

TARTU ÜLIKOOL

Bioloogia-Geograafiateaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut

Molekulaarbioloogia õppetool

MARGUS LEPPIK

**Pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifilisus
in vivo ja *in vitro*.**

Magistritöö

Juhendajad:

Jaanus Remme, Ph. D
Aivar Liiv, Ph.D

Tartu 2007

Sisukord

Lühendid.....	4
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade	7
Ribosoomide struktuur.	7
Ribosoomi väike subühik	8
Ribosoomi suur subühik.....	9
Subühikutevahelised sillad	11
Pseudouridiinid.....	11
Heeliks-ling 69 (H69).....	14
Pseudouridiini süntaasid.....	17
Pseudouridiini süntaas RluD	20
Materjal ja meetoodika.....	24
Kemikaalid ja ensüümid.....	24
Aparatuur.....	26
Oligonukleotiidid	27
Plasmiidid.....	27
E.coli tüved.....	28
Ekspressioonivektorite konstrueerimine	29
rRNA ekspressioonivektorite klonimine ja mutagenees	29
DNA puhastamine restriksioonisegust.....	30
Plasmiidse DNA eraldamine minipreparatsiooni meetodil.....	31
Sekveneerimine USB kit-ga	32
Sekveneerimine DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit-ga	32
Ribosoomide kasvatamine ja analüüs	33
Rakkude kasvukiiruse mõõtmine	33
Rakkude kasvatamine ja lüüs	34
Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendis.....	34
Mutantse rRNA ekspressiooni kontrollimine RT-PCR-ga.....	35
Mutantsete ribosoomide puhastamine aafiinsuskromatograafial	35
<i>In vitro</i> RluD töötlus	36
Räniga rRNA eraldamine	36

Pseudouridiinide määramine	37
Oligonukleotiidi (U1) pikendamine	38
Oligonukleotiidi pikendamise reaktsioon märgitud praimeriga.....	38
Eksperimentaalne osa	40
Töö eesmärk	40
Tulemused	41
Mutantseid A1916C ja A1916U 23S rRNA variante sisaldavate plasmiidide konstrueerimine	41
RluD spetsiifilisus uridiinide positsioonide suhtes	41
Heeliks-lingu 69 positsioonide tähtsus RluD spetsiifikale.....	42
Mutatsioonide mõju positsioonides 1911, 1915 ja 1917	42
RluD spetsiifilisuse sõltuvus ribosoomide aktiivsusest.	44
Positsiooni A1916 mutatsioonide mõju rakkude kasvule	44
Erinevate A1916 rRNA variantide jaotus ribosoomi partiklites.	45
Pseudouridiini süntaasi RluD spetsiifilisus <i>in vitro</i>	47
Arutelu.....	49
Kokkuvõte	54
Summary	55
Kasutatud kirjandus.....	56
Lisa 1.....	62

Lühendid

30S- prokarüoodi ribosoomi väike subühik
50S- prokarüoodi ribosoomi suur subühik
70S- prokarüoodi ribosoom
Amp- ampitsiliin
ASL- tRNA antigoodon heeliks-ling
CMCT- N-tsükloheksüül-N´-(2-morfoliinoetüül)-karbodimiid Meto-p-tolusulfonaat
ddH₂O- demineraliseeritud vesi
ddNTP- didesoksünukleotiidid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
dNTP- desoksünukleotiidid (dATP, dCTP dGTP, dTTP)
dNTP(-C)- 110mM dNTP, milles on vähenadatud dCTP kontsentratsioon (6mM)
DP- dissotseeriv puhver
FS- formamiidi stop
GuTCN- guanidiintsiotsüanaat
HB- hübridisatsiooni puhver
IPTG- isopropüültio-β-D-galaktosiid
LLP- lüüsi lahjenduspuhver
LP- lüüsi puhver
MOPS- 3-morfolinopropaansulfoon hape
OD- optiline tihedus
PCR- polümeraasi ahelreaktsioon
PNK- polünukleotiidi kinaas
ptBB-t- plasmiid ptBB, mille *rrnB* operoni 23S rRNA heeliks-lingu 25 kodeerivasse DNA ahelasse on lisatud strept-avidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment
PTC- peptidüültransferaasne tsenter
RB- reaktsiooni puhver
RluD- ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas D
RRF- ribosomaalne retsükleerimise faktor
rRNA- ribosomaalne RNA
RT- pöördtranskriptaas
RT-PCR- RNA ahelast siDNA ahela amplifitseerimine
RT-STOP- pöördtranskriptaasi stop
SDS- naatriumdadetsüül sulfaat

Streptavidiini ligand- RNA ligand, mis seondub streptavidiini-ga

tRNA-transport RNA

U- ühik

UUREA-PAAG- 8M UUREA-t sisaldav polüakrüülamiid geel

wt- metsiktüüp

β -ME- 2-merkaptetanool

Ψ - pseudouridiin

Sissejuhatus

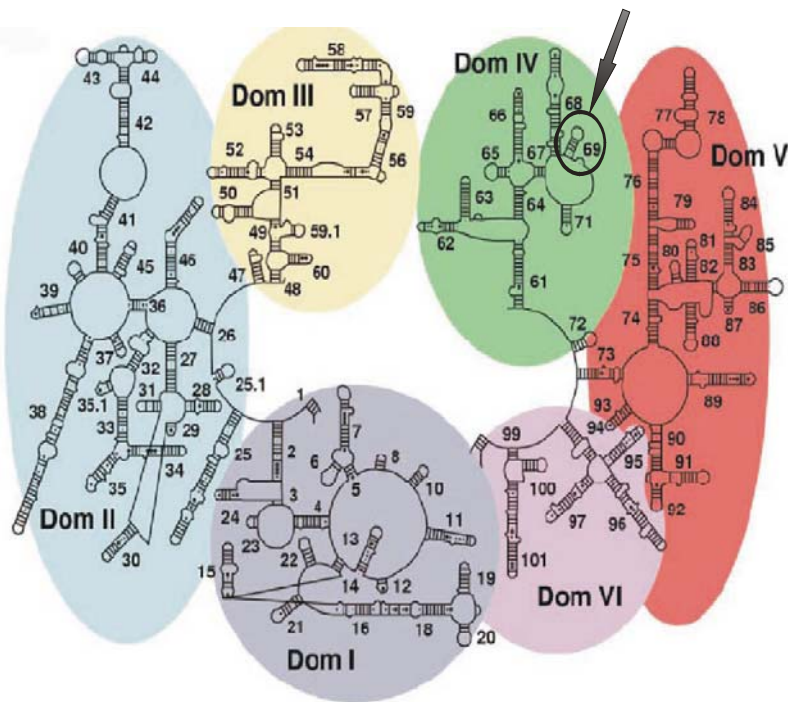
Kõige levinum modifikatsioon RNA ahelas on pseudouridiin (Ψ). Tänu oma laiale levikule, on pseudouridiinid juba pikemat aega teadlastele suurt huvi pakkunud. Ehkki pseudouridiine on uuritud juba 1950 aastatest, ei ole suudetud tõestada ühest põhjust, miks see modifikatsioon RNA ahelas vajalik on. Pseudouridiinid on posttranskriptsioonilised nukleotiidid, mis tekivad uridiini isomeriseerimise reaktsioonil. Pseudouridiine on leitud funktsionaalsetest RNA-dest, milleks on rRNA, tRNA ja eukarüootides ka snoRNA. Siiani ei ole pseudouridiine leitud mRNA-st. Võrreldes erinevate organismide RNA-de sekundaarstruktuure, on näidatud, et pseudouridiinide positsioonid on suhteliselt konserveerunud. Ribosoomides asuvad pseudouridiinid peptidüüli transferaalse tsentri läheduses, mis on põhjustanud palju spekulatsioone Ψ funktsiooni üle ja muutnud selle nukleotiidi veel huvipakkumaks. Kõik Ψ -d on isomeriseeritud spetsiifiliste ensüümide poolt, mida nimetatakse pseudouridiini süntaasideks. Ehkki viimastel aastatel on pseudouridiini süntaaside uurimine jõudsalt edenenud, ei ole siiani suudetud leida täpset mehhanismi, mille järgi Ψ süntaas oma reaktsiooni läbi viib ja mille järgi ensüüm prokarüootses rakus oma substraati ära tunneb.

Kirjanduse ülevaade

Ribosoomide struktuur.

Ribosoom on transleerija, mis kasutab mRNA nukleiinhappelisse järjestusse talletatud informatsiooni, et sünteesida sellele vastav aminohappeline järjestus. Transleerimisprotsessi viiakse läbi märkimisväärse kiiruse ja täpsusega. Kasvavas valguahele lülitatakse umbes 20 aminohapet sekundis ja tehakse keskmiselt ainult üks viga iga 3000 koodoni kohta (Wilson & Nierhaus, 2003; Moore & Steitz, 2003).

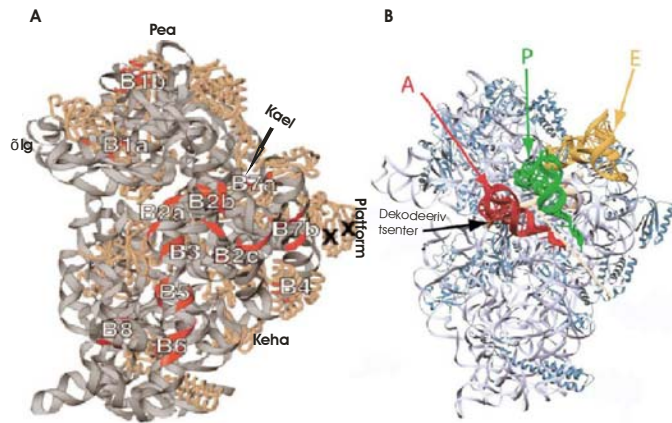
Kõik ribosoomid koosnevad kahest ebavõrdse suurusega subühikust. Bakteriaalsed ribosoomi alaühikud sedimenteervad 30S ja 50S subühikuna (Svedbergi ühikutes). Terve bakteriaalse ribosoom sedimenteervad 70S partiklina. *E.coli* ribosoom sisaldab kolme rRNA molekuli ja tervet rida valke. 50S subühik koosneb 23S rRNA-st (2904 nt) (Joonis 1) ja 5S rRNA-st (120 nt) ning 33 valgust, mida tähistatakse tähega L (large). 30S subühik koosneb 16S rRNA-st (Lisa 1) (1551 nt) ja 21 ribosomaalsest valgust, mida tähistatakse tähega S (small). 70S ribosoomis esineb kõiki valke üks koopia, välja arvatud suure subühiku valgud L7 ja L12, millest kumbagi on kaks koopiat. Umbes kaks kolmandikku ribosoomist koosneb rRNA-st ja üks kolmandik valgust. 70S ribosoomi molekulmass on umbes 2,6 MDa ja diameeter 200-250 Å (Wilson & Nierhaus, 2003; Moore & Steitz, 2003; Wilson et al. 2002). Ribosoomidel on selgelt eristatavad kolm tRNA seondumise saiti. A ehk aktseptor ja P ehk peptidüültransferaases saitides on vastavalt aminoatsüül ja peptidüül tRNA-d, (enne peptiidsideme tekkimist). E ehk exit sait on deatsüleeritud tRNA spetsiifiline (Wilson et al., 2002). A, P ja E saidid on mõlemal ribosomalsel subühikul (Moore & Steitz, 2003). Valgusünteesi elongatsiooni käigus on ribosoomiga seotud vähemalt kaks tRNA-d (Yusupov et al, 2001). Ribosoomidele annab katalüütilise aktiivsuse rRNA, kuna peptidüültransferaase keskuse ümbruses on vaid RNA. Valgud asuvad perifeersema, aktiivsetest saitidest eemal, seega on valkudel ribosoomis üldiselt karkassi moodustamise roll. Seega on ribosoom ribosüüm (Moore & Steitz, 2003).



