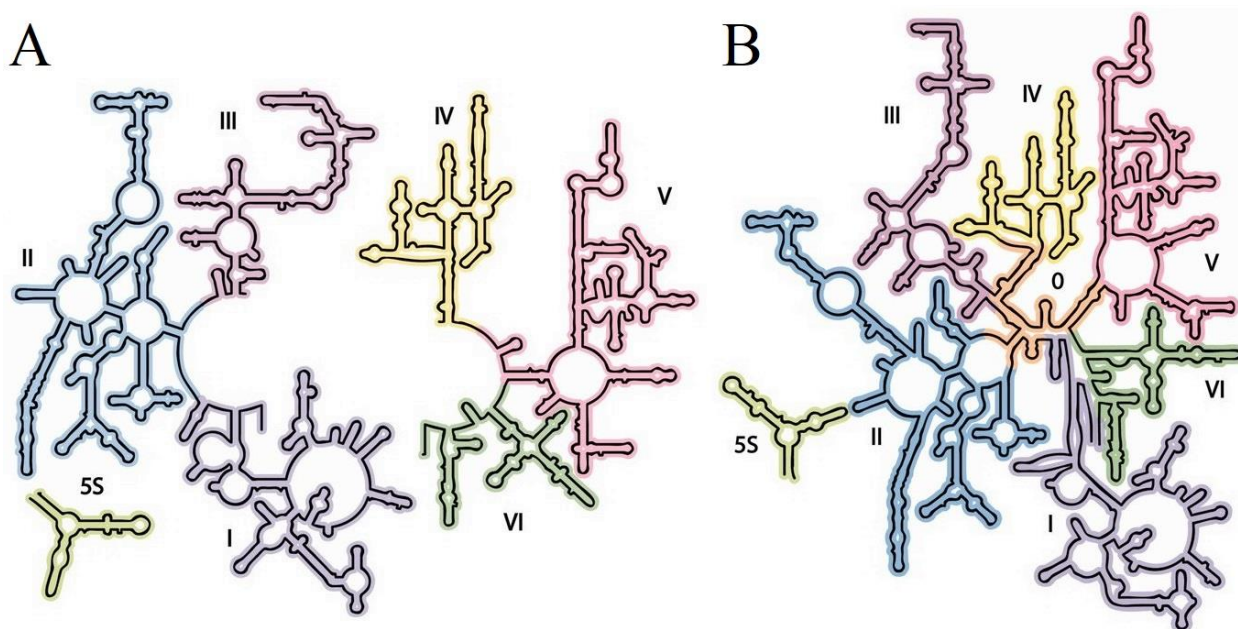
Ribosoomid on universaalselt konserveerunud RNA-valk kompleksid, mis vastutavad valgusünteesi läbiviimise eest. Funktsionaalne ribosoom koosneb kahest alaühikust. Ribosoomi väikses alaühikus, mis sedimenteerub 30S partiklina, toimub matriits-RNA-s (mRNA-s) sisalduva geneetilise info lugemine ja dekodeerimine kolmenukleotiidsete koodonite alusel (Green & Noller, 1997). Suures alaühikus, mis sedimenteerub 50S partiklina, asub peptidüültransferaasne tšenter, kus toimub peptiidside moodustumine valguahela sünteesil (Monro, 1967). Ribosoomi suur ja väike alaühik ühinevad translatsiooni initsiatsioonil funktsionaalseks 70S ribosoomiks, mis võimaldab kahel alaühikul koos töötada ja seeläbi transleerida mRNA-s sisalduvat geneetilist teavet funktsionaalseks valguks (Nomura *et al.*, 1967; Tissières *et al.*, 1960).

Bakteri *E. coli* 70S ribosoomis sisaldub 3 rRNA-d ja 54 valku. Väike alaühik koosneb 1542 nukleotiidsest 16S rRNA-st (Carbon *et al.*, 1978) ja 21-st r-valgust (Kaltschmidt & Wittmann, 1970). Suur alaühik koosneb 2904 nukleotiidsest 23S rRNA-st (Brosius *et al.*, 1980), 120 nukleotiidsest 5S rRNA-st (Brownlee *et al.*, 1967) ja 33-st r-valgust (Hindennach *et al.*, 1971). Bakteriaalse ribosoomi massist moodustab umbes kaks kolmandikku rRNA ning ülejäänud kolmandiku r-valgud (Tissières *et al.*, 1959). Oluline on aga avastus, et suures subühikus paiknev peptidüültransferaasne tšenter koosneb vaid rRNA-st, millest saab järeldada, et ribosoomi katalüütilise aktiivsuse tagab ribosomaalne RNA, mitte r-valgud (Nissen *et al.*, 2000). Ribosomaalsete valkude ülesandeks on eelkõige juhatada rRNA-d ribosoomi assambleerimise käigus läbi mitmete konformatsiooniliste muutuste ning saavutatud natiivset konformatsiooni stabiliseerida (Spillmann *et al.*, 1977), kusjuures mõned r-valgud osalevadki vaid ribosoomi assambleerimisel ning pole valgu biosünteesiks põhimõtteliselt vajalikud (Franceschi & Nierhaus, 1990; Spillmann & Nierhaus, 1978).

1.2. 23S rRNA struktuur

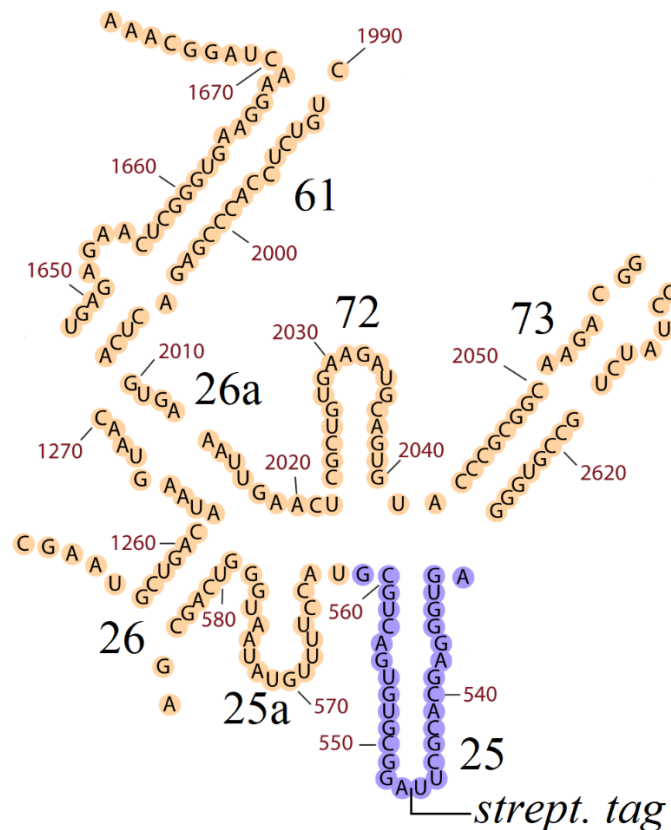
E. coli 23S rRNA molekul koosneb praeguste teadmiste kohaselt seitsmest kõrgelt struktureeritud piirkonnast ehk domeenist (Joonis 1B). Pikka aega oli aktsepteeritud Nolleri ja Gutelli 1981. aastal esitatud 23S rRNA sekundaarstruktuuri mudel, milles oli defineeritud kuus rRNA domeeni, mis lähtusid tsentraalsest rõngakujulisest üksikahelalisest rRNA-st, mida nimetati „tsentraalse silmuse“

piirkonnaks (Joonis 1A). Küll aga hakati vihjeid leidma selle kohta, et „tsentraalse silmuse“ asemel on 23S rRNA südamikuks hoopiski kõrgelt struktureeritud ja konserveerunud ning mitmetest kaksikheeliksitest koosnev struktuur (Haselman *et al.*, 1989). 2013. aastal esitati Petrovi *et al.* poolt uuendatud 23S rRNA sekundaarstruktuuri mudel, mille koostamiseks on kasutatud 23S rRNA röntgendifraktsiooni andmetel põhinevaid 3D struktuure.



Joonis 1. Ribosomaalse 23S rRNA sekundaarstruktuur. Kujutatud on ka 23S rRNA-ga interakteeruv 5S rRNA (heleroheline). Mõlemal joonisel on kujutatud domeenid I (lilla), II (sinine), III (magenta), IV (kollane), V (roosa) ja VI (roheline). (A) Varasem *E. coli* 23S rRNA sekundaarstruktuur, mis on jaotatud kaheks osaks ning mille kuus domeeni lähtuvad ühest tsentraalsest rõngakujulisest üksikahelalisest rRNA-st. (B) Petrovi *et al.* täiendatud mudel, millel on kujutatud seitse 23S rRNA domeeni. 23S rRNA südamikuks on 0 (oranž), millest lähtuvad domeenid I-VI. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Petrovi *et al.* (2013) täiendatud 23S rRNA sekundaarstruktuuris on suurimateks korrektuurideks uute heeliksiste 25a, 26a, 49a ja 49b defineerimine ning struktuuri keskel paikneva domeeni 0 defineerimine seitsmenda regioonina. Domeeni 0 koosseisu kuuluvad varasemalt teistesse domeenidesse kuulunud heeliksist 26, 61, 72 ja 73 ning uued heeliksist 25a ja 26a (Joonis 2). 23S rRNA domeeni 0 komponendid interakteeruvad domeeni sees tihedalt üksteisega, kuid ka mitmete teiste 23S rRNA domeenide elementidega, moodustades väga kõrgelt struktureeritud regiooni, mille bioloogiliseks ülesandeks näib olevat tagada ülejäänud kuue regiooni ning kokkuvõttes terve ribosoomis oleva rRNA korrektne ruumiline paiknemine (Petrov *et al.*, 2013).



Joonis 2. 23S rRNA domeeni 0 (joonisel oranž) ja domeeni I kuuluva heeliksi 25 (joonisel lilla) sekundaarstruktuur. Domeeni 0 koosseisu kuuluvad heeliksid 25a, 26, 26a, 61, 72 ja 73. Käesoleva töö käigus kasutati kontrollina plasmidi, mille 23S rRNA heeliksi 25 järjestus sisaldas ~70 nt pikkust streptavidiini aptameeri (Leonov *et al.*, 2003; Piir *et al.*, 2011). Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Lisaks struktuursele rollile aktiivses ribosoomis on leitud vihjeid ka domeeni 0 tähtsusele ribosoomide biogeneesis. Leppik *et al.* (2017) on 23S rRNA-s identifitseerinud 18 uridiini, mille pseudouridülatsioonil häirub ribosoomi suure subühiku biogenees, kusjuures kõigist identifitseeritud pseudouridülatsioonile tundlikest uridiinidest 8 leiti olevat kontsentreerunud 23S rRNA domeeni 0, viidates sellele, et domeenil 0 võiks olla oluline roll ribosoomide assambleerumises. On oluline märkida, et domeeni 0 koosseisu kuuluv heeliks 72 sisaldab kokku kolme uridiini ja nende kõigi pseudouridülatsioonid korreleerusid 50S alaühiku assambleerumise häirete esinemisega (Leppik *et al.*, 2017).

Domeeni 0 heeliksi 72 (*E. coli* nukleotiidid 2023-2040; Joonis 2) rolli kohta bakteriaalses 23S rRNA-s on siiani vähe teada, kuid heeliksi järjestuse ja struktuuri konserveeruvus kõigis kolmes

fülogeneetilises domeenis annab alust arvata, et tegemist on ribosoomis väga olulise piirkonnaga. Varasemalt on leitud, et mõned mutatsioonid heeliksis 72 põhjustavad *E. coli*-s letaalset fenotüüpi (Thompson *et al.*, 2001). O'Connor (2007) on oma töös spekulerinud, et mutatsioon U2026C destabiliseerib heeliksit 72 ning sellest tuleneva 50S subühiku assambleerumise defekti tõttu on rakkudes eelistatud metsiktüüpi 50S subühikute assotseerumine 30S subühikutega, mistõttu jõuab mutantset 23S rRNA-d vähem 70S subühikutesse ja polüsoomidesse. On ka näidatud, et heeliksi 72 deletsiooniga 23S rRNA variandi ekspressioon toob kaasa vabade ribosomaalsete 50S partiklite hulga tõusu ning seda arvatavasti defekti tõttu 30S subühikuga assotsiatsioonil (Kattel, 2019).

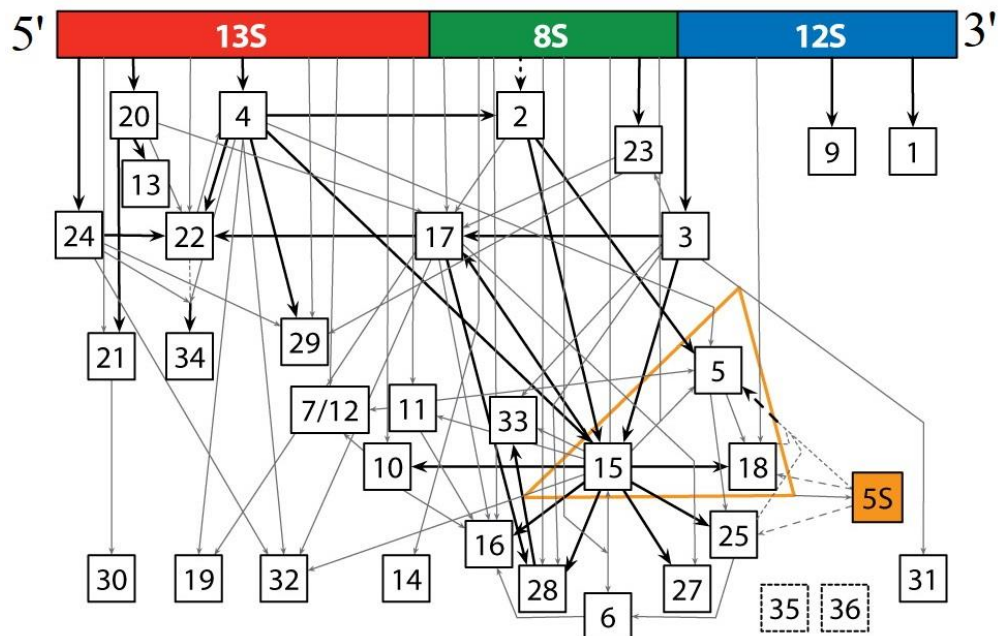
Varasemalt on juba teada, et heeliksi 72 ainsa metüleeritava nukleotiidi A2030 asendamine ribosoomi biogeneesi defekti ei põhjusta (Kattel, 2019). Samuti on teada, et kõik kolm heeliksi 72 uridiini pseudouridülatsioonid on seotud 50S alühiku biogeneesi defektiga (Leppik *et al.*, 2017), mistõttu võiksid nendes positsioonides asuvad uridiinid olla ribosoomide biogeneesis olulised. Selle uurimustöö raames on aga keskendunud heeliksi 72 nukleotiididele või aluspaardumistele, mis on bakterite seas äärmiselt kõrgelt konserveerunud (Joonis 6).