Joonis 1. *H.marismortui* 23S rRNA rRNA sekundaarstruktuur (Ban et al, 2000). Joonisele on märgitud 23S rRNA domeenid I , II, III, IV, V ja VI. Lisaks sellele on noolega näidatud ka domeenis IV asuv subühikute vahelise silla B2a komponent H69.

Ribosoomi väike subühik

Väikese subühiku kuju iseloomustatakse antropomorfsete kujundite abil. Subühikusse kuulub pea, kael, keha, õlg ja niinimetatud platform (Joonis 2 A) (Wilson et al., 2002). Väike subühik „programmeerib” valgusünteesi, mRNA-d sidudes ja mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vahelist interaktsiooni vahendades (Moore & Steitz, 2003). Koodon-antikoodon dupleksi äratundmine leiab aset dekodeerivas tsentris. Väike subühik koosneb 16S rRNA-st ja väikese subühiku valkudest. 16S rRNA on 1541 nukleotiidi pikk (Brosius et al., 1978) ja see jagatakse neljaks domeeniks: 5' domeen, tsentraalne domeen, 3'suur domeen ja 3'väike domeen (Wilson et al, 2002)(Lisa 1). 5'domeen moodustab väikese subühiku keha, tsentraalne domeen moodustab platformi, 3'suur domeen moodustab pea ja 3'väike domeen algab kaele juurest, jookseb mööda 30 S subühiku pinda alla välja ning siis üles tagasi, lõppedes anti Shine-Dalgarno järjestusega. 3' väiksem domeen koosneb heeliksitest 44 ja 45 (Wilson et al, 2002).

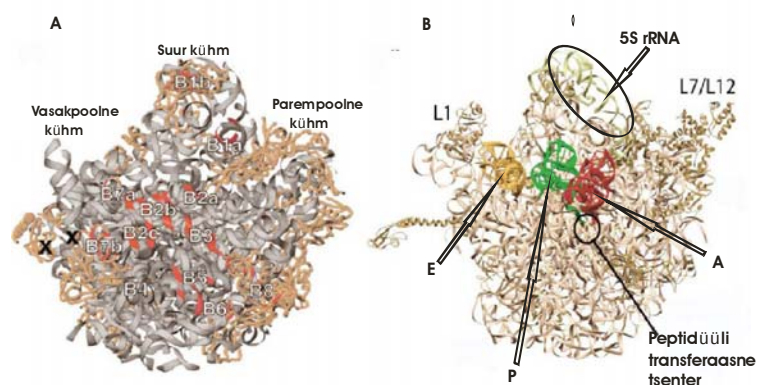


Joonis 2. Ribosoomi väike subühik vaadatuna suure subühiku poolsest küljest. A paneelil on näidatud ka antropomorfsete kujundite abil iseloomustatud struktuuriüksused, lisaks sellele on märgitud ka 12 teada olevat subühikute vahelist silda (Gao et al, 2003). Paneelil B on näidatud dekodeeriva tsentri asukoht ning A, P ja E saidi tRNA-d (Ramakrishnan et al, 2002).

Ribosoomi suur subühik

Suur subühik vastutab ribosoomis valguahela tekkimise eest, see sisaldab peptidüültransferaas tsentrit (PTC), kus toimub peptiidsideme süntees (Moore & Steitz, 2003). 50S subühik on poolkera kujuline ja selle diameeter on umbes 250Å. Selle 30S subühiku poolsest küljest vaadatuna (lame külj) kasvavad välja kolm kühmu. Subühiku keskel asub suur kühm, millest kella kahe ja kümne suunas asuvad kaks väikemat kühmu. Tsentraalne kühm koosneb 5S rRNA-st ja sellega assotseerunud valkudest, parempoolne kühm sisaldab L7 ja L12 ribosomaalseid valke ning vasak kühm sisaldab L1 ribosomaalset vaku. 30S subühiku poolelt vaadatuna meenutab selline morfoloogia krooni (Joonis 3) (Moore & Steitz, 2002). PTC asub vahetult tsentraalse kühmu all ja peptidüültransferaasne reaktsioon saab toimuda siis, kui ribosoomi A saidis on aminoatsüül tRNA ja P saidis on peptidüül tRNA ning E said on tühi (Wilson et al., 2002). PTC tagaseinast P saidi lähedalt algab väljuva peptiidi tunnel, mis viib 50S alaühiku vastasküljele. Selle tunneli pikkus on umbes 100Å ja diameeter umbes 20Å (Wilson et al., 2002). Väljuva peptiidi tunnel mahutab 30-50 aminohapet (Wilson & Nierhaus, 2003). Suure subühiku moodustab enamjaolt ribosomaalne 23S RNA. *E.coli* 23S rRNA koosneb 2904. nukleotiidist (Brosius et al., 1980), ja selle sekundaarstruktuur jagatakse pikki aluspaardunud heelikseid sialdavate osade järgi kuude domeeni (Joonis1) (Stahl et al., 1981). Lisaks 23S rRNA-le asub suures subühikus veel ka 5S rRNA, mis on 120 nukleotiidi pikk (Brownlee et al., 1967) ja moodustab põhiosa 50S subühiku tsentraalsest kühmust (Joonis 3 B) (Ramakrishnan, et al., 2002). Hoolimata oma

väiksusest on 5S rRNA ribosoomi tööks väga oluline. Ilma 5S ribosomaalse RNA-ta väheneb tugevalt peptiidahela sünteesi kiirus nii sünteetiliselt, kui looduslikult mRNA-lt, väheneb ka koodon suunatud tRNA seondumine 70S ribosoomi ja vähenevad ka peptidüültransferaasne aktiivsus ja valgusünteesi termineerimine (Erdmann *et al*, 1971). 5S rRNA mängib tähtsat rolli ka 50S subühiku assambleerimisel. Samas *in vitro* on võimalik efektiivselt 5S ribosomaalset RNA-d integreerida igas 50S alaühiku assambleerimise etapis, seega on 5S rRNA-d vaja ribosomaalsete 50S alaühikute aktiivse konformatsiooni saavutamiseks. Effekt on näha isegi siis, kui 5S lisada juba valmis ribosomaalsetele 47S partiklitele (50S-i partikkel, mille puudub 5S rRNA) (Dohme & Nierhaus, 1976).



Joonis 3. Ribosomaalne 50S subühik vaadatuna 30S subühiku poolt küljelt. Paneelile A on lisatud subühikute vaheliste sildade asukohad ja suure, parempoolse ning vasakpoolse kühmu asukohad (Gao *et al*, 2003). Paneelile B on lisatud A, P ja E saitide tRNA-d. Nagu pildilt näha, koosneb vasakpoolne kühm valgust L1, parempoolne kühm valkudest L7 ja L12 ning suure kühmu moodustab enamjaolt 5S rRNA (Ramakrishnan *et al*, 2002).

E.coli ribosomaalses 23S RNA-s on kokku 10 uridiini, mis isomeriseeritakse pseudouridiinideks (Del-Campo *et al.*, 2001). Kõikide suure subühiku pseudouridiinide tekkimiseks on vajalik vaid 5 pseudouridiini süntaasi (Wrezesinski *et al* 2000). 16S rRNA-s on seevastu vaid üks pseudouridiin, mille tekke eest vastutab pseudouridiini süntaas RsuA (Conrad *et al*, 1999).

Subühikutevahelised sillad

Ribosoomi suur ja väike subühik on seotud mitmete kontaktide kaudu, mida koondatakse subühikute vahelistest sildadeks (Joonis 2A ja Joonis 3A). Võimalikud on kolme tüüpi sillad: RNA-RNA sillad, RNA-valk sillad või valk valk sillad. Vastavalt silla tüübile on erinev ka nende ruumiline jaotus ribosoomis. RNA-RNA sillad asuvad ribosoomis tsentraalselt, ümbritsedes funktsionaalseid saite. Valk-valk ja valk-RNA sillad paiknevad aga perifeerselt, kaugel funktsionaalsetest saitidest (Yusupov *et al.*, 2001). Rohkem kui 80% *E.coli* subühikute vahelistest sildadest moodustavad 16S rRNA heeliksid 23, 24 ja 44 ning 23S rRNA heeliksid 64, 67-71. Lisaks sellele on näidatud, et igale *T. thermophilus*-e ribosoomis asuvale sillale vastab sild ka *E. coli* ribosoomis, kusjuures suurem osa neist on oma asukoha, valguliste ja RNA-liste komponentide poolest väga sarnased (Gao *et al.*, 2003). Analoogne tulemus saavutatakse ka siis kui võrrelda pärmi ja eubakteri ribosoomide struktuure (Spahn *et al.*, 2001). Selline suur liikidevaheline konserveeruvus erinevate ribosoomide puhul viitab sellele, et subühikute vaheliste sildade kolmemõõtmelised struktuurid on vajalikud ribosoomi funktsioneerimiseks (Gao *et al.*, 2003). Arvatavasti mängivad need kontaktid lisaks subühikute assotsatsioonile tähtsat rolli ka tRNA liikumisel läbi ribosoomi ja dekodeeriva tsentri ning peptidüüli transferaalse tsentri vahelisel signaaliülekanal (Wilson & Nierhaus, 2003). On näidatud, et EF-G sõltuvt translokatsioon ribosoomis, põhjustab märkimisväärset liikumist 50S ja 30S ribosomaalse alaühiku vahel. Ribosoomi perifeerias liiguvad translatsiooni käigus 30S ja 50S ribosomaalsed alaühikud teineteise suhtes 19 Å. Subühikute vahelised sillad on sellise liikumise jaoks äärmiselt olulised (Frank & Agrawal, 2000; Horan & Noll, 2007).

Pseudouridiinid

Pseudouridiin, ehk 5-ribosüül-uratsiil, oli esimene modifitseeritud nukleosiid, mis RNA ahelast avastati. Lisaks sellele, on see kõige levinum modifitseeritud nukleosiid, mille pärast on pseudouridiini nimetatud ka viiendaks nukleosiidiks, mis esineb looduslikult RNA ahelas (Davis & Allen, 1956). Kõigele sellele vaatamata pole siiani päris täpselt selge, millist funktsiooni pseudouridiin RNA ahelas täidab (Charette & Gray, 2000). Enam on pseudouridiinid levinud eukarüootsetes organismides, kus 2%-3% kogu tRNA, rRNA ja snoRNA-de uridiinidest võivad olla isomeriseeritud pseudouridiinideks (Lane *et al.*, 1995).