1.3. Prokarüootse ribosoomi biogenees

Bakterirakkudes leiduvate ribosoomide arv on tugevalt seotud raku kasvukiirusega – kiiresti kasvava (~20 minutilise generatsiooniajaga) *Escherichia coli* raku ribosoomide arvuks on hinnatud ligi 70 000, samas kui aeglaselt kasvavas rakus võib ribosoomide arv langeda 10 korda madalamale (Bremer & Dennis, 2008). *E. coli* ribosomaalseid RNA-sid transkribeeritakse seitsmelt erinevalt rRNA (*rrn*) operonilt – *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* ja *rrnH* (Ellwood & Nomura, 1982; Kiss *et al.*, 1977). Nii mitme *rrn* operoni olemasolu on arvatavasti vajalik selleks, et läbi ribosoomide sünteesi võimalikult efektiivselt optimeerida valgusünteesi kiirust vastavalt raku vajadustele muutuvates keskkonnatingimustes (Condon *et al.*, 1995).

Kõik bakteriaalse ribosoomi koosseisus olevad rRNA-d (5S, 16S ja 23S) transkribeeritakse *rrn* operonilt ühe primaarse 30S rRNA transkriptina (Kiss *et al.*, 1977). Ribosomaalsete valkude ühinemine ja nende abil ka rRNA voltumine algab niipea, kui r-valkude seondumissaidid muutuvad kättesaadavaks, s.t rRNA 5'-poolsetes osades algab ribosoomi assambleerimise protsess juba enne, kui RNA polümeraas on primaarse transkripti lõpuni sünteesinud (Mangiarotti *et al.*, 1968). Informatsioon selle kohta, kuidas täpselt rRNA ja r-valgud peavad voltuma ja üksteisega ühinema, sisaldub rRNA ja r-valkude järjestuses ja struktuuris (Traub & Nomura, 1968). Ribosomaalsete

valkude seondumine rRNA-ga on oma olemuselt hierarhiline protsess, mistõttu nimetatakse rRNA-ga esimesena seonduvaid valke primaarseteks r-valkudeks ning neid r-valke, mille seondumine on võimalik alles pärast esimeste valkude seondumist, sekundaarseteks r-valkudeks (Held *et al.*, 1974). Sellise hierarhilise süsteemi kirjeldamiseks on loodud nii 30S kui 50S alaühikute *in vitro* assambleerumise kaardid (Joonis 3), kus on graafiliselt näidatud erinevate r-valkude omavahelised sõltuvused alaühiku assambleerimisel (Held *et al.*, 1974; Herold & Nierhaus, 1987). Küll aga on *in vivo* katsetest selgunud, et assambleerumise vaheproduktid võivad valgulise koosseisu poolest olla üksteisest küllaltki erinevad, viidates sellele, et *in vivo* eksisteerib mitmeid alternatiivseid assambleerumise radasid (Sykes *et al.*, 2010), kus rRNA-ga seonduvate r-valkude järjekord ja assambleerumise kineetiline mehhanism on mõnevõrra erinevad.



Joonis 3. Prokariüotse 50S subühiku assambleerumiskaart. Nooltega on näidatud 50S alaühiku koosseisu kuuluvate valkude L1-L34 seondumiste omavahelised termodünaamilised sõltuvussuhted. 23S rRNA on jaotatud kolmeks osaks (13S, 8S ja 12S) ning nendest lähtuvad nooled viivad valkudeni, mis 23S rRNA-ga seonduvad. Mustad nooled näitavad tugevamat seondumist ning hallid jooned nõrgemat seondumist. 5S rRNA (joonisel oranž) seondumine 23S rRNA-ga sõltub r-valkudest L5, L15 ja L18. Joonis kohandatud (Shajani *et al.*, 2011).

Primaarne rRNA transkript läbib peale transkriptsiooni ka süstemaatilise nukleolüütilise protsessingu ehk seda lõigatakse 5'- ja 3'-otsadest mitmete nukleaside poolt. Esmase protsessingu viib läbi endonukleas RNAas III, lõigates primaarsest transkriptist välja 5S, 16S ja 23S rRNA-de prekursorid (Ginsburg & Steitz, 1975). Edasise protsessingu läbivad prekursorid vähemalt nelja

erineva nukleaasi toimel, millest teadaolevad on endoribonukleaasid E, G ja T (Li *et al.*, 1999a, 1999b). On näidatud, et nii 16S kui 23S rRNA-de 5'- ja 3'-otste lõplik valmimine toimub funktsioneerivates polüribosoomides, ning on spekulieritud, et alles transleerivas partiklis saavutab rRNA sellise konformatsiooni, kus see on lõplikuks protsessimiseks nukleaasidele ligipääsetav (Mangiarotti *et al.*, 1974; Srivastava & Schlessinger, 1988).

Ribosoomi assambleerumisel osalevad ka mitmed kofaktorid. Näiteks on leitud, et tsäperonvalgud DnaK ja DnaJ osalevad 30S alaühiku assambleerumisel (Maki *et al.*, 2002) ning ATP-sõltuv RNA helikaas DbpA interakteerub 23S rRNA-s paikneva heeliksiga 92 50S alaühiku assambleerimise käigus (Sharpe Elles *et al.*, 2009). Arvatavasti seisneb selliste kofaktorite olulisus selles, et need aitavad lõhkuda või vältida mittekorrektseid sekundaarstruktuure, mis suurte RNA-de järkjärgulisel voltumisel paratamatult tekivad (Williamson, 2003).

1.4. Prokarüootne translatsioon

Prokarüootides seonduvad ribosoomid mRNA-ga kohe, kui selle 5'-otsas sisalduv RBS järjestus on RNA polümeraasi poolt transkribeeritud ja sellest väljunud (Kohler *et al.*, 2017). Seega on bakteris transkriptsioon ja translatsiooni initsiatsioon füüsiliselt seotud. On näidatud, et transleeriv ribosoom mõjutab otseselt sellega RNA transkripti kaudu seotud RNA polümeraasi kiirust, pannes sellega aluse elegantsele transkriptsiooni regulatsioonimehhanismile, kus parasjagu saadaval olevate aminohapete kogus ehk üldine toitainete seis rakus määrab transleeriva ribosoomi kaudu ära geenide transkribeerimise kiiruse (Proshkin *et al.*, 2010).

Translatsiooni eesmärgiks on konverteerida mRNA-s sisalduv geneetiline informatsioon valgu aminohappeliseks järjestuseks. Protsess jaotatakse neljaks faasiks: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosomaalsete partiklite taaskasutamine. Translatsioon on olemuselt äärmiselt dünaamiline protsess, mille jooksul on ribosoomid pidevas konformatsioonilises muutumises (Spirin, 1987). Matriits-RNA koodonite dekodeerimine, aminohapete lülitamine polüpeptiidahelasse ning ribosoomi liikumine mööda mRNA-d on kõik seotud ribosoomi konformatsiooniliste muutusega, mis tihtipeale vajavad GTP hüdrolüüsist saadud energiat (Rodnina *et al.*, 1996, 1997). Olulisemad translatsioonis osalevad GTPaasid on initsiatsioonifaktor IF2, elongatsioonifaktorid EF-G ja EF-Tu ning terminatsioonifaktor RF3 (Freistoffer *et al.*, 1997; Myasnikov *et al.*, 2005; Rodnina *et al.*, 1997).

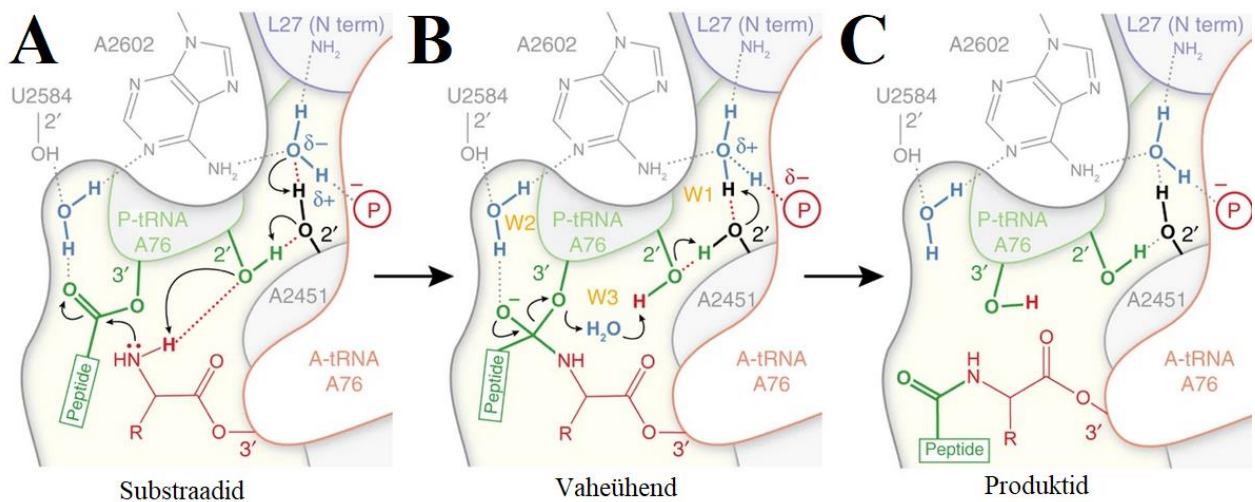
Olulist osa ribosoomi dünaamilistes protsessides mängib aminohappeid kandvate tRNA-de liikumine läbi ribosoomi (Moazed & Noller, 1989). Ribosoomis asub kolm tRNA-de seondumise saiti, mida läbivad järjestikku kõik translatsiooni elongatsioonis osalevad tRNA-d: A-sait, mis on afiinne aminohapet kandva aa-tRNA suhtes, P-sait, mis on afiinne polüpeptiidahelat kandva peptidüül-tRNA suhtes ning E-sait, mis on afiinne deatsetüleeritud tRNA suhtes (Moazed & Noller, 1989; Rheinberger *et al.*, 1981). Seega siseneb aminohapet kandev aa-tRNA ribosoomi, seondudes selle A-saiti, ning tRNA deatsetüleerimise järgselt väljub see ribosoomist E-saidi kaudu (Moazed & Noller, 1989; Rheinberger *et al.*, 1981).

Bakteriaalse valgusünteesi esimest aminohapet formüülmetioniini kandvat tRNA-d nimetatakse initsiaator-tRNA-ks, mille kohaletoomiseks ribosoomi P-saiti on vajalik GTPaasse aktiivsusega translatsiooni initsiatsioonifaktor IF2 (Wintermeyer & Gualerzi, 1983). Lisaks on vajalik initsiatsioonifaktorite IF1 ja IF3 seondumine (Wintermeyer & Gualerzi, 1983). Startkoodoni (tavaliselt AUG) äratundmisel tekkiv mRNA ja tRNA vaheline koodon-antikoodon paardumine indutseerib 30S preinitsiatsioonikompleksi konformatsioonilise muutuse, misjärel nimetatakse 30S initsiatsioonikompleksiks (Milón *et al.*, 2012). Seejärel ühineb kompleksiga ribosoomi suur alaühik ning toimub IF2 poolt vahendatud GTP hüdrolüüs, pärast mida initsiatsioonifaktorid dissotseeruvad ribosoomi küljest ning moodustub elongatsiooniks valmis olev 70S initsiatsioonikompleks (Lockwood *et al.*, 1972; Sabol & Ochoa, 1971; Thach *et al.*, 1969). 70S initsiatsioonikompleksi koosseisu kuuluvad mRNA, ühinenud ribosoomi suur ja väike alaühik ning ribosoomi P-saidis asetsev formüülmetioniini kandev tRNA (Lockwood *et al.*, 1972).

Translatsiooni elongatsioon on tsükliline protsess, mille etappideks on mRNA-s sisalduva kolmenukleotiidsed koodoni dekodeerimine 30S alaühikus, peptiidideme süntees 50S alaühikus ning translokatsioon ehk ribosoomi edasi liikumine mRNA suhtes ühe koodoni võrra. Aminoatsüül-tRNA tuuakse ribosoomi kohale ternaarses kompleksis elongatsioonifaktori EF-Tu ning GTP-ga (Rodnina *et al.*, 1996). Stabiilse mRNA koodoni ja aa-tRNA antikoodoni lingu interaktsiooni tekkimise korral ehk korrektse koodon-antikoodon paardumisel toimub EF-Tu poolt vahendatud GTP hüdrolüüs, samas kui mittekomplementaarse paardumise korral aa-tRNA dissotseerub ribosoomist (Rodnina *et al.*, 1996). EF-Tu-GDP lahkumine ribosoomist põhjustab tRNA-s konformatsioonilise muutuse, kus aa-tRNA 3'-ots interakteerub suure subühiku 23S rRNA heeliksiga 89 nii, et aa-tRNA kantava aminohappe α -aminorühm pööratakse peptidüültransferaasse

tsentri poole (Noel & Whitford, 2016; Whitford *et al.*, 2010). Seda protsessi nimetatakse tRNA akommodatsiooniks (Whitford *et al.*, 2010).

Peptiidside moodustumine toimub ribosoomi peptidüültransferaases tsentris. Tegemist on põhimõttelt nukleofiilse asendusreaktsiooniga, kus ühe aminohappe aminorühm atakeerib teise aminohappe karboksüülrühma süsinikku, mille tulemusena deatsetüleeritakse P-saidis asuv peptidüül-tRNA ning selle küljes asunud peptiidahel liidetakse A-saidis asuva aa-tRNA külge (Dorner *et al.*, 2002). Ribosomaalne RNA ise reaktsioonis ei osale, küll aga kindlustab see peptiidside moodustumiseks vajalikud reaktsioonitingimused, positsioneerides reaktsioonis osalevaid tRNA-sid ning veemolekule (Joonis 4) (Wallin & Åqvist, 2010). On leitud, et peptiidside moodustumisele võib kaudselt kaasa aidata ka peptidüültransferaasse tsentri vahetus läheduses paiknev r-alk L27 ning seda väidet toetab hästi avastus, et L27 puudumine põhjustab *E. coli* tugevat kasvudefekti (Wower *et al.*, 1998). Siiski ei ole näiteks arhedest L27 valgule samasuguse funktsiooniga homoloogi leitud (Ban *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2001), mistõttu ei saa öelda, et L27 oleks peptiidside tekkes konserveerunud osaline.



Joonis 4. Peptiidside tekimise üks pakutud mehhanism. Joonisel on kujutatud bakteri *Thermus thermophilus* peptidüültransferaasest tsentrit koos lähedalasuvate struktuuridega. (A) Aminoatsüül tRNA α -aminorühm kui nukleofiil atakeerib peptidüül-tRNA karbonyülrühma süsinikku ja kaotab protoni. (B) Moodustub vaheühend, kus toimub positiivsete ja negatiivsete osalaengute delokaliseerumine veemolekulide abil. (C) Reaktsiooni lõpp-produkt, kus A-saidis asub peptidüül-tRNA ning P-saidis deatsetüleeritud tRNA. Joonis kohandatud (Polikanov *et al.*, 2014).

Selleks, et A-sait vabaneks uue aa-tRNA jaoks, peab ribosoom mRNA-l edasi liikuma ehk toimuma translatsioon. Translokatsiooni esimeses faasis liigub deatsetüleeritud tRNA E-saiti ning peptidüül tRNA P-saiti, küll aga säilitavad deatsetüleeritud tRNA ja peptidüül tRNA antikoodoni lingud oma interaktsioonid P- ja A-saitides (Moazed & Noller, 1989). Seisu, kus tRNA on liikunud edasi järgmisesse saiti, kuid tema antikoodoni ling jääb seotuks eelmisesse saidiga, nimetatakse tRNA hübriidseks olekuks. Lõplikuks tRNA-de translatsiooniks on vaja GTP hüdrolüüsi, mida vahendab universaalselt konserveerunud ribosoomi elongatsioonifaktor EF-G (Rodnina *et al.*, 1997). Põhimõtteliselt on translatsioon võimalik ka ilma GTP hüdrolüüsita, kuid protsess on siis hinnanguliselt 50 korda aeglasem (Rodnina *et al.*, 1997). EF-G vahendatud GTP hüdrolüüsi abil toimuvad ribosoomi dekodeerivas tsentris konformatsioonilised muutused, mille tagajärjel toimub tRNA-de täielik translatsioon E- ja P-saitidesse ning ribosoomi edasiliikumine mRNA-l (Moazed & Noller, 1989). Translokatsiooni tulemusena on uuel aa-tRNA-l võimalus seonduda uue koodoniga ribosoomi A-saidis.

Translatsiooni lõpetamine ehk terminatsioon algatatakse siis, kui ribosoom jõuab mRNA-l stopp-koodonini. Stopp-koodoneid tunnevad prokarüootides ära terminatsioonifaktorid RF1 ja RF2, selle erinevusega, et RF1 vastab stopp-koodonitele UAG või UAA ning RF2 koodonitele UGA või UAA (Scolnick *et al.*, 1968). Ühe või teise terminatsioonifaktori seondumine põhjustab peptidüül-tRNA peptiidahela ja tRNA vahelise estersideme hüdrolüüsi ning valmis transleeritud valk vabaneb ribosoomist (Caskey *et al.*, 1968). RF1 või RF2 vabastamiseks ribosoomilt on vajalik RF3 vahendatud GTP hüdrolüüs (Freistoffer *et al.*, 1997).

Pärast peptiidahela ja terminatsioonifaktorite lahkumist jääb ribosoomiga seotuks mRNA ning P-saidis asuv deatsetüleeritud tRNA. Selle kompleksi lahutamiseks seondub ribosoomiga esmalt ribosoomi taaskasutusfaktor RRF, mis koosmõjus EF-G poolt vahendatud GTP hüdrolüüsiga eraldab teineteisest suure ja väikse subühiku (Gao *et al.*, 2005). Seejärel seondub väikse subühikuga IF3, mis põhjustab tRNA ja mRNA dissotseerumise (Peske *et al.*, 2005). Lisaks sellele on IF3 oluline uue translatsiooni initsiatsioonil, takistades nii enneaegse 70S partikli moodustumist (Dallas & Noller, 2001) kui ka elongaator aa-tRNA valikut initsiaator-tRNA asemel (Hartz *et al.*, 1989).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida 23S rRNA domeeni 0 heeliksi 72 nukleotiidide funktsiooni *E. coli* ribosoomi biogeneesis ja kasvus, kasutades selleks 23S rRNA suunatud mutageneesi. Püstitati hüpotees, et mutatsioonide tegemine selles regioonis põhjustab ribosoomi biogeneesi defekti ja sellest tulenevat kasvuhälvet, mis viitaks nukleotiidide olulisusele ribosoomide biogeneesis.

Uurimistöö läbi viimiseks konstrueeriti 5 erinevat *E. coli* täispikka *rrnB* operoni kodeerivat plasmidi, mis sisaldavad 23S rRNA heeliksi 72 järjestuses eri positsioonides asendusmutatsioone: G2027A/C2036U, G2027A, C2025A, C2025U/G2038A või A2033U.

2.2. Materjalid

Tabel 1. Töös kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Kirjeldus	Allikas
pBAD- <i>rrnB</i> -wt	pBR322 ori, araBAD promootori kontrolli all olev <i>rrnB</i> operon, Amp ^R	Piir <i>et al.</i> , 2011
pBAD- <i>rrnB</i> -wt-t	pBR322 ori, araBAD promootori kontrolli all olev <i>rrnB</i> operon, mille 23S rRNA heeliksisse 25 on lisatud 70 aluspaari pikkune streptavidiini aptameer, Amp ^R	Piir <i>et al.</i> , 2011

Tabel 2. Töös kasutatud söötmed, puhvid ja lahused.

Lahus	Koostis
2xYT vedelsööde	1,6% trüpton; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl
LB agarsööde	1,5% agar; 1% trüpton; 1% NaCl; 0,5% pärmiekstrakt
10x PCR puhver	750 mM Tris-HCl pH 8,8; 200 mM NH ₂ SO ₄ ; 10 mM tartrasiin; 5% Ficoll; 0,1% Triton X-100
1x TBE	90 mM Tris; 90 mM boorhape; 1 mM EDTA

TEN	100 mM NaCl; 10 mM Tris; 1 mM EDTA
10x LP	600 mM KCl; 600 mM NH ₄ Cl; 120 mM MgOAc; 100 mM Tris-HCl pH 7,5
1x LLP	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 12 mM MgOAc; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM β-merkaptotetanool
5x RT-HB	255 mM K-HEPES pH 7; 450 mM KCl
10x RT-RB	1,3 M Tris-HCl pH 8,5; 100 mM DTT; 100 mM MgCl ₂
RT STOP	75 mM NaOAc; 96% EtOH
FS	80% deioniseeritud formamiid; 10 mM EDTA; 0,25% BPB
ddATP segu	125 mM dCTP; 125 mM dGTP; 125 mM dTTP; 25 mM ddATP
ddGTP segu	125 mM dCTP; 125 mM dATP; 125 mM dTTP; 25 mM ddGTP
10% urea PAAG	1x TBE; 8 M urea; 10% akrüülamiid-bis-akrüülamiid (19:1)

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid.

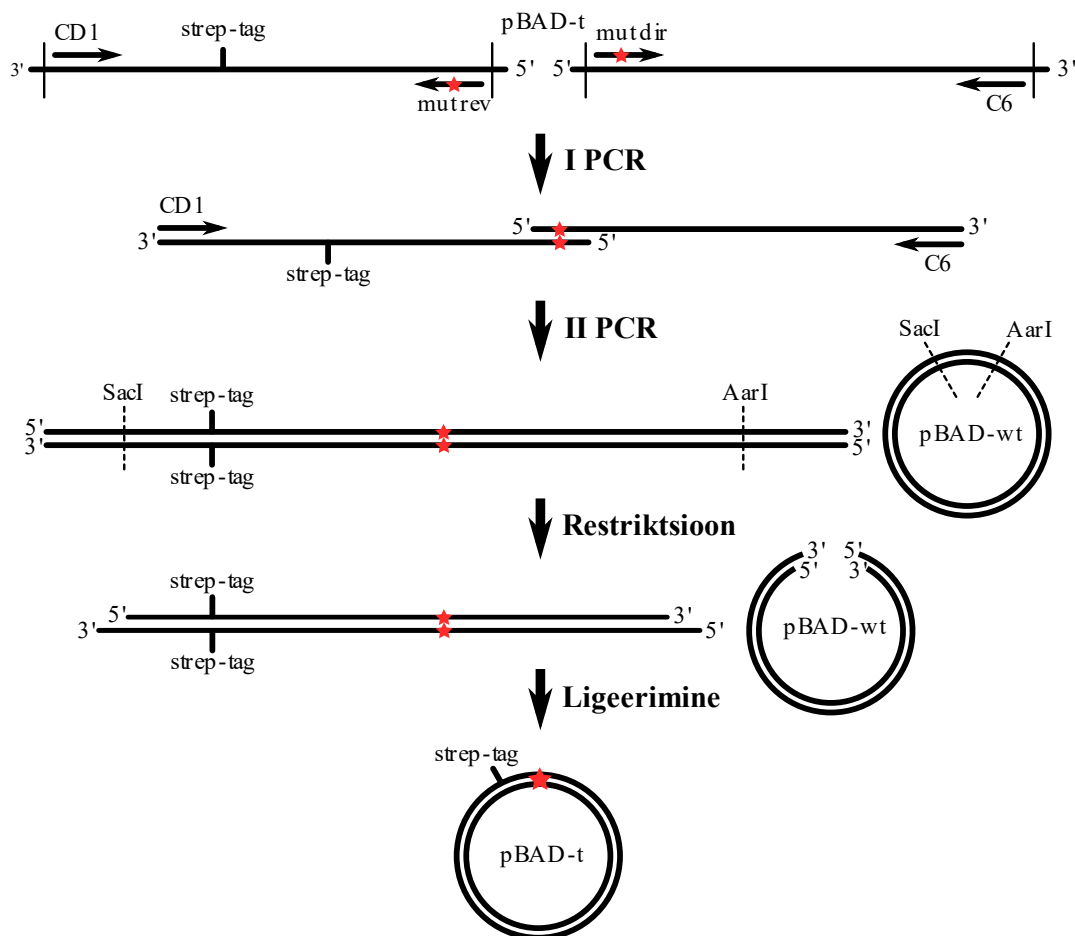
Praimer	5'-3' järjestus
G2027A C2036U dir	CTC AGT GAA ATT GAA CTC GCT ATG AAG ATG TAG TGT ACC CGC GGC AAG ACG G
G2027A C2036U rev	CCG TCT TGC CGC GGG TAC ACT ACA TCT TCA TAG CGA GTT CAA TTT CAC TGA G
G2027A dir	CTC AGT GAA ATT GAA CTC GCT TTG AAG ATG CAG TGT ACC CGC
G2027A rev	GCG GGT ACA CTG CAT CTT CAT AGC GAG TTC ATT TTC ACT GAG
C2025A dir	CTC AGT GAA ATT GAA CTC GAT GTG AAG ATG CAG TGT ACC C

C2025A rev	GGG TAC ACT GCA TCT TCA CAT CGA GTT CAA TTT CAC TGA G
C2025U G2038A dir	CTC AGT GAA ATT GAA CTC GTT GTG AAG ATG CAA TGT ACC CGC GGC AAG ACG G
C2025U G2038A rev	CCG TCT TGC CGC GGG TAC ATT GCA TCT TCA CAA CGA GTT CAA TTT CAC TGA G
A2033U dir	GAA ATT GAA CTC GCT GTG AAG TTG CAG TGT ACC CGC GGC AAG
A2033U rev	CTT GCC GCG GGT ACA CTG CAA CTT CAC AGC GAG TTC AAT TTC
CD1	GAG ATT CCC CCA GTA GCG GCG
C2	GTC GGT TCG GTC CTC CAG
C6	CTT GGG CGG TAT CAG CCT G
C30	CTT CGA TCA AGA GCT TCG CTT G
MPC52	GCG GAA GAT GTA ACG GGG C
Mini tag	CAA AAG GTA CGC AGT CAC ACG C

2.3. Metoodika

2.3.1. 23S rRNA variantide konstrueerimine ja kontrollimine

Mutatsioonide tegemiseks 23S rRNA domeeni 0 kasutati oligonukleotiid-suunatud mutageneesi, mille tulemusel konstrueeriti pBAD-t plasmiidid, mille *rrnB* operoni 23S rRNA sisaldas soovitud mutatsiooni heeliksis 72 ning streptavidiini aptameeri kodeerivat järjestust heeliksis 25 (Joonis 2). Kokku konstrueeriti töö käigus viis erinevat *E. coli* 23S rRNA varianti, mille domeeni 0 heeliksit 72 kodeerivas järjestuses on üks või kaks asendusmutatsiooni: 1) G2027A; 2) G2027A C2036U; 3) C2025A; 4) C2025U G2038A; 5) A2033U.



Joonis 5. Asendusmutatsioonide ja streptavidiini aptameeri järjestuse klonereimine pBAD vektorisse. Esimese PCR käigus amplifitseeriti mutageneesioligonukleotiidide ja CD1 või C6 praimerit kasutades pBAD-t plasmiidis asuvast *rrnB* operonist DNA fragmendid pikkustega ~1900 ja ~400 ap. Teise PCR käigus kasutati esimese PCRprodukte ning samu primereid, et sünteesida täispikk ~2300 ap pikkune lõik. Plasmiid pBAD-wt avati ja teise PCR-i produkti otsiti töödeldi restriktasididega SacI ja AarI. Plasmidi SacI-AarI fragment vahetati ligeerimise teel PCR-i meetodil konstrueeritud fragmendi vastu. Tulemusena saadi pBAD-t plasmiid, mille *rrnB* operonis sisalduvad soovitud mutatsioon ja 70 ap pikkune streptavidiini aptameeri järjestus.

Soovitud mutatsioonide sisse viimiseks pBAD-t vektori *rrnB* operoni 23S rRNA H72 piirkonnas viidi läbi kaks PCR reaktsiooni (Joonis 5). Mõlemad PCR-i reaktsioonid viidi läbi *Mastercycler® nexus* (Eppendorf) termotsükleris tingimustel, mis on toodud Lisas 1.