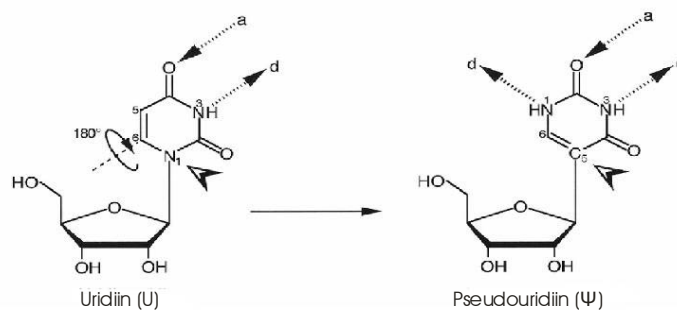
Ribosoomaalses 23S rRNA-s asuvad pseudouridiinid ribosoomi katalüütiliste saitide vahetus läheduses, mis on põhjustanud spekulatsioone, et need nukleotiidid katalüüsivad peptidüüli transferaasi tRNA-delt valguahelasse (*Lane et al., 1992*). Hiljem on siiski näidatud, et funktsionaalseid ribosome on võimalik saada ka *in vitro* transkribeeritud, ilma modifikatsioonideta rRNA-de assambleerimisel 50S subühikusse. Viimast on näidatud *B.stearothermophilus*-e puhul kus saadi 3-4 korda madalama peptidüüli transferaase aktiivsusega ribosoomid (*Green & Noller., 1999*). *In vitro* transkribeeritud rRNA-dest funktsionaalsete ribosoomide saamist on näidatud ka *T.aquaticus*-e puhul, siin oli *in vitro* sünteesitud nii 23S kui ka 5S, sellel juhul näidati, et ribosoomi aktiivsus oli tugevas sõltuvuses 5S rRNA olemasolust 50S ribosomaalses alaühikus (*Khaitovich et al., 1999*). Need tulemused ja tähelepanekud, et peaaegu mitte ükski pseudouridiin ei ole eluslooduses täielikult konserveerund (välja arvatud 23S rRNA positsioon 1917 (*E.coli* numeratsioon)), viitavad sellele, et pseudouridiin siiski ei ole otseselt vajalikud ribosoomis peptidüüli transferaase reaktsiooni läbi viimiseks (*Charette & Gray., 2000*).

Valdav enamus RNA modifikatsioone, kaasa arvatud pseudouridiinid asuvad funktsionaalsetes RNA-des (rRNA, tRNA, snoRNA). Kõigis neis RNA-des on modifikatsioonide kohad suhteliselt tugevalt konserveerunud. Sellest võib järeldada, et uridiinide isomeriseerimisel pseudouridiiniks on tähtis roll raku elutegevusele. Siiski valdav enamus pseudouridiinidest ei ole universaalselt konserveerunud (*Davis., 1995*). Pseudouridiinid asuvad nii ühe-, kui kaheaheelalises RNA-s kuid sagedasemini asuvad need heeliks-lingude üheaheelaliste lingude osades (*Ofengand & Bakin, 1997*).

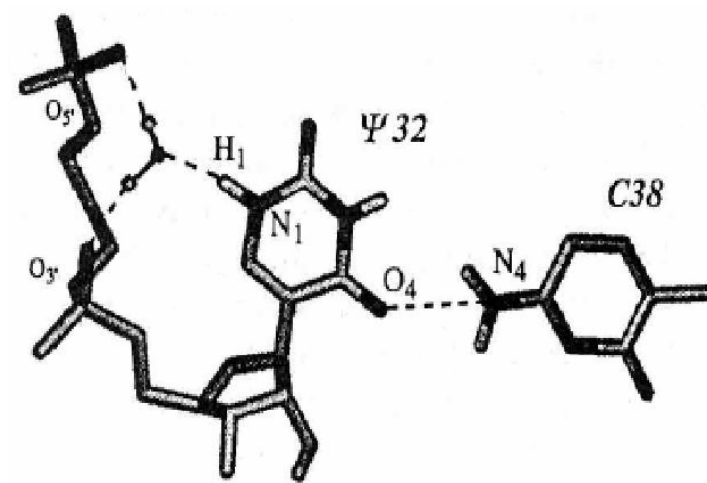
Pseudouridiinil on tavalise N-C' glükosiidse sideme asemel C-C' side, millel on suurem pöölemise vabadus, mille pärast peetakse pseudouridiini palju paindlikumaks elemendiks RNA-s, kui on seda uridiin. Konformatsioonilised uurimised on näidanud, et pseudouridiin on eelistatult *syn* konformatsioonis ja uridiin on *anti* konformatsioonis (*Neumann et al., 1980*). Pseudouridiini *syn-anti* ja *anti-syn* konformatsioonilised üleminekud ei nõua suurt energiat, mis on tekitanud spekulatsioone, et pseudouridiini näol võib tegemist olla molekulaarse lülitiga (*Charette & Gray., 2000*). Siiski ei ole molekulaarse lüliti idee lõplikult kinnitust leidnud (*Davis et al., 1998*). Lisaks eelpool nimetatule on pseudouridiinil veel vaba N1-H, mis võimaldab pseudouridiinil moodustada lisaks ühe vesiniksideme, mida on võimalik kasutada mõne raktsiooni läbi viimisel või siis rohkemate vesiniksidemete kaudu stabiilsema RNA saamiseks. (Joonis 4) (*Lane et al., 1992*).

Pseudouridiinide puhul on nähtud ka vee poolt vahendatud aluse ja suhkruselgroo vahelist interaktsiooni, kus pseudouridiini N1 positsioon vesinik annab sideme vee molekuli

hapnikuga, mis on oluliselt tugevam uridiini C5 positsiooni poolt antavast sidemest. Vee vesinikud annavad omakorda sideme suhkruselgroo molekulidega. Sellised sidemed vähendavad olulisel määral pseudouridiini oletatavat konformatsioonilist liikuvust (Joonis 5). Sellisel N1 positsiooni kaudu stabiliseerimisel on aga tagajärg, selliselt satabiliseeritud pseudouridiine ei saa arvestada RNA-RNA ja RNA-vaik interaktsioonide puhul, millised on aga olemas ribosoomis. Et anda sellist interaktsiooni, tuleb mainitud stabilisatsioon kaotada. (Auffinger & Westhof, 1998).



Joonis 4. Üldine uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks. Nooltega a ja d sümboliseerivad vastavalt elektronide aktseptorit (tõmbab elektrone enda poole) ja doonorit (annab elektrone ära) (Charette & Gray., 2000).

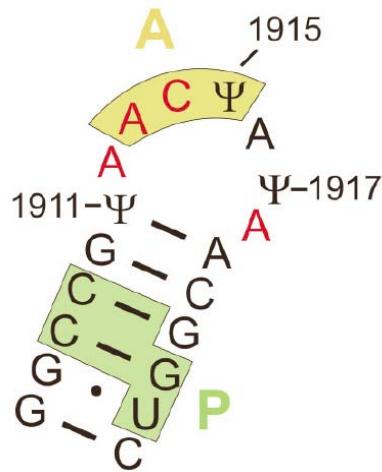


Joonis 5. Joonisel on kujutatud tRNA positsioonis 32 oleva pseudouridiini positsiooni N1 vajalikkus selle aluse stabiliseerimiseks läbi vee molekuli, mis vähendab aluse konformatsioonilist liikuvust ja sellega suurendab termilist stabiilsust. Samas on kujutatud ka pseudouridiini teine oletatav ülesanne RNA-s, mis on *stacking*-ga (Ψ32 ja C38) kõrgema struktuuri stabiliseerimine (Auffinger & Westhoff, 1998).

Praegu on enam levinud arvamus, et pseudouridiini on RNA-des vaja vaid RNA stabiliseerimiseks. Enamus töid, mis näitavad pseudouridiinide rolli RNA stabiliseerimisel, on tehtud tRNA-de kohta. tRNA^{Phe} pseudouridiin antigoodon heeliks-lingus (ASL) suurendab ASL-i termilist stabiilsust, kuid ei mõjuta selle tRNA ribosoomi seondumist. Samas on näidatud, et pseudouridiinide roll ASL-i stabiilsus ei ole seotud pseudouridiini positsiooniga N1, vaid tõenäoliselt hoopis pseudouridiini suuremas võimes *stackuda*, võrreldes uridiiniga (Joonis 5) (Yarian et al., 1999; Davis, 1995; Auffinger & Westhof, 1998). Tõenäoliselt on sellisel termilisel stabiliseerimisel suur roll mängida eelpool nimetatud pseudouridiini konformatsioonilise liikuvude vähenemisel (Auffinger & Westhof, 1998).

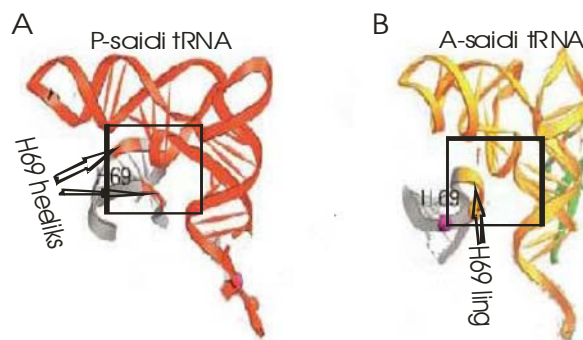
Heeliks-ling 69 (H69)

Heeliks-ling 69 asub 23S rRNA sekundaarstruktuuril neljandas domeenis (Joonis 1.). H69 koosneb üheksateistkümnest nukleotiidist, mis moodustavad heeliksi (6 aluspaari) ja selle tipus oleva lingu (7 nukleotiidi) (Joonis 6). Heeliks-ling 69 kui struktuur on eluslooduses hästi konserveerunud (Hirabayashi et al., 2006). H69 sisaldab pseudouridiine positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Joonis 6). 1915. positsiooni Ψ on lisaks kolmandast positsioonist metüleeritud ja 1915. positsiooni Ψ oli esimene modifitseeritud pseudouridiin, mis loodusest leiti (Kowalak et al, 1996). 23S rRNA-s on üldse kokku 14 metüleeritud alust (Smith & Cooperman, 1992) ja 10 pseudouridiini (Del Campo et al 2001) Siiani ei ole teada, milline ensüüm positsiooni 1915 metüleerib ja samuti ei ole teada, kas metülaas vajab substraadina uridiini või juba pseudouridiini. Positsiooni 1917 pseudouridiinid on teadaolevalt terves eluslooduses universaalselt konserveerunud, millest võib järeldada, et need on ribosoomide funktsioneerimiseks äärmiselt vajalikud. (Raychaudhuri et al, 1998).



Joonis 6. Heeliks 69 sekundaarstruktuur. Lisaks on märgitud pseudouridiinide positsioonid. Uridiinid, millele järgnevad A-d on modifitseeritud ja ainukesele modifitseerimata U-le järgneb C. Tähtedega A ja P on näidatud vastavalt A-saidi ja P-saidi tRNA-dega kontakteeruvad nukleotiidid.

H69 asub ribosoomi suure subühiku pinnal, mis assotseerub ribosoomi väikese subühikuga. See moodustab koos 16S rRNA heeliks 44-ga subühikute vahelise silla B2a (Joonis 3 A). Subühikute vaheline sild B2a on vaid rRNA-d sisaldav ribosoomi subühikute vaheline sild (Yusupov et al, 2001). Kristallograafilised uurimised on näidanud, et heeliksling 69 kuulub nii A kui P saidi koostisse ja arvatavasti kontakteerub mõlema saidi tRNA-dega. A saidi tRNA-dega kontakteeruvad lingus olevad nukleotiidid 1913-1915 (Joonis 7 B) ja P saidi tRNA-dega, heeliksis olevad nukleotiidid 1908-1909 ja 1922-1923 (Joonis 7 A), ning subühikute vahelise silla moodustamisel heeliks 44-ga osalevad lingus olevad nukleotiidid 1912-1914, 1918 ja heeliksis asuv nukleotiid 1919, mis on paardunud 1911-s positsioonid oleva pseudouridiiniga. (Joonis 6) (Yusupov et al, 2001).



Joonis 7. H69 kontaktid P-saidi tRNA-ga (A), ja A-saidi tRNA-ga (B). Nooltega on näidatud kontaktide kohad, P-saidi puhul kontakteeruvad tRNA-ga heeliksi nukleotiidid 1908-1909 ja 1922-1923 (A) ning A-saidi tRNA puhul on kontaktis lingus nukleotiidid 1913-1915 (B) (Yusupov et al, 2001).

Lisaks kontaktidele tRNA-ga on pakutud ka, et H69 kontakteerub erinevate ribosomaalsete faktoritega. Selle hüpoteesi põhjuseks on asjaolu, et osa ribosomaalseid

faktoreid seondub H69-le väga lähedale (*Rawat et al, 2003; Kalaholz et al, 2004; Agrawal et al, 2004; Valle et al, 2003*).