Esimese PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 50 µl sisaldas 1 U Phusion DNA polümeraasi (*Thermo Fisher Scientific*) tootja poolt ette nähtud puhvril, 3 µl 10 mM dNTP ning 20 pmol kumbagi praimerit. Pikema fragmendi amplifitseerimiseks kasutati CD1 ning mut rev praimereid ning lühema fragmendi amplifitseerimiseks C6 ning mut dir praimereid). Matriitsiks lisati 10 ng pBAD-t plasmiidset DNA-d, mille 23S rRNA-d kodeeriv järjestus sisaldas streptavidiini aptameeri, mis võimaldas hilisemas töös mutatsiooniga ja metsiktüüpi 23S rRNA-del vahet teha.

Teise PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 50 µl sisaldas 1 U Phusion DNA polümeraasi (*Thermo Fisher Scientific*) tootja poolt ette nähtud puhvril, 3 µl 10 mM dNTP ning CD1 ja C6 praimereid kumbagi 20 pmol. Matriitsiks lisati molaarselt võrdses koguses esimese PCR käigus sünteesitud ~1900 ap ja ~400 ap pikkused DNA fragmendid.

Mõlema PCR käigus sünteesitud produktid lahutati 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvril, kuhu oli DNA ultravioletvalguses visualiseerimiseks lisatud etiidiumbromiidi (lõppkontsentratsioon 0,5 µl/ml). DNA fragmentide puhastamiseks agarosgeelist kasutati *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit*-i järgides tootja poolset juhendit. DNA elueeriti 40 µl deioniseeritud vees ning kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetiga lainepikkusel 260 nanomeetrit.

80 ng nii teise PCR käigus tekkinud produkti kui ka pBAD-wt plasmidi restrikteeriti kleepuvate otste tekitamiseks restriктаasidega AarI ja SacI (*Thermo Fisher Scientific*) tootja poolt ette nähtud puhvril. Restriksioon viidi läbi lõppmahus 20 µl ühe tunni jooksul temperatuuril 37 °C. Töödeldud DNA fragmentide identifitseerimiseks lahutati need 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvril ja visualiseeriti ultravioletvalguses etiidiumbromiidi fluorestsentsi kasutades. DNA fragmendid puhastati geelist *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit*-iga järgides tootja poolset juhendit. DNA kontsentratsioonid mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetiga lainepikkusel 260 nanomeetrit.

Restrikteeritud DNA fragmendi ligeerimiseks pBAD-wt plasmiidiga valmistati 20 µl mahus ligeerimissegu, mis sisaldas 5 U T4 faagi ligaasi (*Thermo Fisher Scientific*) tootja poolt ette nähtud puhvril, 1 µl 25 mM heksamiinkoobalt(III)kloriidi, 24 ng DNA fragmenti ja 680 ng

restriktaasidega avatud plasmidi. Ligeerimisreaktsioon toimus 1 tunni vältel temperatuuril 22 °C. 10 µl ligeerimissegule lisati transformeerimiseks 100 µl-le keemiliselt kompetentseteks muudetud TOP10 rakkudele ning rakke hoiti 30 minutit jääl. Sellele järgnes kuumašokk 1 minuti jooksul temperatuuril 42 °C. Rakke hoiti veel 3 minutit jääl, lisati 1 ml 2xYT vedelsöödet ja inkubeeriti termoloksutis temperatuuril 37 °C pööretel 600 rpm 1 tund. Rakud koguti lauatsentrifuugis tsentrifuugimise teel pööretel 3000 rpm 3 minuti vältel. Sööde eemaldati ja rakud resuspendeeriti 200 µl 2xYT söötmes ning plaaditi LB tardsöötmele, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml. Tardsöötme plaate inkubeeriti üleöö temperatuuril 37 °C.

Kloneerimise efektiivsust hinnati koloonia PCR-i meetodil streptavidiini aptameeri olemasolu alusel plasmiidides. Igalt LB tardsöötme plaadilt valiti välja 8 kolooniat. Üksik koloonia suspendeeriti 10 µl deioniseeritud vees ning rakke lüüsi 5 minuti jooksul temperatuuril 95 °C kuumutades. Seejärel lisati lüüsitud rakkudele 15 µl PCR reaktsioonisegu, mis sisaldas 2,5 µl 10x PCR puhvrit, 2 µl 25 mM Mg₂Cl, 0,5 µl 10 mM dNTP, 2,5 U Taq DNA polümeraasi, 30 pmol C2 praimerit ning 30 pmol CD1 praimerit. Koloonia PCR-i tingimused on toodud Lisas 2. Streptavidiini aptameeri olemasolu hinnati DNA fragmentide pikkuste järgi 1,7% agarosgeelelektrofooresil.

Streptavidiini aptameeri suhtes positiivsed kolooniad inokuleeriti 2 ml 2xYT söötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Bakterirakke kasvatati loksutis üleöö temperatuuril 37 °C. Üleöökultuurist plasmidse DNA puhastamiseks kasutati *FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-i järges tootja poolset juhendit ning elueeriti 100 µl deioniseeritud vees. DNA kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nanomeetrit.

Konstrueeritud ja puhastatud plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks viidi läbi restriksioonianalüüs. Reaktsioonisegu lõppmahuga 20 µl sisaldas 1,5 µg plasmidset DNA-d (või pBAD-wt-t kontrollplasmidi) ning restriктаasi *AvaI* (*Thermo Fisher Scientific*) tootja poolt ette nähtud puhvris. Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37 °C 60 min jooksul. Konstrueeritud plasmiidide restriksioonifragmente võrreldi kontrollplasmidi restriksioonifragmentidega 1% agarosgeelelektrofooresil.

Korrektse restriksioonimustriga plasmiidide *AraI* ja *SacI* restriksioonisaitide vaheline ala kontrolliti sekveneerimise teel praimeritega CD1, C6, MPC52 ja C30.

2.3.2. Bakteritüvede kasvukõverate mõõtmine

Konstrueeritud bakteritüvede kasvukiiruse hindamiseks transformeeriti konstrueeritud plasmiidid ja pBAD-wt-t kontrollplasmiid *heat shock* meetodil keemiliselt kompetentseks muudetud TOP10 rakkudesse ning plaaditi 200 µg/ml ampitsilliini sisaldavale LB agarsöötmele. LB tasse inkubeeriti temperatuuril 37 °C üleöö. Seejärel inokuleeriti tassilt üksik koloonia kolmes korduses 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, kuhu lisati ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Rakke kasvatati termoloksutis temperatuuril 37 °C üleöö. Seejärel viidi 100 µl üleöö kasvanud kultuuri üle värskesse 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (ampitsilliini lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) ning kasvatati termoloksutis temperatuuril 37 °C 1,5 tundi.

Kultuuridest tehti lahjendused mahus 1 ml nii, et lõplik optiline tihedus 600 nm juures oleks 0,02. Seejärel jaotati proovid kaheks osaks (2x 500 µl), millest ühte lisati plasmiidilt 23S rRNA variandi ekspressiooni käivitamiseks 20% L-arabinoosi (lõppkontsentratsioon 0,2%) ja teise mitte.

Kasvukõverate mõõtmiseks pipeteeriti 150 µl indutseeritud ja indutseerimata proovi kolmes korduses 96-kaevulisele mikrotiiterplaadile, kust mõõdeti *POLARstar Omega (BMG Labtech)* mikrotiiterplaadi lugejaga proovide optilist tihedust 580 nm juures iga 7 minuti tagant ~12 tunni jooksul. Bakteritüvede generatsiooniajad arvutati logaritmilises kasvufaasis mõõdetud optiliste tiheduste järgi (Valem 1).

$$g = \frac{\log(2) \times t}{\log(OD_2) - \log(OD_1)}$$

Valem 1. g – generatsiooniaeg, OD₁ – kultuuri eksponentsiaalse kasvufaasi algtihedus, OD₂ – kultuuri eksponentsiaalse kasvufaasi lõpptihedus, t – OD₁ ja OD₂ mõõtmiste vaheline aeg.

2.3.3. Bakteritüvede kasvatamine ja lüüs

Kolooniad inokuleeriti LB tassilt 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (Amp lõppknts. 100 µg/ml) ning kasvatati üleöö termoloksutis temperatuuril 37 °C. Üleööökultuurist 100 µl lisati värskesse 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (Amp lõppknts. 100 µg/ml) ning kasvatati 1,5 tundi. Seejärel tehti kultuurist Erlenmeyeri kolbi 50x lahjendus ning lisati ampitsilliin (lõppknts. 100 µg/ml). Plasmidi konstrueeritud 23S rRNA variante sisaldava rRNA ekspressioon indutseeriti OD_{600nm} jõudmisel 0,1-ni L-arabinoosiga (lõppkontsentratsioon 0,2%) 3 tundi.

Rakud koguti tsentrifuugimise teel *Sorvall RC5B PLUS* tsentrifuugis *Sorvall GSA* rootoris 5000 rpm juures temperatuuril 4 °C 10 minuti vältel. Kogutud rakud resuspendeeriti 1 ml jääkülmas

lүүsilahjenduspuhveris (1x LLP), millele lisati DNAas I (lõppkontsentratsioon 50 U/ml). Rakud homogeniseeriti *Bertin Brecellys 24* homogeniseerijas 0,1 mm läbimõõduga klaaskuulidega tootja poolt ette nähtud programmiga. Lüsaaði klaarimiseks tsentrifugeeriti proove *Biofuge fresco* lauatsentrifuugis 15 minuti jooksul pöõretel 13000 rpm temperatuuril 4 °C. Klaaritud lüsaaði kanti üle uude tuubi ning mõõdeti selle nukleiinhappe sisaldus 260 nm lainepikkusel kasutades *NanoDrop* spektrofotomeetrit.

2.3.4. Ribosoomi partiklite lahutamine

Ribosoomi partiklite profiilide analüüsiks formeeriti *Beckman Coulter SW28* rootori tuubidesse 15% → 40% sahharoosigradiendid (1x LLP), millele kanti ~70 ühikut (A₂₆₀) rakulüsaaði. Ribosomaalsed partiklid lahutati sahharoosi gradiendis ultratsentrifuugimise teel *Beckman Coulter L90K* ultratsentrifuugis SW28 rootoriga kiirusel 19 000 rpm 19 tunni vältel ($w^2t = 2,8 \times 10^{11}$ rad/s) temperatuuril 4 °C. Ribosoomi partiklite profiili visualiseerimiseks kasutati läbivooluspektrofotomeetrit *Monitor UVis-920 (GE Healthcare)*, mis mõõtis kapillaarist läbi liikuva proovi nukleiinhappe sisaldust 260 nm lainepikkuse juures, ning isekirjutajat *Recorder REC 112 (GE Healthcare)*. Lisaks koguti edasiseks analüüsiks sahharoosigradiendist polüsoomide, 70S partiklite ning 50S partiklite fraktsioonid.

Joonistunud ribosoomi gradiendiprofiilide analüüsiks teostati kvantiseerimine, mille käigus leiti polüsoomide, 70S, 50S ja 30S fraktsioonides leiduvate partiklite kogus profiili joonealuse pindala arvutamise teel programmiga *ImageJ*. Saadud pindaladest arvutati ribosomaalsete partiklite koguste omavahelised suhtarvud programmiga *MS Excel*. 23S rRNA variantide ribosomaalsete partiklite omavahelisi suhtarve võrreldi metsiktüüpi 23S rRNA-d ekspresseeriva tüve suhtarvudega. Tulemustele teostati statistiline analüüs kasutades Studenti t-testi.

2.3.5. Ribosomaalse RNA sadestamine ja puhastamine

RNA-valk kompleksi sadestamiseks lisati sahharoosigradiendist kogutud fraktsioonidele 2,5 mahtu 96% etanooli ja sadestati üleöö temperatuuril -20 °C. Seejärel tsentrifugeeriti fraktsioone *Rotina 420R* tsentrifuugis pöõretel 4000 rpm 30 minuti jooksul temperatuuril 4 °C. Ribosoomi partiklite sademelt eemaldati etanool ning sadet kuivatati temperatuuril 37 °C 15 minutit. Sade resuspendeeriti 200 µl TEN puhveris ning lahuse nukleiinhappe sisaldus mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetriga 260 nm lainepikkusel.

Ribosomaalse RNA puhastamiseks RNA-valk kompleksist kasutati kahte erinevat meetodit: räniga töötlust ning fenool-kloroform töötlust.

Ribosomaalse RNA töötlemiseks räniga viidi ~3 optilist ühikut (A260) RNA-d sisaldava lahuse maht deioniseeritud veega 200 µl-ni. Seejärel lisati lahusele 800 µl PM (*Qiagen*) puhvrit ning segati 20 minuti jooksul väristajal pöoretel 2000 rpm temperatuuril 22 °C. Ribosomaalse RNA sidumiseks lisati 20 µl 50% räni sisaldavat lahust ning segati uuesti 10 minutit. Räni sadestamiseks tsentrifugiti lahust lauatsentrifuugis pöoretel 13 000 rpm temperatuuril 4 °C 30 sekundi jooksul. Sadet pesti kaks korda 1 ml 70% etanooliga ning kuivatati temperatuuril 37 °C 10 minutit. Ribosomaalse RNA elueerimiseks 40 µl deioniseeritud vees inkubeeriti proove temperatuuril 37 °C 3 minutit. Seejärel viidi vesilahus uude reaktsioonituubi ning ribosomaalse RNA kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

Fenool-kloroform töötlusel viidi ~3 optilist ühikut (A260) RNA-d sisaldavate proovide ruumala TEN puhvriga 400 µl-ni ning lisati SDS (lõppkontsentratsioon 0,5%) ja 400 µl fenooli. Järgnes proovide segamine Vortex-il 3 minuti jooksul ning tsentrifugimine lauatsentrifuugis pöoretel 13 000 rpm 3 minuti jooksul. Vesifaas viidi üle uude reaktsioonituubi ning alles jäänud fenoolifaasile lisati 100 µl deioniseeritud vett, järgnes uuesti segamine Vortex-il 3 minuti jooksul ning tsentrifugimine lauatsentrifuugis pöoretel 13 000 rpm 3 minutit. Seejärel tõsteti vesifaasid kokku ning fenooltöötlust korrati veel kaks korda. Vesilahusele lisati fenooli eemaldamiseks võrdne maht kloroformi, millele järgnes segamine Vortex-il 3 minuti jooksul ning tsentrifugimine lauatsentrifuugis 13 000 rpm 3 minuti jooksul. Seejärel kanti vesifaas uude reaktsioonituubi ning kloroformtöötlust korrati veel üks kord.