Mutatsioonid H69 positsioonides A1912 ja A1919 põhjustavad tugevat kasvu aeglustumist ning neid mutatsioone kandvad ribosoomid on inaktiivsed *in vitro* valgusünteesil. Positsiooni A1916G mutatsiooni sisaldavate ribosomaalsete 23S RNA-de ekspresseerimine rakkudes omab kasvule väikest efekti kuid takistab 50S subühiku 70S ribosoomi assambleerumist (*Liiv et al., 2005*). SSER (systematic selection of functional sequence by enforced replacement) uuringud on näidanud, et positsioonid A1912 ja U(Ψ)1917 on ribosoomi funktsioneerimiseks äärmiselt vajalikud, kuna selle meetodiga ei leitud nendesse positsioonidesse tekkinud mutatsioone (*Hirabayashi et al, 2006*). Mutatsioon U(Ψ)1915A põhjustab ribosomaalsete subühikute nõrgemat assotseerumist (*Hirabayashi et al, 2006*). Heeliks-lingu 69 lingu positsioonid A1916 ja A1918 ning ka heeliksi positsioon U1926 on 30S subühiku poolt keemiliste modifikatsioonide eest kaitstud (*Noller, 1991*). A1916 positsiooni puudumine ja mutatsioon positsioonis U1914, mis mõlemad asuvad heeliks-ling 69 lingu osas, vähendavad raaminihke tõenäosust, mis viitab sellele, et H69 on vajalik translatsiooni täpsuseks (*O'Connor & Dahlberg, 1995*). DMS modifikatsioon-analüüsid on näidanud, et aluste A1912 ja A1918 N1 positsioonide modifitseerimine DMS-ga, toob kaasa tõsised 70S subühikute assambleerumise defektid, mis viitab sellele, et H69 on vajalik 70S ribosoomide assotsiatsiooniks ja stabiliseerimiseks (*Maiväli & Remme, 2004*). Kuna mutatsioonid heeliks-lingus 69 omavad väga tugevaid fenotüübilisi efekte, võib järeldada, et tegemist on äärmiselt tähtsa elemendiga ribosoomis. Hämmastav on aga see, et terve heeliksi deleteerimine (Δ h69) ei põhjusta letaalseid efekte ribosoomi funktsioneerimises, nagu võiks oodata. Afiinsuspuhastatud Δ h69 ribosoomi mutantidel on *in vitro* transaltsiooni täpsus, täispikalt looduslikult mRNA-lt, sarnane metsik tüüpi ribosoomile. Samuti toimub metsik tüübiga võrreldav EF-G sõltuv translokatsioon (*Ali et al, 2006*). Siiski põhjustab heeliks-ling 69 deletsioon teatud defekte. Esiteks ei suuda Δ h69 50S ribosomaalne subühik ilma tRNA-ta assotseeruda 30S subühikuga. Samuti on selline 50S subühik defektne RF1 katalüüsitud peptiidi vabastamise suhtes ja ribosoom saab retsükleeruda ka ilma RRF-i abita (*Ali et al, 2006*). *In vivo* on siiski Δ h69 muatsioon rakkudele letaalne, millest võib järeldada, et lisaks juba mainitud defektidele võib see deletsioon põhjustada *in vivo* veel raaminihkeid ja raskendatud üleminekut initsiatsiooni faasist elongatsiooni faasi. Häiritud võib veel olla translatsiooni täpsus (*Ali et al, 2006*). Kahjuks ei ole kõike seda veel *in vivo* jõutud uurida.

Pseudouridiini süntaasid

Pseudouridiini süntaasid on posttranskriptsioonilised ensüümid, mis katalüüsivad RNA ahelas uridiinide (U) isomeriseerimist pseudouridiinideks (Ψ) RNA-des, peale RNA ahela transkribeerimist (Joonis 8). Pseudouridiini süntaasid on väga spetsiifilised ensüümid kuna *in vivo* katalüüsivad need isomerisatsiooni vaid RNA ahela kindlates kohtades. Iga Ψ sünteesitakse vaid ühe valgu poolt, kuid üks süntaas võib katalüüsida mitme uridiini isomeriseerimist (Wrzesinski *et al.*, 2000; Samuelsson & Olsson., 1990). Pseudouridiini süntaasid ei vaja oma reaktsiooni katalüüsimiseks lisaenergiat ega kofaktoreid (Charette & Gray., 2000; Samuelsson & Olsson., 1990). Siiski on praeguseks leitud üks pseudouridiini isomeraas, millele on kofaktoriks vajalik tsink, selleks ensüümiks on *S.cerevisiae* Pus1 (Arluison *et al.*, 1998). Eukarüootides on isomeriseerimisele kuuluva uridiini määramiseks vajalikud väikesed kiid RNA-d (Kiss 2001).

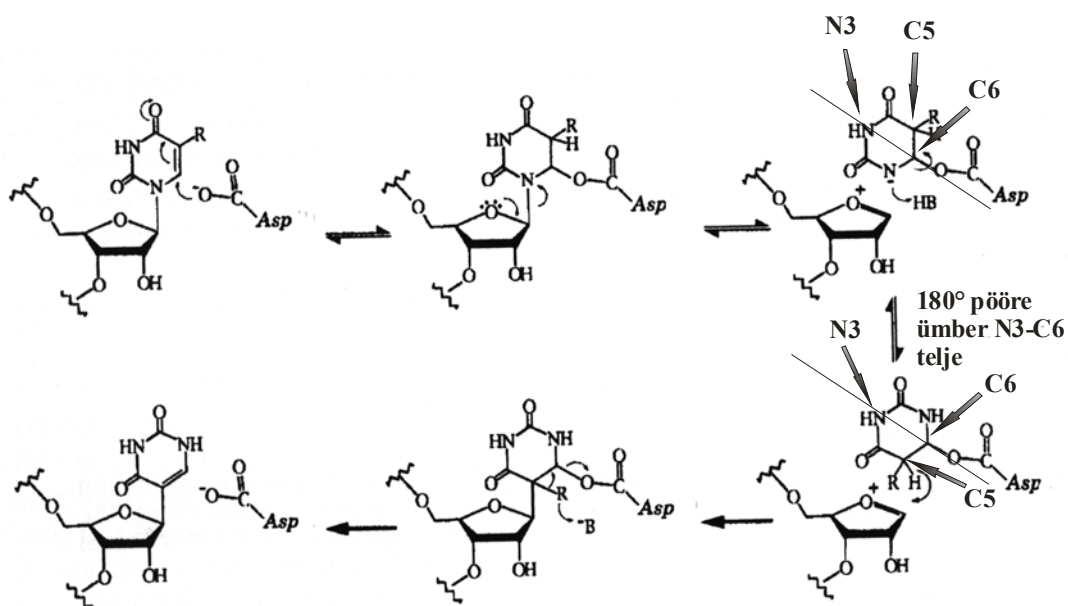
Pseudouridiini süntaasid on homoloogia alusel klassifitseeritud viide perekonda (TruD, TruA, TruB, RsuA ja RluA). Perekonnad on saanud oma nimed senimese ensüümi järgi, mis avastati *Escherichia coli*-st (Hamma & Ferre-D'Amare, 2006). Viimaste aastatega on igast perekonnast vähemalt üks esindaja kristalliseeritud, osadel juhtudel on kristalliseeritud valk koos seondunud substraadiga (Sivaraman *et al*, 2003; Hoang *et al*, 2006; Campo *et al*, 2004; Mizutani *et al*, 2004; Hoang & Ferre-D'Amare, 2004; Hur & Stroud, 2007). Perekondade sees on valgud suhteliselt konserveerunud, kuid perekondade vaheline homoloogia on suhteliselt väike. Perekonda kuuluvaid ensüüme leitakse järjestuse homoloogia alusel ja leitud ensüüme kontrollitakse eksperimentaalselt (Kaya & Ofengand, 2003). Perekondade vaheliselt on leitud struktuurseid erinevusi. Kõigil pseudouridiini süntaaside perekondadel on olemas motiiv II, mis arvatakse olevat katalüütilise tähtsusega (Koonin, 1996). Teine suhteliselt konserveerunud domeen on motiiv I, mis arvatakse olevat tähtis valgu stabiilsuse tagamisel (Spedaliere *et al*, 2000). Vähemalt kahel perekonnal on identifitseeritud ka motiiv III, millele pole veel ühest funktsiooni pakutud (Koonin, 1996).

Kõigis pseudouridiini süntaaside perekondades on kindlalt konserveerunud vaid üks aspartaat, mis asub katalüütilises saidis (Hamma & Ferre-D'Amare, 2006). See aspartaat on absoluutselt vajalik ensüümi funktsioneerimiseks, kuna selle konserveerunud aspartaadi vahetus mõne teise amino happe vastu inaktiveerib valgu täielikult, kuid ei takista ensüümi seondumist substraadiga (Ramamurthy *et al*, 1999). Motiivis I tihti esineva lüsiini vahetamine mõne teise aminohappe vastu, põhjustab ensüümi ebastabiilsemaks muutumise, kuid ei mõjuta olulisel määral substraadiga seondumist (Spedaliere *et al.*, 2000).

Pseudouridiinide süntaasid on väga spetsiifilised ensüümid. See tähendab, et substraadiks kasutatakse vaid kindlates positsioonides olevadi uridiine (Ofengand, 2002). Täpne substraadi äratundmise mehhanism ei ole veel selge, kuid erinevate süntaaside kohta on näidatud, need kriitilised punktid, mis on täpse positsiooni määramisel olulised. Näidatud on, et pseudouridiini süntaaside poolt substraadi ära tundmise puhul mängib tähtsat rolli substraadi sekundaar- ja tertsiaalstruktuur. (Hoang et al, 2006; Hoang & Ferre-D'Amare, 2001; Hoang & Ferre-D'Amare, 2004; Sivaraman et al, 2004). RluA puhul on näidatud ka primaarjärjestuse tähtsus (Hoang et al, 2006). Lisaks on näidatud, et substraaturidiinide isomeriseerimise efektiivsus heeliks-lingu lingu osas sõltub suurel määral heeliks-lingu paindlikusest, kui heeliks-lingu heeliksi osas muuta G-C paatid, mis vähendavad paindlikust, A-U paaride vastu, mis tagavad suurema paindlikuse, isomeriseeritakse substraate märgatavalt suurema efektiivsusega (Hur & Stroud, 2007). Substraadi pindlikuse ja uridiini isomeriseerimise efektiivsuse vahel on näidatud veel pseudouridiini süntaaside TruD (Kaya & Ofengand, 2003) ja TruB (Gu et al., 1998) puhul.

Praegusel hetkel kõige tõenäolisem uridiini pseudouridiiniks isomeriseerimise reaktsiooni mudel, on tugevas sõltuvuses pseudouridiini süntaasides tugevalt konserveerunud aspartaadist (Joonis 8). Selle mudeli järgi on isomerisatsiooni esimeskes reaktsiooniks konserveerunud aspartaadi poolt läbi viidav nukleofiilne rünnak uridiini kuuenda positsiooni süsiniku vastu, mille tulemusena katkestatakse N1-C1' glükosiidne side ja eemaldadakse alus riboosi jäägi küljest. Vabastatud alus ei saa aga lahkuda, kuna see on jätkuvalt seotud C6 positsiooni kaudu pseudouridiini süntaasi aspartaadiga. Uridiini alus pööratakse 180° ümber oma N3-C6 telje ja luuakse uus side uratsiili jäägi positsiooni C5 ja riboosi jäägi positsiooni C1' vahel (Joonis 8). Kuna isomerisatsioonil tekkiv C5-C1' vaheline side on stabiilsem kui N1-C1' side, siis saab see reaktsioon kulgeda ilma energia lisamiseta (Chatrette & Gray., 2000; Foster et al., 2000; Gu et al 1999, Huang et al., 1998).

Lisaks eelpool kirjeldatud uridiini isomeriseerumise mehhanismile on pakutud ka teist, mõnevõrra erinevat mehhanismi. Siin on pakutud, et katalüütiline aspartaat tekitab nukleofiilse rünnaku riboosi positsioonile C1', mis põhjustab uridiini ja riboosi vahelise sideme katkemise. Täpset uridiini isomeriseerimise mehhanismi, mille järgi tegelikult looduses isomerisatsioon toimub, ei ole aga siiani õnnestunud kindlaks teha (Gu et al., 1999).



Joonis 8. Oletatav pseudouridiini isomeraasi poolt katalüüsitud reaktsiooni skeem. Aspartaat viib läbi nukleofiilse rünnaku uridiini aluse C6 positsiooni suhtes ja katkestab sideme aluse ja riboosi vahel. Näidatud on positsioonid N3 ja C6, millede telje mööda toimub 180° pööramine, et tekiks uridiinist pseudouridiin (Foster et al., 2000).

Selleks, et pseudouridiini süntaas saaks oma funktsiooni täita, peab ta ära tundma oma substraadi, kuid sellest üksi ei piisa, et uridiini isomeriseerida. Selleks, et märklaud uridiini isomeriseerida, tuleb vastav alus RNA ahelast välja pöörata, et reaktsioon selle aluse oleks võimalik (Hoang & Ferre-D'amare, 2001; Chaudhuri et al., 2004; Hoang et al., 2006). Eukarüootides on substraataluse RNA ahelast eemale pööramise probleem lahendatud sellega, et isomeriseerimise positsiooni leidmiseks kasutatakse väikeseid kiid RNA-sid, mis paarduvad märklauaga ja ainuke paardumata positsioon RNA-s on isomeriseerimisele kuuluv uridiin (Schattner et al., 2004). Pseudouridiini süntaas RluA, mis modifitseerib nii 23S rRNA-d, kui ka tRNA-sid, indutseerib tRNA ASL-ga seondumisel pööratud Hoogsteen paari moodustumise U33 ja A36 vahel, mille tagajärjel pööratakse substraadiks olev U32 ahelast välja ja isomeriseeritakse ensüümi poolt (Hoang et al., 2006). Kui RluA indutseerib substraadiga seondudes koheselt suured konformatsioonilised muutused substraadis, siis pseudouridiini süntaas TruA, seondudes substraadiga koheselt suurt konformatsioonilist muutust ei indutseeri (Hur & Stroud, 2007). TruA substraadiks on tRNA^{leu} ASL. TruA ei põhjusta esmasel seondumisel oma substraadiga olulist konformatsioonilist muutust, ega lase esmasel seondumisel substraati ka aktiivsaiti. Alles peale esimest seondumist võetakse substraat aktiivsaiti ja indutseeritakse substraataluse välja pööramine, millega kaasnevad suuremad konformatsioonilised muutused, ning viimine konserveerunud aspartaadi lähedusse. On näidatud, et TruA kasutab oma substraadiks oleva aluse välja pööramiseks

arginiini, mis arvatavalt stabiliseerib välja pööratavat alust ja suunab substraadi katalüütilise aspartaadi lähedusse. Arginiini poolt vahendatud aluse välja pööramine on koht-, mitte aluse spetsiifiline (*Hur & Stroud, 2007*). Arginiin, mis TruA puhul vahendab aluse välja pööramist, on konserveerunud TruA, RluA ja RsuA perekonna pseudouridiini süntaasides, mistõttu ei saa selline arginiini poolt vahendatud aluse välja pööramine olla absoluutne kõigi pseudouridiini süntaaside puhul (*Hur & Stroud, 2007*). Substraadis indutseerivad suuri konformatsioonilisi muutusi ka teised RNA-d modifitseerivad ensüümid, näiteks metüültransferaasid (*Lebars et al., 2003*). Pseudouridiini süntaasid mitte ainult ei oma substraadile komplementaarset aktiivsaiti, mis katalüüsib nii aluse välja pööramist, kui ka uridiini isomeriseerimist pseudouridiiniks, vaid tõenäoliselt vähendavad need tundmatu mehhanismi abil kineetilist barjääri, mis võimaldab substraadil nii suuri konformatsioonilisi muutusi läbi teha (*Chaudhuri et al., 2004*).

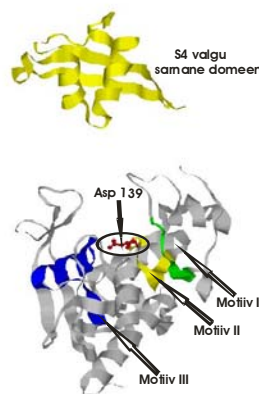
Pseudouridiini süntaas RluD

RluD on pseudouridiini süntaas, mis isomeriseerib pseudouridiinideks kolme uridiini. Kõik kolm isomeraseeritavat uridiini asuvad funktsionaalselt tähtsas heeliks-lingu 69 positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (*E.coli* numeratsioon) (*Huang et al, 1998*). RluD kuulub RluA perekonda (*Sivaraman et al, 2004*). Nagu tema substraat (H69), on ka RluD rakkude kasvuks väga oluline. RluD geeni deleteerimine rakkudest toob kaasa rakkude kasvu kuuekordse aeglustumise vedelsöötmes ja muutused ribosoomi partiklite assambleerumises (*Gutgsell et al, 2005*).

Nagu suurem osa pseudouridiinide süntaase, on RluD jaotatud kolme motiivi. C-terminaalne motiiv I, keskne motiiv II ja N-terminaalne motiiv III. Motiivist I ei ole leitud katalüütiliselt tähtsaid aluseid, kuid tõenäoliselt on see motiiv tähtis ensüümi stabiilsuse seisukohast (*Sivaraman et al, 2004; Spedaliere et al, 2000*). Motiivis II asub universaalselt konserveerunud aspartaat, mis asub ensüümi pinnal oleva lõhe põhjas (Joonis 9) (*Del Campo et al 2004; Ramamurthy et al 1999*). Motiivi III külge on seotud S4 valgu sarnane domeen, mis on seotud ülejäänud ensüümiga väga paindliku linkerit kaudu. Erinevad RluD-st saadud kristallide vormid on näidanud, et S4 „saba” ja ensüümi „keha” näitavad koos üles väga suurt paindlikust. Parema difraktsiooni saamiseks lõigati see domeen enne kristalliseerimist valgu küljest lahti (*Sivaraman et al, 2004*). S4 domeeni ja ülejäänud ensüümi vahelist linkerit ei ole võimalik kristallstruktuurilt näha, tõenäoliselt on põhjus selles, et selle paindlikuse tõttu on seda

raske tuvastada, kuid tõenäoline on ka see, et proteaasid on selle ensüümi küljest lahti lõiganud (Joonis 9) (*Foster et al, 2006; Del Campo et al. 2004*). S4 tüüpi domeeni on nähtud mõnedel RsuA ja RluA perekonna valkude N-terminustes. Lisaks pseudouridiini süntaasidele on analoogseid S4 domeene leitud ka teiste RNA-d siduvate valkude küljest (*Sivaraman et al, 2004; Del Campo et al 2004*).

RluD motiivis II asub tsentraalne lõhe, mis on umbes 25 Å pikk, 10-12 Å lai ja 14-20 Å sügav see lõhe asub täpselt katalüütilise domeeni keskel ja selle seinad koosnevad enamjaolt arginiini ja lüsiini jääkidest, mis muudavad lõhe sisemuse väga positiivselt laetuks. Positiivne laeng aga soodustab katalüütilisse lõhesse negatiivse laenguga RNA seondumist. Katalüütilise lõhe põhjas asub veel keskne õõnsus, kus asub konserveerunud ja katalüüsiks vajalik aspartaat ning lisaks sellele veel threoniini, leutsiini, isoleutsiini arginiini jäägid, mis on selles positsioonid suhteliselt konserveerunud ka teistes pseudouridiinide süntaaside perekondades (*Del Campo et al 2004; Sivaraman et al, 2004*). Kristallstruktuurilt on näha, et kui esüüm pole RNA-ga seondunud, siis tema katalüütiline lõhe ei ole tühi, vaid sellesse on seondunud ensüümi enda negatiivselt laetud S4 saba osa, varjates selle lõhe ja kaitses seda ajal, kui sinna ei ole seondunud substraat. Siiski pidasid autorid seda nähtust kristalli pakkumise artefaktiks, sest see lõhe on siiski mõeldud RNA sidumiseks (*Del Campo et al, 2004*). Pseudouridiini süntaas TruA puhul on näidatud teistsugust aktiivsaiidi kaitsmise mehhanismi. Vabas olekus TruA aktiivsait on suletud olekus, aktiivsaiidi läbimõõt 12 Å. Peale esmast seondumist substraadiga avatakse aktiivsait ja selle läbimõõt suureneb 20 Å-i (*Hur & Stroud, 2007*).



Joonis 9. Pseudouridiini süntaasi RluD kristallstruktuur. Joonisel on näidatud motiivide I, II ja III asukohad ja S4 valgu taoline domeen. Lisaks on ringiga tähistatud keset kesket, katalüütilist lõhet asuv 138. positsiooni aspartaat, mis on kõigis pseudouridiini süntaaside perekondades universaalselt konserveerunud. Kujutis on modelleeritud programmiga Ras Mol ja kristallstruktuur on Foster-i ja kaastöötajate poolt avaldatud 2006.

RluD on substraadi suhtes väga spetsiifiline, isomeriseerides *in vivo* vaid 23S rRNA positsioonide 1911, 1915 ja 1917 uridiine. Siiani ei ole teada, mille järgi RluD oma substraadiks olevaid uridiine täpselt ära tunneb, kuid *in vivo* tunneb see ensüüm ära vaid neid kolme positsiooni (Huang *et al*, 1998; Gutgsell *et al*, 2001; Gutgsell *et al*, 2005; Raychaudhuri *et al*, 1998). Praeguseks on teada, et substraadi ära tundmiseks ei ole vajalikud ribosomaalsed valgud (Raychaudhuri *et al*, 1998; Wrzesinski *et al*, 2000). Tõenäoliselt peetakse, et mingisugusel määral mängib pseudouridiini süntaaside jaoks rolli substraadi konformatsioon, kuna suvalises konformatsioonis ja suuruses RNA ei sobiks katalüütilise lõhe konformatsiooniga (Sivaraman *et al*, 2004; Hoang & Ferre-D'Amare, 2001). Osadel pseudouridiini süntaasidel (nt. RluA) on näidatud ka substraadi primaarjärjestus võib olla oluline, kuid RluD puhul ei ole primaarjärjestuse tähtsust veel tuvastatud (Hoang *et al*, 2006; Wrzesinski *et al*, 1995; Hamma *et al*, 2006). On pakutud, et RluD tunneb ära heeliks-lingu 69 ja isomeriseerib pseudouridiinideks kõik uridiinid, mis asuvad lingu osas ja lingu vahetus läheduses (Ofengand, 2002). *In vitro* katsed on näidanud, et rakuväliselt kaotab RluD olulisel määral oma spetsiifika. Nimelt *in vitro* tingimustas on RluD-le substraadiks nii *in vitro* transkribeeritud 16S kui 23S rRNA uridiinid, sealjuures isomeriseeritakse 23S-is oluliselt rohkem uridiine, kui *in vivo*. *In vitro* modifitseeritakse 23S-is iga kahekümne uridiini kohta üks uridiin ja 16S-is iga kaheksa uridiini kohta üks uridiin. Siisiki ei kaota ensüüm oma spetsiifilisust täielikult, *in vitro* transkribeeritud tRNA-d RluD substraadina ära ei tunne (Huang *et al*, 1998). On näidatud, et RluD on ebaspetsiifilisem madalamatel magneesiumi kontsentratsioonidel. Kui lasta RluD-l modifitseerida RNA-sid *in vitro*, erinevatel Mg^{2+} kontsentratsioonidel, siis madalamatel kontsentratsioonidel isomeriseeritakse proportsionaalselt (U/Ψ) rohkem uridiine pseudouridiinideks. Mg^{2+} kontsentratsioonil 2 mM, modifitseeritakse 70% rohkem uridiine, kui *in vivo* (Wrzesinski *et al*, 2000).