Pärast RNA puhastamist lisati rRNA-d sisaldavale lahusele 2 mahtu 96% etanooli ning sadestati üleöö temperatuuril -20 °C. Järgmisel päeval tsentrifugiti proove lauatsentrifuugis 13 000 rpm temperatuuril 4 °C 20 minutit. Seejärel eemaldati sademelt etanool ning sadet kuivatati temperatuuril 37 °C 10 minutit. Sade resuspendeeriti 20 µl deioniseeritud vees ning lahuses sisalduva RNA kogus mõõdeti spektrofotomeetriliselt 260 nm lainepikkusel.

2.3.6. Minisekveneerimine

Ribosoomide segapopulatsioonist streptavidiini aptameeri sisaldavate 23S rRNA variantide osakaalu määramiseks teostati 5'-FAM-iga märgistatud Mini tag praimeriga minisekveneerimise reaktsioon.

Esmalt valmistati hübriidsatsioonisegu, mis sisaldas 1 pmol RNA-d, 2 µl 5x hübriidsatsioonipuhvrit (RT-HB) ja 1 pmol 5'-FAM-iga märgistatud Mini tag praimerit. Reaktsioonisegu maht viidi deioniseeritud veega 10 µl-ni. Seejärel kuumutati reaktsioonisegu RNA denatureerimiseks temperatuurini 90 °C ja jahutati praimerit seondumiseks aeglaselt temperatuurini 37 °C ning tõsteti jääle. Seejärel jagati reaktsioonisegu kaheks. Mõlemale reaktsioonisegu osale lisati 1 µl 10x revertaasi reaktsioonipuhvrit (RT-RB) ja 1 U revertaasi ning maht viidi deioniseeritud veega 9 µl-ni. Ühele reaktsioonisegule lisati 1 µl ddA segu, teisele 1 µl ddG segu. Pöördtranskriptsiooni toimumiseks inkubeeriti reaktsioonisegusid 30 minutit temperatuuril 42 °C. Reaktsiooni peatamiseks lisati segudele 120 µl revertaasi STOP lahust ning segati. Nukleiinhapet sadestati üleöö temperatuuril -20 °C ja järgmisel päeval 30 minutit lauatsentrifuugis pöõretel 13 000 rpm temperatuuril 4 °C. Vedelik eemaldati sademelt ning sadet kuivatati 10 minutit temperatuuril 37 °C. Sadenenud RNA lahustati 10 µl formamiid STOP-is (FS) ja säilitati temperatuuril -20 °C.

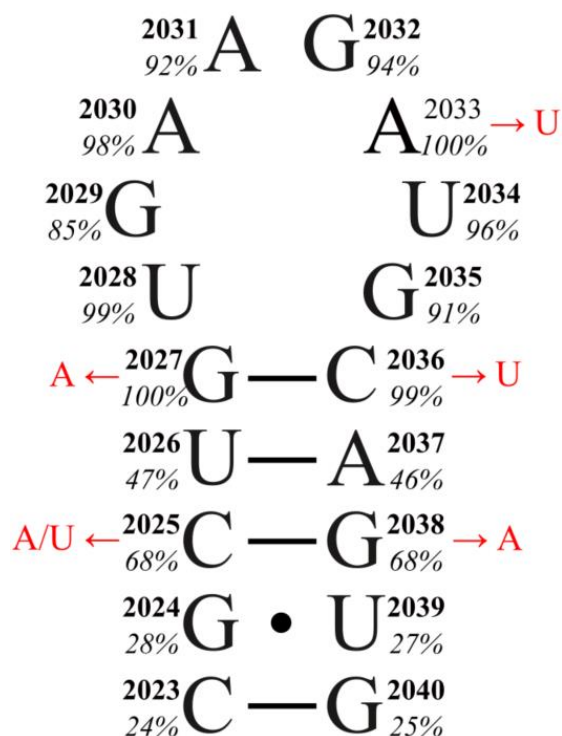
Enne geelelektroforeesi teostamist kuumutati proovid denatureerimiseks temperatuurini 90 °C. Minisekveneerimise käigus sünteesitud DNA ahelad lahutati elektroforeesil ureat sisaldavas 10% poliakrüülamiidgeelis (PAAG) pingel 2200 V. DNA fragmendid visualiseeriti *Amersham*TM *Typhoon*TM fosfokuvajas ja analüüsiti programmiga *ImageQuant*TM.

2.4. Tulemused

2.4.1. 23S rRNA variantide konstrueerimine ja kontrollimine

Käesoleva töö eesmärk oli teada saada, kuidas mõjutavad 23S rRNA domeeni 0 heeliksi 72 nukleotiidid *Escherichia coli* kasvu ja ribosoomide biogeneesi. Selleks konstrueeriti pBAD plasmiidis sisalduvasse *rrnB* operoni suunatud mutageneesi abil (Joonis 5) erinevad 23S rRNA variandid: G2027A, G2027A C2036U, C2025A, C2025U G2038A ja A2033U (Joonis 6). Peale asendusmutatsioonidele heeliks 72 sisaldasid konstrueeritud 23S rRNA variandid heeliksis 25 streptavidiini aptameeri (Leonov *et al.*, 2003; Piir *et al.*, 2011), mis oli edaspidises töös vajalik selleks, et hinnata kloneerimise efektiivsust ja 23S rRNA varianti sisaldavate ribosoomide osakaalu ribosoomide segapopulatsioonis.

Streptavidiini aptameeri järjestuse olemasolu plasmiidides kontrolliti koloonia PCR abil. Plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks teostati restriksioonianalüüs ning *AraI* ja *SacI* restriksioonisensüümide abil kloneeritud plasmidi piirkond kontrolliti sekveneerimise teel. Konstruktide puhastamine ja kontrollimine on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.3.1.

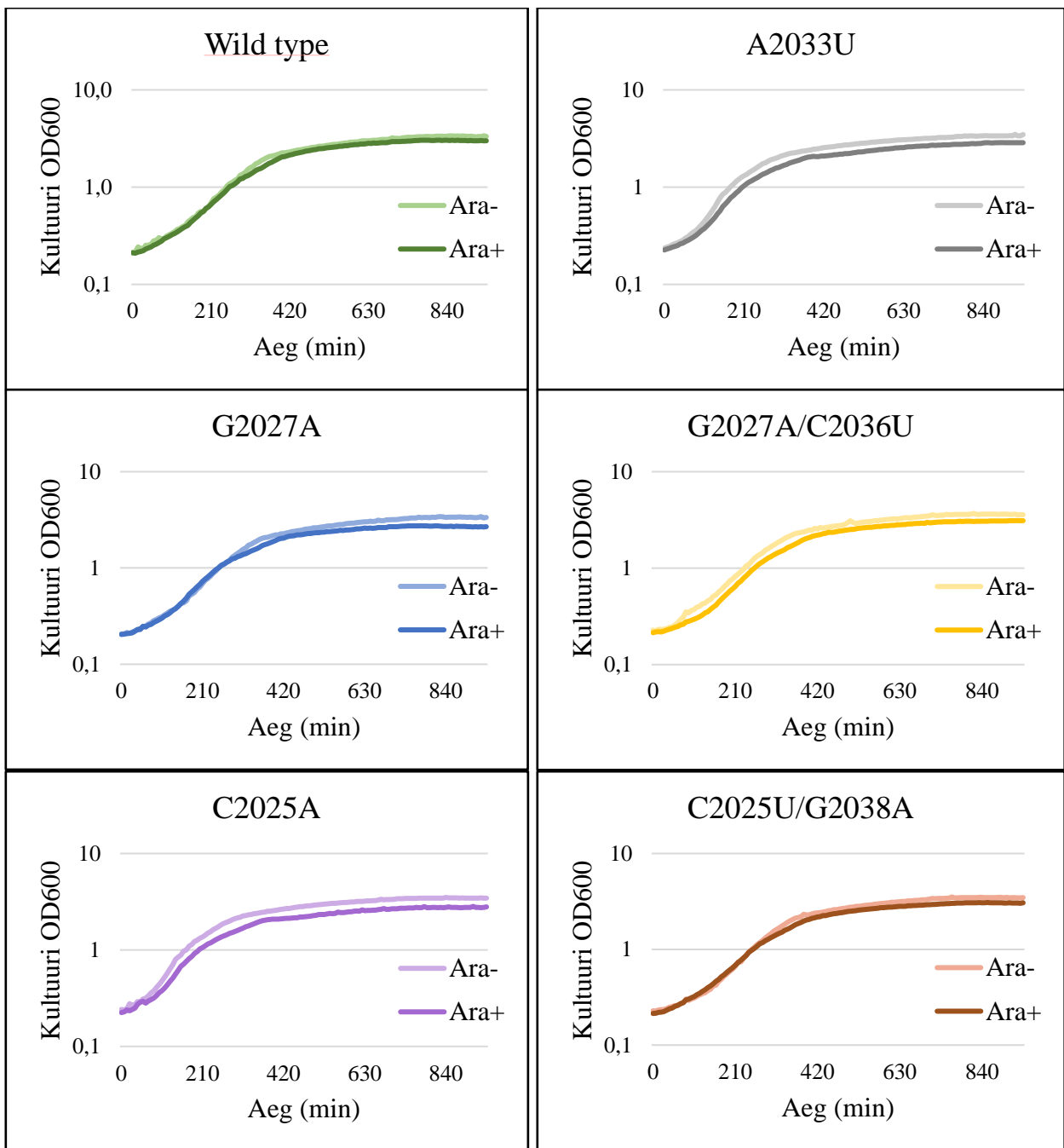


Joonis 6. 23S rRNA domeeni 0 heeliksi 72 sekundaarstruktuur. Nukleotiidide konserveeruvus bakterite seas (*23S RRNA Model: Single Base Frequency – CRW2: Comparative RNA Web-2*, i.a.) on märgitud protsentarvuna. Punases kirjas on näidatud asendused, mis selle töö raames tehti.

2.4.2. 23S rRNA variantide ekspressiooni mõju rakkude kasvule

Konstrueeritud H72 variatsioonide ekspresseerimise mõju uurimiseks *E. coli* kasvukiirusele transformeeriti konstrueeritud plasmiidid keemiliselt kompetentseks muudetud *E. coli* TOP10 rakkudesse. Plasmiidilt 23S rRNA variandi ekspressioon käivitati L-arabinoosi lisamisega söötmesse. Kontrollidena kasutati rakukultuuri, millele L-arabinoosi ei lisatud. Rakkude kasvukiiruse hindamine täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.3.2.

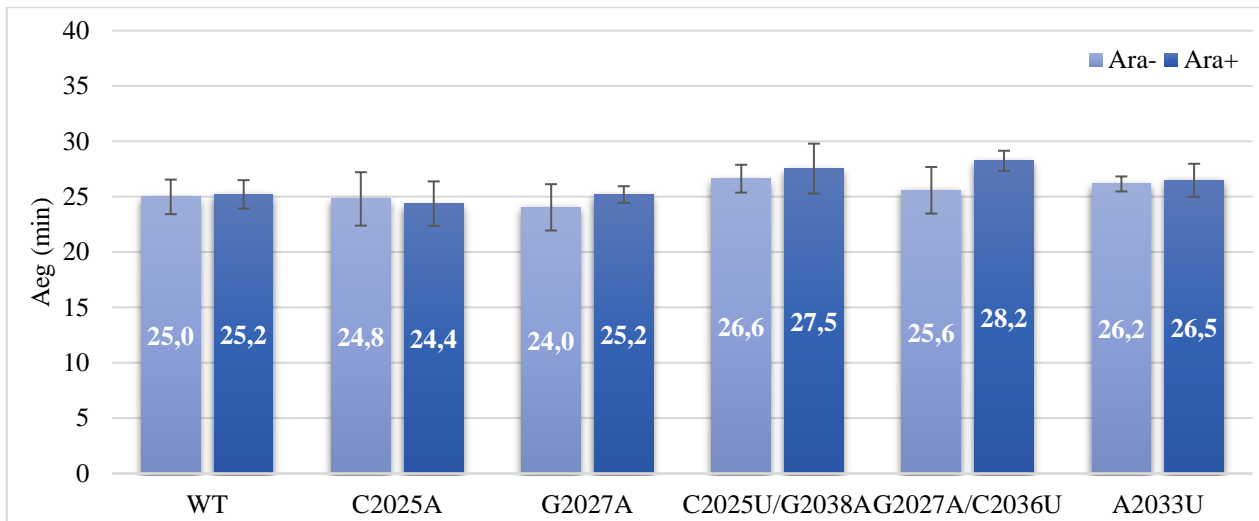
Bakterikultuuride optilise tiheduse muutust ajas mõõdeti mikrotiiterplaadil 2xYT vedelsöötmes temperatuuril 37 °C. Joonisel 7 on näidatud erinevaid variante (sealhulgas ka streptavidiini aptameeriga metsiktüüpi 23S rRNA varianti) ekspresseerivate rakkude ja neile vastavate indutseerimata rakkude kasvukõverad 12 tunni jooksul. Jooniselt on näha, et kõikide tüvede statsionaarse faasi platoo on indutseerimata variandiga võrreldes veidi madalam, mis on põhjustatud sellest, et plasmidi ekspressioon nõuab rakkudes paratamatult lisaenergiat, väljendudes madalama biomassi tootmise võimekusena. Seega kasvukõveratest saadud andmed ei näita, et 23S rRNA variantide ekspresseerimine põhjustaks bakteritüvede märkimisväärset kasvudefekti.



Joonis 7. 23S rRNA variante ekspresseerivate bakterirakkude kasv temperatuuril 37 °C 2xYT söötmes. Graafikute vertikaalteljed kujutavad kultuuri optilist tihedus 600 nm juures logaritmisel skaalas ning horisontaalteljed aega minutites. Igal graafikul on kujutatud 23S rRNA varianti ekspresseeriva kultuuri (Ara+) optilise tiheduse muutus ajas võrreldes indutseerimata kasvusega (Ara-). Joonisel on esitatud ühe katse andmed, katset on korratud vähemalt 3 korda.

Bakterirakkude eksponentsiaalse kasvufaasi optilise tiheduse mõõtmiste põhjal arvutati Valemi 1 järgi tüvede generatsiooniajad. Joonisel 8 on toodud kõikide analüüsitud 23S rRNA variante

ekspresserivate tüvede ja neile vastavate indutseerimata kasvatuste kolme katse keskmine generatsiooniaeg. Tulemustest on näha, et 23S rRNA varianti ekspresserivate tüvede (Ara+) kasvukiirus ei erine oluliselt nende tüvede kasvukiirusest, milles ei ole ekspressioon indutseeritud (Ara-). Ühegi 23S rRNA varianti ekspressioon ei oma generatsiooniaegade andmete alusel *E. coli* kasvule statistiliselt olulist efekti (Joonis 8).