RluD pakub teadlastele suurt huvi ka selle tõttu, et sellele on omistatud lisaks pseudouridiinide sünteesimisele rRNA ahelasse ka teine funktsioon. Nagu eelpool mainitud, põhjustab RluD puudumine rakust, kasvukiiruse vähenemise ja ribosomaalsete subühikute assambleerumise defekte. Katsed on aga näidanud, et kui muteerida katalüütiliselt lähtis aspartaat 139 ja ekspresseerida selliseid mutantseid RluD-sid rakkudes, kus puuduvad metsik tüüpi RluD-d, siis oodatult puuduvad H69 pseudouridiinid, kuid samas taastub ka rakkude kasvukiirus vedelsöötmes (Gutgsell *et al*, 2001). Siiski selline kasvu taastumine ei ole olnud hiljem reprodutseeritav ja autorid on spekulerinud, et algse tulemuse põhjustas mõni tundmatu, fenotüübiline efekti kompenseeriv, lisamutatsioon (Gutgsell *et al*, 2005).

RluD valgu geeni inaktiveerimine bakteri rakkudes toob kaasa kasvukiiruse olulise vähenemise, kuid mõne aja möödudes ilmuvad tassidele kiiresti kasvavad kolooniad. Neid kolooniaid moodustavatest rakkudest eraldatud rRNA-des puuduvad küll positsioonide 1911, 1915 ja 1917 pseudouridiinid, kuid rakud on võimeliselt kasvama metsiktüübiga võrreldava kiirusega ja ka sahharoosi gradiedi profiilides ei ole enam assambleerumise defekte näha (*Gutgsell et al, 2005*). Selliseid mutantseid RluD-sid sisaldavaid, kuid normaalse kiirusega kasvavaid rakke kutsutakse pseudorevertantideks. Lisaks RluD-le on sellist fenomeni, kus ilma nähtava põhjusega hakkavad rakud ilma eluks vajaliku geeni produktita normaalselt kasvama, näidatud ka metülaaside puhul (*Liu et al., 2004*).

Nagu juba eelpool mainitud, on RluD ainuke pseudouridiini süntaas, mille puudumine *E.coli*-st omab rakkude elule märkimisväärselt tugevat efekti. Seda on püütud põhjendada asjaoluga, et see ensüüm isomeriseerib ühes heeliks-lingus kolme uridiini, kui teised pseudouridiini süntaasid suudavad isomeriseerida vaid ühte kuni kahte uridiini 23S rRNA-s. Seega saaks RluD inaktiveerimist võrrelda kolme tavalise pseudouridiini süntaasi inaktiveerimisega (*Wrzesinski et al 2000*).

Materjal ja metoodika

Kemikaalid ja ensüümid

Restriktaasid, IPTG, T4 polünukleotiidi kinaas, AMV pöördtranskriptaas, PWO DNA polümeraas olid firmadelt „Fermentas“, „Seikagaku America“, „Roche Diagnostics“. Ampitsiliin ja tetratsükliin firmadelt „Balkanpharma“ ja „Sigma“. Radioaktiivsed isaotoobid $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ ja $\gamma^{32}\text{PdATP}$ firmalt „GE Healthcare Bio Sciences AB“. SDS ja CMCT firmadelt „Amresco“ ja „Aldrich“. Streptavidin Sepharose- „GE Healthcare Bio Sciences AB“. Puhvrid P1, P2 ja P3 firmalt „Quiagen“ ning restriksioonipuhvrid firmalt „Fermentas“.

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit firmalt „Amersham“ ja Sequenase version Sequencing Kit firmalt „USB“. „MoBio“ Agaroosgeelist DNA puhastamise Kit. Nucleotide removal kit firmalt „Qiagen“.

2X YT sööde

1 liitri dH₂O kohta 16g trüptooni, 10g pärmiekstrakti, 5g NaCl

SOB- sööde

1 liitri dH₂O kohta 20g trüptooni, 5g pärmiekstrakti, 0,5g NaCl, 10ml 250mmol KCl

Puhver RF1 (pH 5,8)

Ühes liitri puhvri kohta 12g RbCl, 9,9g MnCl₂ X 4H₂O, 30ml KAc (1M pH 7,5), 1,5g CaCl₂ X 2H₂O, 105g glütserooli

Puhver RF2 (pH 6,8)

Ühe liitri puhvri kohta 20ml 0,5M MOPS, 1,2g RbCl, 11g CaCl₂ X 2H₂O, 150g glütserooli

1X TBE

90mM Tris-boraat, 2mM EDTA

1X TAE

40mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA

Lüüsi puhver (LP)

60mM KCl, 60mM NH₄Cl, 50mM Tris HCl pH 8, 6mM MgOAc, 6mM β-ME, 16% sahharoos.

Lüüsi lahjenduspuhver (LLP)

60mM KCl, 60mM NH₄Cl, 10mM Tris HCl pH 8, 12mM MgOAc, 6mM β-ME.

Dissotsiatsiooni puhver DP (1XLLP 1mM Mg)

60mM KCl, 60mM NH₄Cl, 10mM Tris HCl pH 8, 1mM MgOAc, 6mM β-ME.

BEU puhver

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

1M CMCT/BEU puhver-1M CMCT BEU puhvr

NPK puhver

20mM NaHCO₃, 30mM Na₂CO₃, 2mM EDTA

RT-STOP

96% etanoolis lahustada 75mM lõppkonsentratsiooniga NaOAc

10X PCR-i puhver

750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM NH₂SO₄, 0,1% Triton X 100, 5% ficoll 400, 10mM tartazine

5X hüridisatsiooni puhver (HB)

225mM K-HEPES pH7, 450mM KCl

10X pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhver (RT-RB)

500mM Tris-HCl (pH8,3), 750mM KCl, 30mM MgCl₂

Formamiidi STOP (FS)

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

dNTP(-C)

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

40% Akrüülamiid-bis-akrüülamiid

Kaaluda 19g akrüülamiidi ja 1g bis-akrüülamiidi ning viia maht ddH₂O-ga 50 milliliitrini

12% UUREA-polüakrüülamiid geel (12% PAAG)

1X TBE, 8M UUREA, 12% Akrüülamiid-bis-akrüülamiid

7% UUREA-polüakrüülamiid geel (7% PAAG)

1X TBE, 8M UUREA, 7% Akrüülamiid-bis-akrüülamiid

Aparatuur

Ultratsentrifuugfuug Beckman L8

Tsentrifuug RC-5B

Lauatsentrifuugid Heraeus fresco ja Heraeus pico

Spektrofotomeeter- Biophotometer (Eppendorf) ja Uvicord (LKB)

Isekirjutaja- LKB

Peristaatiline pump- LKB

Phosphoimager Typhoon TRIO- Amersham Biosciences

Geeli vaakumkuivati- Biometra

Oligonukleotiidid

	Oligonukleotiidide järjestused 5' - 3'
MPC52	GCG GAA GAT GTA ACG
C5	TTT CAA GGT CGG CTC CAT GC
U1	CAG CCT GGC CAT TAC GCC
Mini taq	CAA AAG GTA CGC AGT CAC ACG C
C11	CTA CAG AAT ATA AGT CGC TG
T7	GGG CAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCT AGA GGC CCA GGA CAC
C2	GTC GGT TCG GTC CTC CAG
CD1	GAG ATT CCC CCA GTA GCG GCG

	Punktmutatsioonidega oligonukleotiidide järjestused 5' - 3'
A1916UMut dir	ACG GCG GCC GTA ACT TTA ACG GTC CTA AGG
A1916UMut rev	ACC TTA GGA CCG TTA AAG TTA CGG CCG CCG
A1916CMut dir	ACG GCG GCC GTA ACT CTA ACG GTC CTA AGG
A1916CMut rev	ACC TTA GGA CCG TTA GAG TTA CGG CCG CCG

(Tumedalt on märgitud punktmutatsioonide asukoht oligonukleotiidis)

Plasmiidid

Plasmiid pLKDH5 sisaldab *rrnB* operoni temperatuuritundliku λP_L promootori kontrolli all 23S rRNA heeliks-lingu 25 regiooni on lisatud streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment ja 16S rRNA-s asub mutatsioon C1192U, mis tagab rakkudele streptomütsiini resistentsuse (Leonov et al., 2003).

Plasmiid p7XB sisaldab XbaI-BamHI fragmenti *rrnB* operonist kloneerituna λP_L promootori kontrolli alla. Ekspressioonivektor ptBsB sisaldab BstEII-BamHI fragmenti *rrnB* operonist indutseeritava *tac* promootori kontrolli all. Ekspressioonivektor ptBB sisaldab tervet *rrnB* operoni (v.a. promootori piirkond) indutseeritava *tac* promootori kontrolli all (Lewicki et al., 1993).

Plasmiid ptBsB 2Δ, on ptBsB derivaat, mille 23S rRNA-st on deleteeritud positsioon C2507. ptBsB 2ΔDM on ptBsB derivaat, mille 23S rRNA geen sisaldab mutsiooni G2581A ning deleteeritud on positsioon A2589 (*Spahn et al.*, 1996; Christjan Spahn'i kingitus)

Plasmiid pKK3535 on pBR322 derivaat, mis sisaldab täispikka *rrnB* operoni natiivsete rakuliste promootorite, P1 ja P2 kontrolli all (*Leclerc & Brakier-Gingras 1989*).

E.coli tüved

E.coli tüvi XL1-Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ . F' [proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)])

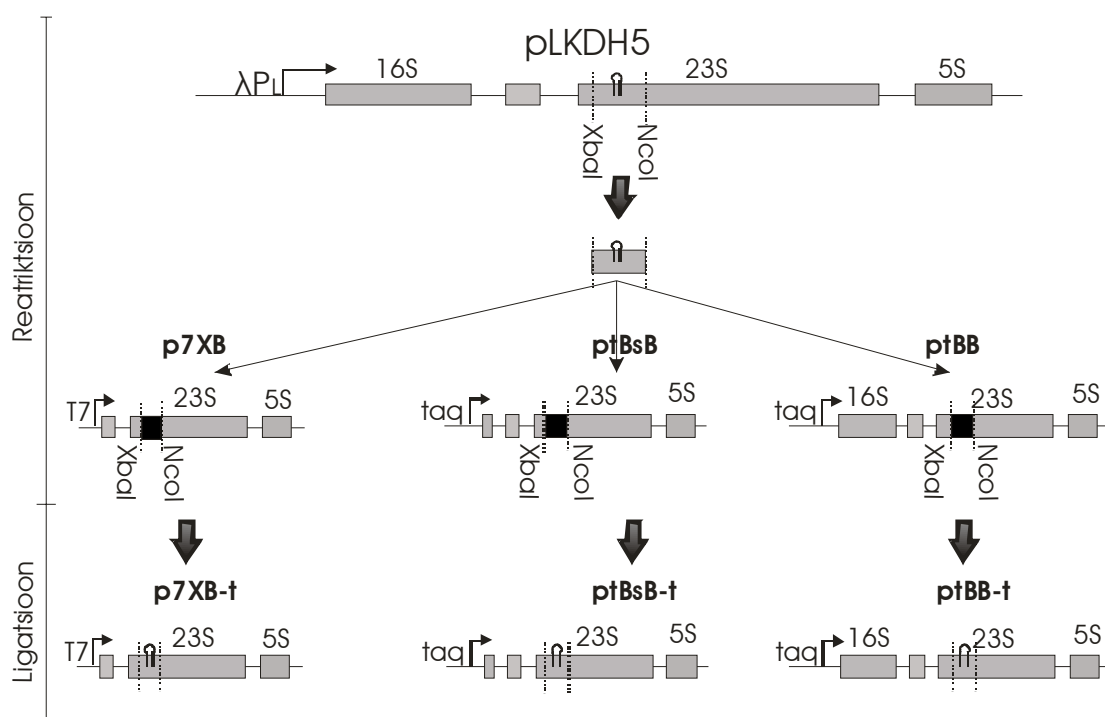
E.coli tüvi MC315 (Δ7), on MG1655 derivaat, millest on deleteeritud kõik kromosomaalsed ribosomaalse rRNA operonid (Michael O'Connor'i kingitus).