Joonis 8. 23S rRNA variante ekspresserivate bakterirakkude keskmised generatsiooniajad temperatuuril 37 °C 2xYT söötmes. Generatsiooniajad arvutati kultuuride eksponentsiaalse kasvufaasi OD₆₀₀ mõõtmiste põhjal Valemit 1 kasutades. Tulpdiaagrammil on toodud 23S rRNA variante ekspresserivate kultuuride (Ara+) ja vastavate indutseerimata rakukultuuride (Ara-) kolme katse keskmised generatsiooniajad koos 90% usaldusintervallidega. Diagrammi vertikaalteljel on aeg minutites. Tulemustele tehti ka statistiline test, mis ei näita, et tulemused oleks statistiliselt oluliselt erinevad.

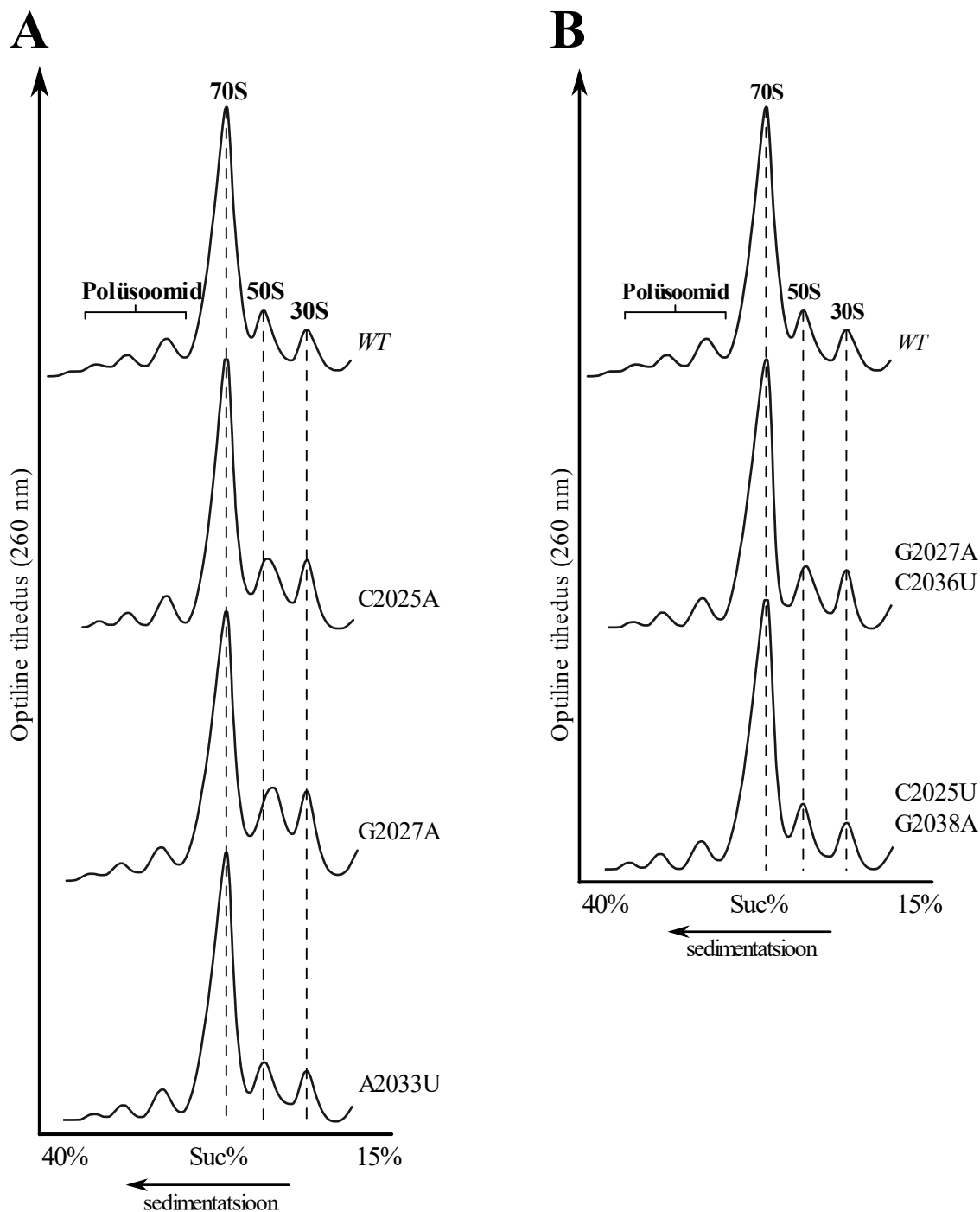
2.4.3. 23S rRNA variantide ekspressiooni mõju ribosoomi profiilidele

23S rRNA heeliksi 72 variatsioonide ekspresseerimise mõju uurimiseks *E. coli* ribosoomi 70S partikli *in vivo* kokkupanekule indutseeriti TOP10 rakkudes 23S rRNA variantide ekspressioon L-arabinoosi lisamisega kasvukeskkonda. Kontrollina kasutati streptavidiini aptameeri sisaldav metsiktüüpi 23S rRNA varianti ekspresseerivat kultuuri. Kolm tundi pärast induktsiooni koguti ja lüüsi bakterirakud vastavalt peatükis 2.3.3. kirjeldatule. Ribosomaalsed partiklid lahutati 15% → 40% sahharoosigradiendis ultratsentrifuugimise teel vastavalt peatükis 2.3.4. kirjeldatule.

Töö käigus katkestati C2025-G2038 või G2027-C2036 aluspaardumised vastavalt asendustega C2025A ja G2027A (Joonis 6). Jooniselt 9A on 23S rRNA variantide C2025A ja G2027A gradiendiprofiilidest selgelt näha, et võrreldes pBAD-wt-t plasmidi ekspresseeriva kontrolltüve

gradiendiprofiiliga on nende 50S partiklite piik ümardunud ning nihkunud 30S partiklite piigi suunas, mis vihjab ribosoomi biogeneesi defektile. Katkestatud 2025-2038 ja 2027-2036 aluspaardumised aga kompenseeriti bakterite seas mittekonserveerunud aluspaardumistega (topeltasendused C2025U/G2038A ja G2027A/C2036U; Joonis 6), et analüüsida nende aluspaardumiste olulisust. Jooniselt 9B on näha, et aluspaardumise taastamine nendes positsioonides kompenseerib kas täielikult või osaliselt katkestatud aluspaardumisega 23S rRNA variantide poolt põhjustatud biogeneesi defekti, kuna on näha, et 50S piigid asuvad gradiendiprofiilil kontrolliga samas kohas. A2033U 23S rRNA variandi gradiendiprofiil (Joonis 9A) on aga metsiktüüpi 23S rRNA variandile kõige sarnasem ning see variant ribosoomide biogeneesi defekti kaasa ei too.

23S rRNA variante ekspresseerivate tüvede ribosoomi partiklite omavaheliste suhete hindamiseks mõõdeti gradiendiprofiilidel polüsoomide, 70S, 50S ja 30S fraktsioonide joonealused pindalad ning arvutati nende partiklite omavahelised suhtarvud pindalade põhjal. Saadud suhtarve võrreldi metsiktüüpi 23S rRNA varianti ekspresseeriva tüve suhtarvudega. Variantide kolme katse keskmised suhtarvud on toodud Tabelis 4. Tulemustest selgub, et C2025A ja G2027A 23S rRNA varianti ekspresseerivate bakteritüvede 70S partiklite ning 50S alaühikute vaheline suhe on väiksem kui kontrolltüvel, mis viitab vabade, translatsioonis mitte osalevate 50S alaühikute arvu suurenemisele. Muutumatu 50S ja 30S alaühikute vaheline suhe näitab, et vabad 50S ja 30S partiklid kuhjuvad võrdsel määral ning viitab 50S ja 30S alaühikute assortseerumise defektile. Muutumatu 70S ja polüsoomide suhe viitab, et translatsiooni elongatsiooni analüüsitud 23S rRNA variandid ei häiri.



Joonis 9. 23S rRNA variante ekspresseerivate bakterirakkude ribosoomi partiklite jaotus sahharoosigradiendis. Graafiku horisontaaltelg representeerib sahharoosi kontsentratsiooni gradienti, milles toimuv partiklite sedimentatsiooni suund on joonistel näidatud. Graafiku vertikaalteljel on neelduvus lainepikkusel 260 nm. Kriipsjoontega on märgitud metsiktüüpi 23S rRNA-d ekspresseeriva kontrolltüve profiili 70S, 50S ja 30S partiklite piikide asukohad. Joonisel on esitatud ühe katse tulemused, katset on korratud vähemalt 3 korda. **(A)** C2025A, G2027A ja A2033U 23S rRNA variante ekspresseerivate tüvede profiilid võrreldes metsiktüüpi varianti ekspresseeriva tüve profiiliga. **(B)** G2027A/C2036U ja C2025U/G2038A variante ekspresseerivate tüvede profiilid võrreldes metsiktüüpi varianti ekspresseeriva tüve profiiliga.

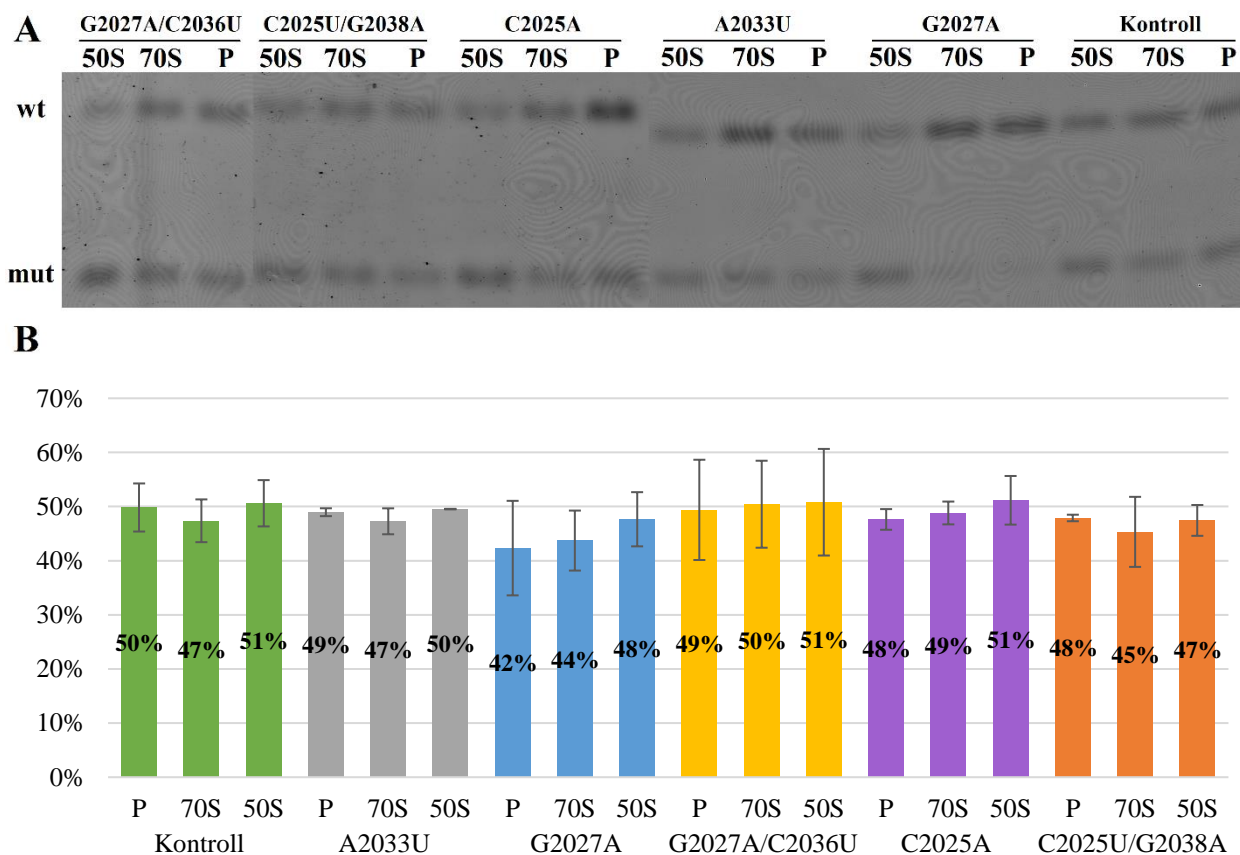
Tabel 4. 23S rRNA variante ekspresseerivate bakteritüvede ribosomaalsete partiklite koguste suhtarvud (kolme katse keskmised). Suhted on arvatud gradiendiprofiilide joonealuste pindalade läbijagamise teel. Sulgudes on keskmistele arvatud 90% usaldusintervallid. Noolekesed näitavad tulemuse muutust võrreldes metsiktüüpi (WT) variandiga ning tärnid tähistavad tulemuse statistilist olulisust (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$), mis on arvatud ühepoolset Studenti t-testi kasutades.

Ekspressseeruv variant	70S / 50S	50S / 30S	70S / P
WT	3,8 ($\pm 0,1$)	1,3 ($\pm 0,3$)	2,9 ($\pm 1,4$)
C2025A	3,2 ($\pm 0,5$) ↓ *	1,3 ($\pm 0,1$)	2,7 ($\pm 1,1$)
C2025U/G2038A	4,1 ($\pm 0,6$)	1,2 ($\pm 0,1$)	2,2 ($\pm 0,4$)
G2027A	2,7 ($\pm 0,4$) ↓ **	1,2 ($\pm 0,2$)	2,9 ($\pm 1,3$)
G2027A/C2036U	3,9 ($\pm 0,7$)	1,2 ($\pm 0,1$)	2,2 ($\pm 0,8$)
A2033U	3,7 ($\pm 0,8$)	1,3 ($\pm 0,2$)	2,4 ($\pm 1,0$)

2.4.3. 23S rRNA variantide osakaal ribosomaalsetes partiklites

Selleks, et näha, kui suurel hulgal võrreldes metsiktüüpi 23S rRNA-ga lülitatakse analüüsitud 23S rRNA variante ribosomaalsetesse partiklitesse, koguti ribosoomi partiklite ultratsentrifuugimise järel ribosoomi partiklite fraktsioonid (polüsoomid, 70S, 50S ja 30S) vastavalt peatükis 2.3.5 kirjeldatule ning fraktsioonidest puhastatud rRNA-s määrati metsiktüüpi ja 23S rRNA variantide osakaal minisekveneerimise meetodil, mida on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.3.6. Minisekveneerimise käigus sünteesitud DNA fragmendid lahutati 10% polüakrüülamiidgeelil ning geelis olevate DNA fragmentide külge seotud 5-FAM fluorofoor ergastati, misjärel sai fluorestseeruva valguse signaal pildile jäädvustada. Jooniselt 10A on näha, et G2027A ja C2025A 23S rRNA variantide osakaal võrreldes metsiktüüpi 23S rRNA-ga on 70S ja polüsoomide fraktsioonis langenud. See näitab, et 23S rRNA variante lülitatakse transleerivatesse ribosoomidesse vähem. Aluspaardumise taastamine nendes positsioonides aga parandab olukorda ning on näha, et nende puhul lülitatakse 23S rRNA varianti nii 50S partiklitesse kui transleerivatesse ribosoomidesse võrreldaval hulgal. Selle tulemusega kooskõlas on ka ribosoomi partiklite gradiendiprofiilidest saadud tulemused, kus on näha, et biogeneesi defekt on võrreldes aluspaardumise katkestatud 23S rRNA variantidega leevenenud. A2033U 23S rRNA variandi

puhul on 23S rRNA variantide jaotumises näha metsiktüübiga sarnast pilti, kus kõikidesse fraktsioonidesse on 23S rRNA varianti lülitatud võrdsel määral.