E.coli tüvi RluD⁻ on MG1655 derivaat, millest on deleteeritud genoomsed RluD geenid (konstrueeritud Lauri Peil'i poolt).

Ekspressioonivektorite konstrueerimine

rRNA ekspressioonivektorite klonereimine ja mutagenees

Joonisel 10 on kujutatud klonereimise skeem, mille järgi streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment klonereeriti plasmiididesse p7XB, ptBsB ja ptBB. Klonereimiseks kasutati metsiktüüpi plasmiidist XbaI-NcoI fragmendi vahetamist streptavidiini ligandi kodeerivat DNA lõiku sisaldava fragmendi vastu, mis oli pärit plasmiidist pLKDH5. Ligandi kodeeriva DNA lõigu olemasolu plasmiidides p7XB-t, ptBsB-t ja ptBB-t, kontrolliti restriksiooniga SacI-NcoI ja DNA järjestuse määramisega.



Joonis 10 . Streptavidiini siduvat ligandi kodeeriva DNA fragmendi klonereimine p7XB, ptBsB ja ptBB vektoritesse. Vektorite p7XB, ptBsB ja ptBB XbaI-NcoI restriksioonifragmendi vahetamine vektorist pLKDH5 pärit fragmendi vastu. Sümbol (-t) tähistab affiinsus tag-i olemasolu plasmiidis.

Mutatsioonide sisse viimiseks 23S rRNA heeliks-lingu 69 kasutati suunatud mutageneesi. PCR mutagenees viidi läbi kahes osas, joonisel 11 oleva skeemi järgi. PCR-id toimusid järgmistel tingimustel:

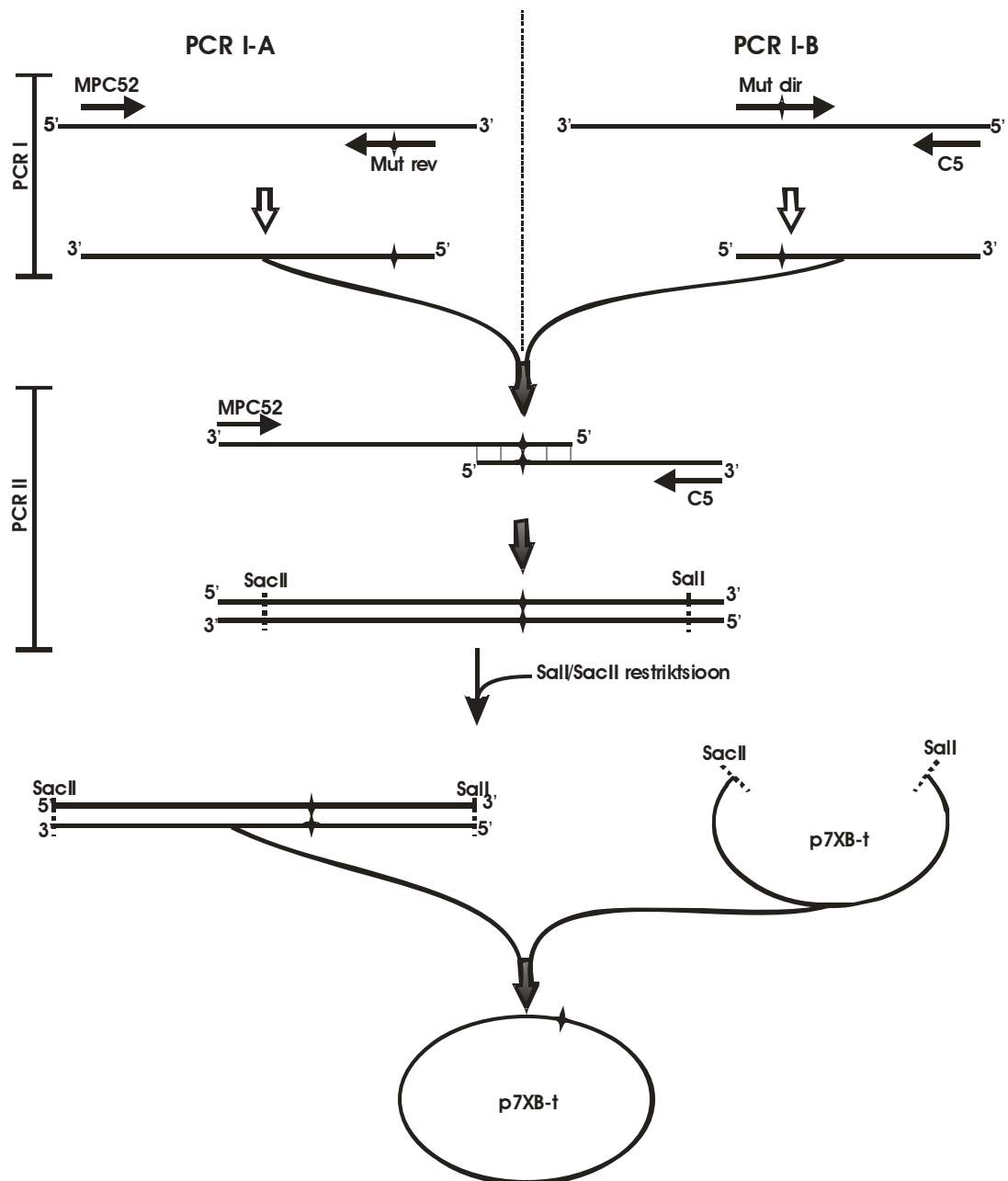
1. +94°C 3 minutit
2. +93°C 30 sekundit
3. +54°C 40 sekundit
4. +72°C 1,5 minutit
5. +72°C 7 minutit

Tsükklit 2-4 korrati 29 korda.

PCR-i fragmenti restrikteeriti SacII-BspMII-ga. Restriksioone viidi läbi kahes osas ja restriksioonipuhvri vahetamiseks puhastati DNA restriksioonisegust välja MoBio geelist puhastamise kitiga. Ligatsiooniseguga transformeeriti XL-1 blue rakke. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati minipreparatsiooni meetodit. Plasmide kontrilloti AvaI ning SacI-NcoI restriksiooniga. Positiivsetest kolooniatest eraldatud plasmidi kontrolliti sekveneerimise teel. Punktmutatsioonide viimiseks plasmidist p7XB-t, plasmidi ptBB-t, vahetati XbaI-BamHI fragment metsiktüüpi plasmidis ptBB-t mutatsiooni sisaldava fragmendi vastu.

DNA puhastamine restriksioonisegust

DNA puhastamiseks geelist või lahusest kasutati MoBio geelist puhastamise kit-i. Restriksioonisegule lisati 4,5 mahtu ULTRA SALT-i (MoBio) ja 50% räni suspensiooni 5µl plus 1µl iga mikrogrammi DNA kohta. Suspensiooni segati väristajal 6 minutit, tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13 000 rpm 30 sekundit ja pesti sadet ULTRA WASH-ga (MoBio) kaks korda. Sade kuivatati +37°C 10 minutit ja DNA elueeriti räni küljest ddH₂O-ga. Räni sadestati lauatsentrifuugis 13 000 rpm 3 minutit ja DNA vesilahus tõsteti uude reaktsioonituubi.



Joonis 11. Suunatud mutagenees. Mut rev ja Mut dir tähistavad mutatsioonoligonukleotide. Sümboliga ♦ on tähistatud mutatsiooni koht 23S rRNA-d kodeerivas DNA ahelas. PCR I ja PCR II tähendavad vastavalt kas esimest või teist PCR-i, mis tehti suunatud mutageneesi läbi viimiseks 23S rRNA-d kodeerivasse plasmidi. Esimeses PCR-s sünteesitud DNA fragmente kauatati teises PCR-s matriitsina, et mõlemasse DNA ahelasse mutatsioon sisse viia. PCR II produkti ja plasmidi p7XB-t rastrikteeriti ensüümidega SacII-SalI ning plasmidi fragment vahetati sünteesitud fragmendi vastu.

Plasmiidse DNA eraldamine minipreparatsiooni meetodil

LB plaadilt külvati üks bakterikoloonia 2 milliliitrisse 2X YT söötmesse (Amp 100µg/ml) ja inkubeeriti loksutis üleöö, temperatuuril +37°C. Rakud koguti tsentrifuugimisega 13 000 rpm 2 minutit, +4°C (lauatsentrifuug). Bakterimass resuspendeeriti

150 mikrolitris puhvris P1, lisati 150µl puhvrit P2 ja inkubeeriti viis minutit toatemperatuuril. Lisati 150 mikrolitrit puhvrit P3 ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, misjärel lisati 300 mikrolitrit 4M NaClO₄, inkubeeriti kolm minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13 000 rpm 15 minutit, +4°C. Supernatant (~700µl) tõsteti uude reaktsioonituubi ja lisati 1300 mikrolitrit 5M GuTCN. Lisati 15 mikrolitrit 50% ränisuspensiooni, segati vorteksil kolm minutit ning räni sedimenteeriti lauatsentrifuugis 6000rpm 30 sekundit. Sadet pesti kolm korda 1ml 70% etanooliga ja kuivatati 10 minutit temperatuuril +37°C. Plasmiidne DNA elueeriti ränilt ddH₂O-ga inkubeerides 3 minutit temperatuuri +37°C. Räni sadestati tsentrifuugimisel 13 000 rpm 3 minutit, +4°C (lauatsentrifuug), misjärel puhas DNA vesilahus tõsteti uude tuubi.

Sekveneerimine USB kit-ga

DNA sekveneerimiseks võeti 0,5-3µg plasmiidi, lisati 2-4pmol praimerit ja 2µl 1M NaOH-d, lõppruumala viidi 11 mikrolitriini ddH₂O-ga. DNA-d denatureeriti +37°C 10 minutit. Reaktsioonisegu neutraliseeriti 2µl 1M HCl ja 2µl Plasmid reaction puhvri (USB) lisamisega. Reaktsioonisegu inkubeeriti +37°C 10 minutit ja jahutati jääl. Inkubeerimise ja jahtumise ajal pandi eraldi reaktsioonitubidesse valmis 2,5µl ddATP, ddCTP, ddGTP ja ddTTP terminatsioonisegud (USB). Jahtunud reaktsioonisegudele lisati 1µl 0,1M DTT-d, 2µl 1X märgistamise segu (USB), 0,3-0,8µl α³²PdCTP-d ja 3U USB sekvenaasi. Märkimisreaktsiooni inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, samal ajal eelsoojendati terminatsioonisegud +37°C. Igale terminatsioonisegule lisati 4,5 mikrolitrit märgistatud segu ning inkubeeriti +37°C 5 minutit. Reaktsioon termineeriti 4µl formamiidi stop lahuse (FS) lisamisega. Proovid denatureeriti +95°C 3 minutit ja DNA fragmendid lahutati 7% UUREA-PAAG elektroforeesil. Geel kuivatati vaakumkuivatis +80°C üks tund ning tulemusi analüüsisti phosphoimageri ja ImageQuqnt programmiga.