Joonis 10. Plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA variantide osakaal polüsoomi, 70S ja 50S ribosoomi fraktsioonides. (A) Minisekveneerimise käigus sünteesitud fluorestseeruva märgisega DNA fragmendid lahutatuna 10% polüakrüülamiidgeelil. Reas, mis on märgistatud tähisega „wt“, asuvad fragmendid, mille sünteesimisel on revertaas seiskunud metsiktüüpi 23S rRNA järjestusel. Reas, mis on märgistatud tähisega „mut“, asuvad fragmendid, mille sünteesimisel on revertaas seiskunud streptavidiini aptameeri sisaldaval 23S rRNA järjestusel. (B) Minisekveneerimisel sünteesitud DNA fragmentide fluorestsentsvalguse signaalist jäädvustatud pildi kvantiseerimisel programmiga *ImageQuant* saadud tulemused. Diagrammil on kujutatud 2-4 katse keskmised tulemused. Katset on korratud 2-4 korda.

2.5. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab kõrgelt konserveerunud aluste muutmine 23S rRNA domeenis 0 heeliksis 72 *E. coli* kasvu ja ribosoomide biogeneesi.

Töö tulemustest selgub, et ühegi 23S rRNA variandi ekspressioon ei põhjusta bakterirakkudes märgatavat kasvudefekti (Joonis 7). Kuna tegemist oli ribosoomide segapopulatsiooniga, kus translatsiooni said panustada nii metsiktüüpi 50S alaühikud kui ka konstrueeritud 23S rRNA varianti sisaldavad 50S alaühikud, saab tulemusi tõlgendada mitmeti. Üks võimalus on, et konstrueeritud 23S rRNA varianti sisaldavad ribosoomid transleerivad sama hästi kui metsiktüüpi ribosoomid. Teine võimalus on, et konstrueeritud 23S rRNA variandid ei jõuagi kunagi translatsiooni ning need lagundatakse varakult või on metsiktüüpi ribosoomide kasutamine translatsioonil tugevasti eelistatud.

Ribosoomi profiilide analüüsist selgub, et A2033U variandi ekspresseerimine ei põhjusta ribosoomi partiklite profiilis metsiktüübist erinevat fenotüüpi. Samas on märgata, et G2027A või C2025A 23S rRNA variantide ekspressioon põhjustab bakterirakkude ribosoomi profiilides nähtavaid muutuseid 50S partiklite piigis, täpsemalt selle ümardumist ning nihkumist 30S partiklite piigi poole (Joonis 9A). See näitab, et korrektsete metsiktüüpi 50S partiklite lähedale sedimenteeruvaid veidi madalama sedimentatsioonikoefitsiendiga partiklid, viidates ribosomaalse 50S alaühiku biogeneesi defektile. Selliste valessti assambleerunud 50S subühikute saatus raku võib olla erinev. Märgatav ribosoomi biogeneesi defekt ribosoomi gradiendiprofiilides ei välista võimalusi, et 23S rRNA varianti sisaldavate 50S partiklite biogenees on võrreldes metsiktüüpi 50S partiklite biogeneesiga lihtsalt natuke aeglasem, kuid lõpptulemusena valmivad ribosoomid, mis on võimelised töötama sama hästi kui metsiktüüpi ribosoomid. Samas on ka võimalus, et valessti assambleeruvad subühikud degradeeritakse ning translatsiooni panustavad vaid korrektselt assambleerunud metsiktüüpi ribosoomid. Mõlemad juhud selgitaks seda, miks 23S rRNA variantide ekspressioon ei põhjusta muutust ei kasvukõverates ega generatsiooniaegades. Kuna aga 50S ja 30S partiklite suhe on jäänud samaks, siis ei ole alust arvata, et toimuks selektiivne 50S alaühikute degradatsioon.

Selleks, et teada saada, kui suur hulk ekspresseerunud 23S rRNA variante translatsiooniprotsessi lülitatakse, hinnati variantide jaotust minisekveneerimise meetodil (Joonis 10). Tulemustest selgus, et kõiki 23S rRNA variante lülitatakse 70S partiklitesse ja polüsoomidesse metsiktüübiga

võrreldaval hulgal, mis viitab, et analüüsitud 23S rRNA variante kandvad 50S alaühikud assotseeruvad 30S alaühikutega sama hästi kui metsiktüüpi 50S alaühikud. Tuleb aga märkida, et minisekveneerimise tulemusel sünteesitud DNA fragmentide visuaalsel hindamisel on näha, et C2025A ja G2027A variatsiooniga 23S rRNA-sid lülitatakse 70S ribosoomidesse ja polüsoomidesse oluliselt vähem kui 50S alaühikutesse, mis näitab, et need variandid on transleerivatesse ribosoomidesse lülitamisel negatiivse selektsiooni all. Seda toetavad ka ribosoomi partiklite gradiendiprofiilide analüüsil saadud tulemused, kus on näha, et G2027A ja C2025A 23S rRNA variantide ekspresseerimine põhjustab 50S ja 30S partiklite kuhjumist. Seega saab spekuloida, et neid 23S rRNA variante sisaldavad 50S partiklid assotseeruvad 30S partiklitega halvemini ning transleerivatesse ribosoomidesse on eelistatud metsiktüüpi 50S partiklite assambleerimine.

G2027A ja C2025A asenduste tegemisel 23S rRNA-sse oli tegu sisuliselt aluspaardumise katkestamisega heeliksi 72 ning see põhjustas ribosoomide biogeneesi nähtavat defekti (Joonis 8A). Samas G2027A/C2036U ja C2025U/G2038A topeltasenduste tegemisel vahetati bakterite seas konserveerunud GC-aluspaardumine välja mittetüüpilise AU-aluspaardumise vastu ning ribosoomi partiklite jaotusest sahharoosigradiendis on näha, et aluspaardumise taastamine leevendab ribosoomide assambleerumise defekti (Joonis 9B). Sellest võib järeldada, et 23S rRNA assambleerumiseks ei olegi ilmtingimata vaja individuaalseid konserveerunud nukleotiide, vaid pigem mängib assambleerumisel rolli heeliksi 72 paardunud regiooni stabiilsus. Seda järeldust toetavad ka tulemused, et heeliksi 72 silmuse osa kahe kõige konserveerunuma positsiooni A2033 (Kattel, 2019) ja A2030 asendamine ei põhjusta kummalgi juhul metsiktüübist erinevat ribosoomi partiklite jaotumist sahharoosi gradiendis ja sellega nähtavat ribosoomide biogeneesi defekti, samas kui probleeme biogeneesi põhjustavad muudatused just heeliksi paardunud osas.

Heeliksiga 72 paarduvaid assambleerumise kofaktoreid ei ole küll siiani leitud, kuid võib spekuloida, et heeliksi 72 järjestuse rikkumisel on takistatud mõne kofaktori seondumine, mis on vajalik korrektse 50S alaühiku assambleerimiseks. Samuti on võimalus, et analüüsitud 23S rRNA variante sisaldavate 50S alaühikute lõpuni assambleerimine võtab rohkem aega või assambleeritakse see mõnda alternatiivset rada pidi, mis normaalse heeliksi 72 korral eelistatud ei ole. Seega võib heeliksi 72 muutuste tegemine põhjustada seda, et bakteris kuhjuvad 50S alaühiku assambleerimise vaheproduktid, mida looduses tavaliselt ette ei tule ning mille lõpuni assambleerimine on rakule aeganõudvam või energiakulukam. Lõpuks saab aga nende

assambleerumine ikkagi valmis ning need lülitatakse transleerivate ribosoomide koosseisu, mida kinnitavad ka tulemused 23S rRNA variantide jaotuse kohta ribosomaalsetes partiklites.

Saadud tulemuste põhjal saab spekuloida, et 23S rRNA heeliksi 72 aluspaardumised G2027-C2036 ning C2025-2036G on olulised 23S rRNA korrektseks assambleerumiseks.

Kokkuvõte

Bakteriaalse ribosoomi 23S rRNA domeen 0 ning selle koosseisus olev heeliks 72 on terves eluslooduses väga konserveerunud struktuurid (Petrov *et al.*, 2013). Kuna domeen 0 moodustab 23S rRNA südamikku, millest lähtuvad kõik ülejäänud kuus 23S rRNA domeeni, on spekulatsioonid, et domeenil 0 ja heeliksil 72 on oluline roll ribosoomi biogeneesis (Kattel, 2019; Leppik *et al.*, 2017; Petrov *et al.*, 2013).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli teada saada, kuidas mõjutavad mutatsioonid 23S rRNA domeeni 0 heeliksis 72 *E. coli* kasvu ja ribosoomide biogeneesi. Selleks konstrueeriti pBAD plasmiidid, mille poolt kodeeritav täispikk *rrnB* operon sisaldas ühte või kahte asendusmutatsiooni 23S rRNA heeliksil 72 kodeerivas järjestuses: C2025A, G2027A, A2033U, C2025U/G2036A, G2027A/C2038U. Kõik konstrueeritud 23S rRNA variandid sisaldasid lisaks asendusmutatsioonile ka heeliksis 25 asuvat streptavidiini aptameeri. Kontrollina kasutati tüve, milles ekspresseeriti streptavidiini aptameeriga metsiktüüpi *rrnB* operoni sisaldav plasmiid. 23S rRNA variandi (või kontrollplasmidi) ekspressioon käivitati kasvukeskkonda L-arabinoosi lisamisega. Katsete käigus mõõdeti bakterirakkude kasvu ja ribosoomi partiklite jaotust sahharoosi gradiendis ning saadud tulemusi võrreldi kontrolltüvega.

Uurimistöö tulemustest selgus, et ühegi 23S rRNA variandi ekspresseerimine ei põhjustanud bakterirakkudes kasvudefekti. Küll aga põhjustab G2027A ja C2025A 23S rRNA variantide ekspresseerimine 50S alaühiku assambleerumise defekti, mis on nähtav ribosoomi partiklite sahharoosi gradiendi profiilides. Lisaks on näha, et nende variantide puhul kuhjuvad 50S ja 30S alaühikud ning mõlemat 23S rRNA varianti lülitatakse 70S ribosoomidesse ja polüsoomidesse vähem kui 50S alaühikutesse, millest saab järeldada, et 23S rRNA variandid põhjustavad 50S ja 30S alaühikute assotsiatsiooni defekti.

Nende 23S rRNA variantide ekspresseerimise puhul, mille heeliksis 72 oli GC aluspaardumine asendatud AU aluspaardumise vastu (G2027A/C2036U ja C2025U/G2038A), oli näha metsiktüübiga sarnanevaid ribosoomi partiklite profiile ning alaühikute suhtarve, mistõttu saab järeldada, et aluspaardumine nendes positsioonides on vajalik korrektseks 50S subühiku assambleerimiseks. A2033U 23S rRNA variandi ekspresseerimine bakterirakkudes biogeneesi defekti ei põhjusta ning sarnaselt teiste variantidega paistab see funktsioneerivat sama hästi kui metsiktüüpi 23S rRNA.

Resümee

Effects of mutations in 23S rRNA domain 0 on *E. coli* growth and ribosome biogenesis

Agnes Vaht

Summary

The ribosome, a crucial molecular machinery responsible for protein synthesis in all living cells, consists of a small subunit responsible for mRNA decoding, and a large subunit involved in facilitating peptide bond formation. The large ribosomal subunit in the model organism *Escherichia coli* is composed of 23S rRNA, 5S rRNA and 37 different ribosomal proteins. A decade ago, a revised secondary structure model of the 23S rRNA in *Escherichia coli* was presented (Petrov *et al.*, 2013). In this model, the highly conserved core region of the 23S rRNA is defined as a separate 23S rRNA domain, namely Domain 0, from which all other 23S rRNA domains (I-VI) branch. It has been speculated that domain 0 plays an important role in ribosome biogenesis (Leppik *et al.*, 2017; Petrov *et al.*, 2013). More specifically, it has been shown that the expression of a plasmid containing a 23S rRNA where the sequence of helix 72 have been deleted in a wild-type *E. coli* strain causes a defect in the biogenesis of the 50S subunit (Kattel, 2019).

The aim of this study was to investigate the importance of certain conserved nucleotides in the H72 of Domain 0 by introducing nucleotide substitutions in the 23S rRNA. For this purpose, pBAD plasmids encoding the full *rrnB* operon containing one or two substitutions in the sequence of H72 of 23S rRNA were constructed using site-directed mutagenesis. The substitutions were C2025A, G2027A, A2033U, C2025U/G2036A or G2027A/C2038U. Additionally, the constructed 23S rRNA variants contained a streptavidin tag in helix 25, which was further necessary to evaluate the cloning efficiency and the proportion of ribosomes containing the 23S rRNA variant in a heterogeneous population of ribosomes. As a control, an *E. coli* strain expressing the wild-type *rrnB* operon containing a streptavidin tag in H25 was used. The expression of the 23S rRNA variant (or control plasmid) was induced by adding L-arabinose to liquid 2xYT growth medium. During the experiments, bacterial growth and the distribution of ribosome particles in a sucrose gradient were measured, and the results were compared to the control strain.

The results revealed that the expression of any constructed 23S rRNA variant did not cause a growth defect in bacterial cells. However, the expression of 23S rRNA variants containing G2027A or C2025A substitutions led to a defect in 50S subunit assembly visible in sucrose gradient profiles.

In addition, accumulation of 30S and 50S subunits and a decrease of 23S rRNA variant in 70S and polysome fractions was observed in strains expressing these variants, suggesting that the expression of G2027A and C2025A 23S rRNA variants cause a defect in the association of the 50S and 30S subunits.

As for the expression of the 23S rRNA variants where a conserved GC base pair in the helix 72 was replaced with rare-occurring AU base pair (G2027A/C2036U and C2025U/G2038A), ribosome particle profiles and particle ratios similar to wild-type strain were observed, suggesting that the base pairing at these positions and the overall stability of the helix 72 might be necessary for proper 50S subunit assembly.

The expression of the A2033U 23S rRNA variant did not cause a defect in ribosome biogenesis, and similarly to other variants, its assembly and function appears to be as good as for the wild-type 23S rRNA.

Tänuõnad

Suurimad tänuõnad oma juhendajale Margus Leppikule suurepärase juhendamise, lõppematu kannatlikkuse, abivalmiduse ning 2 aasta jooksul pühendatud aja eest.

Lisaks tänan TÜMRI molekulaarbioloogia labori doktoranti Ermo Leuskat sõbralikkuse, abivalmiduse ja põhjalike selgituste eest.

Lõpetuseks tänan ka emeritprofessor Jaanus Remmet ning ülejäänut TÜMRI molekulaarbioloogia labori seltskonda heade nõuannete ja toetava õhkkonna eest.

Kasutatud allikate loetelu

Teadusartiklid

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. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>

Bremer, H., & Dennis, P. P. (2008). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell at different exponential growth rates. *EcoSal Plus*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/ecosal.5.2.3>

Brosius, J., Dull, T. J., & Noller, H. F. (1980). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 201–204. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.201>

Brownlee, G. G., Sanger, F., & Barrell, B. G. (1967). Nucleotide Sequence of 5S-ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nature*, 215(5102), Article 5102. <https://doi.org/10.1038/215735a0>

Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., & Ebel, J. P. (1978). The sequence of *Escherichia coli* ribosomal 16 S RNA determined by new rapid gel methods. *FEBS Letters*, 94(1), 152–156. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80926-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80926-0)

Caskey, C. T., Tompkins, R., Scolnick, E., Caryk, T., & Nirenberg, M. (1968). Sequential translation of trinucleotide codons for the initiation and termination of protein synthesis. *Science*, 162(3849), 135–138. <https://doi.org/10.1126/science.162.3849.135>

Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., & Squires, C. L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4152–4156. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4152-4156.1995>

Dallas, A., & Noller, H. F. (2001). Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Molecular Cell*, 8(4), 855–864. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00356-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00356-2)

Dorner, S., Polacek, N., Schulmeister, U., Panuschka, C., & Barta, A. (2002). Molecular aspects of the ribosomal peptidyl transferase. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 1131–1137. <https://doi.org/10.1042/bst0301131>

- Ellwood, M., & Nomura, M. (1982). Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *149*(2), 458–468. <https://doi.org/10.1128/jb.149.2.458-468.1982>
- Franceschi, F. J., & Nierhaus, K. H. (1990). Ribosomal proteins L15 and L16 are mere late assembly proteins of the large ribosomal subunit. Analysis of an *Escherichia coli* mutant lacking L15. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(27), 16676–16682. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46274-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46274-0)
- Freistroffer, D. V., Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., & Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *The EMBO Journal*, *16*(13), 4126–4133. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4126>
- Gao, N., Zavialov, A. V., Li, W., Sengupta, J., Valle, M., Gursky, R. P., Ehrenberg, M., & Frank, J. (2005). Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from cryo-EM studies. *Molecular Cell*, *18*(6), 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.005>
- Ginsburg, D., & Steitz, J. A. (1975). The 30 S ribosomal precursor RNA from *Escherichia coli*. A primary transcript containing 23 S, 16 S, and 5 S sequences. *Journal of Biological Chemistry*, *250*(14), 5647–5654. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41228-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41228-3)
- Green, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 679–716. <https://doi.org/annurev.biochem.66.1.679>
- Hartz, D., McPheeters, D. S., & Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes & Development*, *3*(12a), 1899–1912. <https://doi.org/10.1101/gad.3.12a.1899>
- Haselman, T., Gutell, R. R., Jurka, J., & Fox, G. E. (1989). Additional Watson-Crick interactions suggest a structural core in large subunit ribosomal RNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *7*(1), 181–186. <https://doi.org/10.1080/07391102.1989.10507759>
- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., & Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*: Further studies. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(10), 3103–3111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42644-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42644-6)

- Herold, M., & Nierhaus, K. H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(18), 8826–8833. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47489-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47489-3)
- Hindennach, I., Kaltschmidt, E., & Wittmann, H.-G. (1971). Ribosomal Proteins: Isolation of Proteins from 50 S Ribosomal Subunits of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 23(1), 12–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01585.x>
- Kaltschmidt, E., & Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal Proteins, XII. Number of Proteins in Small and Large Ribosomal Subunits of *Escherichia coli* as Determined by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(3), 1276–1282. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1276>
- Kiss, A., Sain, B., & Venetianer, P. (1977). The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 79(1), 77–79. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80354-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80354-2)
- Kohler, R., Mooney, R. A., Mills, D. J., Landick, R., & Cramer, P. (2017). Architecture of a transcribing-translating expressome. *Science*, 356(6334), 194–197. <https://doi.org/10.1126/science.aal3059>
- Leonov, A. A., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Brimacombe, R., & Dontsova, O. A. (2003). Affinity purification of ribosomes with a lethal G2655C mutation in 23 S rRNA that affects the translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25664–25670.
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx160>
- Li, Z., Pandit, S., & Deutscher, M. P. (1999a). Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *Rna*, 5(1), 139–146. <https://doi.org/10.1017/S1355838299981669>
- Li, Z., Pandit, S., & Deutscher, M. P. (1999b). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *The EMBO Journal*, 18(10), 2878–2885. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2878>
- Lockwood, A. H., Sarkar, P., & Maitra, U. (1972). Release of polypeptide chain initiation factor IF-2 during initiation complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(12), 3602–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3602>

- Maguire, B. A., Manuilov, A. V., & Zimmermann, R. A. (2001). Differential effects of replacing *Escherichia coli* ribosomal protein L27 with its homologue from *Aquifex aeolicus*. *Journal of Bacteriology*, *183*(22), 6565–6572. <https://doi.org/10.1128/jb.183.22.6565-6572.2001>
- Maki, J. A., Schnobrich, D. J., & Culver, G. M. (2002). The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Molecular Cell*, *10*(1), 129–138. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00562-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00562-2)
- Mangiarotti, G., Apirion, D., Schlessinger, D., & Silengo, L. (1968). Biosynthetic precursors of 30 S and 50 S ribosomal particles in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *7*(1), 456–472. <https://doi.org/10.1021/bi00841a058>
- Mangiarotti, G., Turco, E., Ponzetto, A., & Altruda, F. (1974). Precursor 16S RNA in active 30S ribosomes. *Nature*, *247*(5437), 147–148. <https://doi.org/10.1038/247147a0>
- Milón, P., Maracci, C., Filonava, L., Gualerzi, C. O., & Rodnina, M. V. (2012). Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(6), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2285>
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, *342*(6246), 142–148. <https://doi.org/10.1038/342142a0>
- Monro, R. E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *26*(1), 147–151. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90271-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90271-9)
- Myasnikov, A. G., Marzi, S., Simonetti, A., Giuliodori, A. M., Gualerzi, C. O., Yusupova, G., Yusupov, M., & Klaholz, B. P. (2005). Conformational transition of initiation factor 2 from the GTP-to GDP-bound state visualized on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(12), 1145–1149. <https://doi.org/10.1038/nsmb1012>
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, *289*(5481), 920–930. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>
- Noel, J. K., & Whitford, P. C. (2016). How EF-Tu can contribute to efficient proofreading of aa-tRNA by the ribosome. *Nature Communications*, *7*(1), 13314. <https://doi.org/10.1038/ncomms13314>

- Noller, H. F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R. R., Kopylov, A. M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D. A., & Gupta, R. (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, *9*(22), 6167–6189. <https://doi.org/10.1093/nar/9.22.6167>
- Nomura, M., Lowry, C. V., & Guthrie, C. (1967). The initiation of protein synthesis: Joining of the 50S ribosomal subunit to the initiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *58*(4), 1487–1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.4.1487>
- O'Connor, M. (2007). Selection for intragenic suppressors of lethal 23S rRNA mutations in *Escherichia coli* identifies residues important for ribosome assembly and function. *Molecular Genetics and Genomics*, *278*, 677–687. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0284-3>
- Peske, F., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2005). Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Molecular Cell*, *18*(4), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.009>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., Stepanov, V. G., Gaucher, E. A., Grover, M. A., & Harvey, S. C. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, *41*(15), 7522–7535. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt513>
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T., & Maiväli, Ü. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Reports*, *12*(5), 458–462. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.47>
- Polikanov, Y. S., Steitz, T. A., & Innis, C. A. (2014). A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(9), 787–793. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2871>
- Proshkin, S., Rahmouni, A. R., Mironov, A., & Nudler, E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*, *328*(5977), 504–508. <https://doi.org/10.1126/science.1184939>
- Rheinberger, H.-J., Sternbach, H., & Nierhaus, K. H. (1981). Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(9), 5310–5314. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5310>
- Rodnina, M. V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., & Wintermeyer, W. (1996). Initial Binding of the Elongation Factor Tu·GTP·Aminoacyl-tRNA Complex Preceding Codon Recognition on the

- Ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 646–652.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.646>
- Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., & Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, 385(6611), 37–41.
<https://doi.org/10.1038/385037a0>
- Sabol, S., & Ochoa, S. (1971). Ribosomal binding of labelled initiation factor F3. *Nature New Biology*, 234(51), 233–236. <https://doi.org/10.1038/newbio234233a0>
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., & Nirenberg, M. (1968). Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 768–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.768>
- Shajani, Z., Sykes, M. T., & Williamson, J. R. (2011). Assembly of bacterial ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 501–526. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062608-160432>
- Sharpe Elles, L. M., Sykes, M. T., Williamson, J. R., & Uhlenbeck, O. C. (2009). A dominant negative mutant of the E. coli RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research*, 37(19), 6503–6514. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp711>
- Spillmann, S., Dohme, F., & Nierhaus, K. H. (1977). Assembly in vitro of the 50 S subunit from Escherichia coli ribosomes: Proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *Journal of Molecular Biology*, 115(3), 513–523. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90168-1)
- Spillmann, S., & Nierhaus, K. H. (1978). The ribosomal protein L24 of Escherichia coli is an assembly protein. *Journal of Biological Chemistry*, 253(19), 7047–7050. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38027-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38027-4)
- Spirin, A. (1987). Structural dynamic aspects of protein synthesis on ribosomes. *Biochimie*, 69(9), 949–956. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(87\)90228-8](https://doi.org/10.1016/0300-9084(87)90228-8)
- Srivastava, A. K., & Schlessinger, D. (1988). Coregulation of processing and translation: Mature 5' termini of Escherichia coli 23S ribosomal RNA form in polysomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), 7144–7148. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7144>
- Sykes, M. T., Shajani, Z., Sperling, E., Beck, A. H., & Williamson, J. R. (2010). Quantitative proteomic analysis of ribosome assembly and turnover in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 403(3), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.005>

- Thach, R. E., Hershey, J. W., Kolakofsky, D., Dewey, K. F., & Remold-O'Donnell, E. (1969). Purification and properties of initiation factors F1 and F2. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *34*, 277–284. <https://doi.org/10.1101/SQB.1969.034.01.033>
- Thompson, J., Tapprich, W. E., Munger, C., & Dahlberg, A. E. (2001). Staphylococcus aureus domain V functions in Escherichia coli ribosomes provided a conserved interaction with domain IV is restored. *RNA*, *7*(8), 1076–1083. <https://doi.org/10.1017/S1355838201010172>
- Tissières, A., Schlessinger, D., & Gros, F. (1960). Amino acid incorporation into proteins by Escherichia coli ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *46*(11), 1450–1463. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.11.1450>
- Tissières, A., Watson, J. D., Schlessinger, D., & Hollingworth, B. R. (1959). Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, *1*(3), 221–233. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(59\)80029-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(59)80029-2)
- Traub, P., & Nomura, M. (1968). Structure and function of E. coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *59*(3), 777–784. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.3.777>
- Wallin, G., & Åqvist, J. (2010). The transition state for peptide bond formation reveals the ribosome as a water trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 1888–1893. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914192107>
- Whitford, P. C., Geggier, P., Altman, R. B., Blanchard, S. C., Onuchic, J. N., & Sanbonmatsu, K. Y. (2010). Accommodation of aminoacyl-tRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways. *Rna*, *16*(6), 1196–1204. <https://doi.org/10.1261/rna.2035410>
- Williamson, J. R. (2003). After the ribosome structures: How are the subunits assembled? *Rna*, *9*(2), 165–167. <https://doi.org/10.1261/rna.2164903>
- Wintermeyer, W., & Gualerzi, C. (1983). Effect of Escherichia coli initiation factors on the kinetics of N-Acphē-tRNAPhē binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study. *Biochemistry*, *22*(3), 690–694. <https://doi.org/10.1021/bi00272a025>
- Wower, I. K., Wower, J., & Zimmermann, R. A. (1998). Ribosomal protein L27 participates in both 50 S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(31), 19847–19852. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19847>

Diplomitööd

Kattel, C. (2019). *23S rRNA domeeni O mutatsioonide mõju ribosoomide biogeneesile*.
Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, geenitehnoloogia õppekava.

Veebilehed

23S rRNA model: Single base frequency – CRW2: Comparative RNA Web-2. (i.a.). Kasutatud
21.04.2023, <https://crw2-comparative-rna-web.org/nucleotide-frequency/23s-rrna-model-single-base-frequency/>

Lisad

Lisa 1. Esimese ja teise PCR tingimused.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Algne denaturatsioon	95 °C	60 s	1
Denaturatsioon	95 °C	40 s	35
Praimerite seondumine	57 °C	40 s	
Elongatsioon	72 °C	80 s	
Lõplik elongatsioon	72 °C	300 s	1

Lisa 2. Koloonia PCR tingimused.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Algne denaturatsioon	94 °C	180 s	1
Denaturatsioon	94 °C	30 s	30
Praimerite seondumine	55 °C	40 s	
Elongatsioon	73 °C	60 s	

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Agnes Vaht,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „23S rRNA domeeni 0 mutatsioonide mõju *E. coli* kasvule ja ribosoomide biogeneesile“, mille juhendaja on PhD Margus Leppik,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandit ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Agnes Vaht

26.05.2023