Sekveneerimine DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit-ga

Sekveneerimiseks kasutati PCR-ga amplifitseeritud (C5, MPC52) 23S rRNA geeni fragmenti. Saadud DNA-le teostati 1U ensüümidega ExoI ja SAP vastavalt eksonukleaasi ja fosfataasi töötlus +37°C 30 minutit lõppmahus 11µl. Ensüümid inaktiveeriti temperatuuril +80°C 15 minutit. DNA fragmentide järejstused määrati eraldi kodeerivalt (praimer MPC52)

ja matriitsahelalt (praimer C5). Sekveneerimisreaktsiooniks võeti 0,1-0,5µg eelnevalt töödeldud DNA fragmente, lisati nendele vastavalt kas 4pmol MPC52 või C5 praimerit, 3µl 1X reaktsioonipuhvrit (Amersham) ja 4µl DYE segu, (1µl DYE reagenti (Amersham) + 3µl 2,5X lahjenduspuhvrit (200mM Tris-HCl pH9, 5mM MgCl₂), reaktsioonisegu lõppruumla oli 10 mikrolitrit. Sekveneerimisreaktsioonid viidi läbi, järgmistel tingimustel:

1. 95°C 20 sekundit
2. 50°C 20 sekundit
3. 60°C üks minut

Tsükklit 1-3 korrati 33 korda

Reaktsioonisegust DNA sadestamiseks, lisati 2µl dekstraani, 33µl külma 96% etanooli (-20°C). Proovid sadestati -20°C üks tund ja tsentrifuugiti 13 000rpm 20 minutit (lauatsentrifuug). DNA sadet pesti 2 korda 180µl 70% etanooliga, kuivatati 10 minutit toatemperatuuril ja lahustati 3 mikrolitris STOP puhvris. DNA fragmendid lahutati kapillaarsekvenaatoris ABI377.

Ribosoomide kasvatamine ja analüüs

Töös kasutatud 23S rRNA variante U1911C, C1914A, U1915C, A1918G ekspresseeriti plasmiidilt pKK3535, *E.coli* MC315 tüves. Variante Δ2507 ja G2581A, Δ2589 ekspresseeriti plasmiidilt ptBsB-t, *E.coli* XL-1 blue tüves. Kõik eelpool mitte mainitud 23S rRNA variante ekspresseeriti plasmiidilt ptBB-t, *E.coli* XL-1 blue tüves.

Rakkude kasvukiiruse mõõtmine

LB plaadilt külvati üks bakterikoloonia 2 milliliitrisse 2X YT söötmesse millele oli lisatud ampitsiliin 100µg/ml. 2ml 2X YT söötmes üleöö (+37°C) kasvanud kultuurist tehti 500 kordne lahjendus 100 milliliitrisse 2X YT söötmesse (Amp 100µg/ml). Kultuuri kasvatati, kuni optilise tiheduseni OD₆₀₀=0,05 ja indutseeriti IPTG lisamisega lõppkonsentratsioonis 1mM. Peale indutseerimist jätkati kasvatamist ja eemladati iga 30 minuti järel üks milliliiter kultuuri, mille optiline tihedus mõõdeti (OD₆₀₀).

Rakkude kasvatamine ja lüüs

LB plaadilt külvati üks bakterikoloonia 2 milliliitrisse 2X YT söötmesse (Amp 100µg/ml) ja inkubeeriti loksutis üleöö. Bakterikultuur külvati ümber 400ml 2X YT söötmesse (Amp 100µg/ml). rRNA ekspressioon plasmiidilt indutseeriti optilisel tihedusel 0,1-0,2 (OD₆₀₀) IPTG-ga (lõppkonsentratsioon 1mM) ja jätkati kasvatamist 2 tundi. Rakud koguti tsentrifuugides 4000 rpm 6 minutit, +4°C (RC-5B; rootot GSA), resuspendeeriti 4ml jääkülmas 1X lüüsipuhvris (LP), lisati DNAas lõppkonsentratsiooniga 50U/ml ja lüütsüüm lõppkonsentratsiooniga 20mg/ml. Rakud lüüsi külmutamise sulatamise meetodil, külmutades kolm korda aeglaselt temperatuurini -75°C ja sulatades aeglaselt jää-vee segul. Lüsaatidest eemaldati rakukestad tsentrifuugimise teel 13 000 rpm, 15 minutit, +4°C (lauatsentrifuug) ja supernatanti lahjendati kaks korda 1X LLP-ga, et alandada sahharoosi kontsentratsiooni enne gradiendile kandmist.

Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendis

Ribosomaalsete partiklite eraldamiseks sahharoosi gradiendis tsentrifuugimise teel, formeeriti 36ml tuubidesse lineaarne 15%-40% sahharoosigradiend, 1X LLP puhvris. Gradiendile kanti 2ml rakulüüsaati ja tsentrifuugiti ultratsentrifuugis 21 000 rpm, 16 h ($\omega^2t=2,75 \times 10^{11}$; rootor SW28) temperatuuril +4°C. Ribosomaalsete fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivooluspektrofotomeetrit (LKB) (time constant=2, abs-range=2, $\lambda=254\text{nm}$), peristaatilist pumpa ning isekirjutajat. Ribosomaalsete partiklite (70S, 50S ja 30S) fraktsioonid koguti eraldi anumatesse. 70S ribosoomid lahjendati kaks korda 1X LLP-ga, et alandada sahharoosi kontsentratsioon. Ribosomaalseid partikleid tsentrifuugiti TI-50 rootoriga 31 000 rpm 22,5h ($\omega^2t=8,5 \times 10^{11}$), temperatuuril +4°C (ultratsentrifuug). Ribosoomi sademelt eemaldati ettevaatlikult supernatant, ja lahustati 100 mikroliitris LLP-s või DP-s.

Mutantse rRNA ekspressiooni kontrollimine RT-PCR-ga

RT-PCR-i jaoks eraldati sahharoosi gradiendis puhastatud 50S ja 70S fraktsioonidest rRNA, nagu kirjeldatud allpool. RT-PCR-i viidi läbi kahes osas. Esimeses etapis sünteesiti pöördtranskriptaasiga rRNA pealt siDNA (Praimer C2). Teises etapis amplifitseeriti siDNA-sid, kasutades oligonukleotiide CD1 ja C2, järgmistel tingimustel:

1. +94°C kolm minutit
2. +94°C 30 sekundit
3. +55°C 40 sekundit
4. +73°C üks minut
5. +73°C seitse minutit

Tsükli 2-4 korrati 31 korda

Mutantsete ribosoomide puhastamine afiinsuskromatograafial

Ribosoomide segapopulatsioonist streptavidiini ligandi sisaldavate 50S subühikute puhastamiseks, lahustati ribosoomide sade dissotseerivas DP puhvril (1mM MgOAc). Mutantsete ribosoomide puhastamiseks võeti 1000pmol 70S ribosoomi (või 50S subühikuid; $1\text{AU}_{260} = 24\text{pmol } 70\text{S}$ ja $37\text{pmol } 50\text{S}$), lahjendati need 1X dissotseeriva puhvriga ühe milliliitrini ja lisati 100µl *Streptavidin Sepharose* maatriksit (Amersham Biosciences). Segu inkubeeriti 16h temperatuuril +4°C, *end-over-end* segajas (Villemsi ja Ustavi nimeline aastast 1976), et streptavidiini ligandi sisaldavad 50S ribosomaalsed partiklid seonduksid *Streptavidin Sepharose*-ga. Peale inkubatsiooni pesti geeli 3 korda 1X DP puhvriga, tsentrifuugiti 2000 rpm 1 minut (lauatsentrifuug) ja eemaldati supernatant. *Streptavidin Sepharose*-le seondunud 50S partiklid elueeriti 1ml 100mM Biotiini lahusega 1X LLP puhvril (12mM MgOAc) inkubeerides 16h, temperatuuril +4°C, *end-over-end* segajas. *Streptavidin Sepharose* eemaldati lahusest tsentrifuugides 13 000 rpm kolm minutit (lauatsentrifuug). 50S subühikute lahuse konsentreerimiseks kasutati Amicon Ultra tsentrifugaalfiltrit, läbilaskvuspiiriga 100 000 Da, vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele.

***In vitro* RluD töötlus**

In vitro RluD töötluseks võeti 6U dissotseeritud 50S ribosoomide või 6U fenool-kloroform töötlusega puhastatud rRNA-d (lahustatud 1X LLP-s). Kolmele ühikule rRNA-le või 50S ribosoomidele lisati 30pmol RluD-d ja reaktsiooni lõppruumala viidi 1X LLP-ga 30 mikrolitri. Reaktsioonisegu inkubeeriti kolm tundi +37°C. Kontrolliks inkubeeriti 3U ribosoomide või 23S rRNA-d kolm tundi +37 °C, ilma RluD juuresolekuta.

Räniga rRNA eraldamine

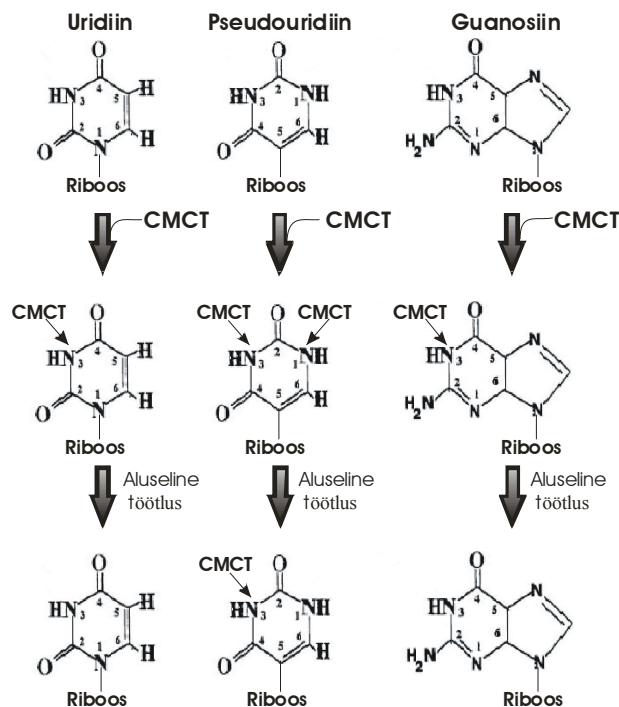
Käesolevast töös kasutati rRNA ribosoomidest eraldamiseks kas rRNA kaotroopse soolalahusega ekstraheerimist (GuTCN, puhver PN) ja rRNA räniga seondumist või fenool-kloroform töötlust ja etanooliga sadestamist.

Räniga rRNA eraldamiseks võeti 2U-3U ribosoomide ning ribosoomi lahuse maht viidi 200 mikrolitri. Lahusele lisati 800µl kaotroopset soola sisaldavat puhvrit PN (Qiagen), segati väristajal 20 minutit, toatemperatuuril. rRNA sidumiseks lisati 20µl 50% ränisuspensiooni ja jätkati väristajal 10 minutit, toatemperatuuril. Räni sedimenteeriti lauatsentrifuugis, 13 000 rpm 30 sekundit +4°C ning supernatant eemaldati. Sadet pesti kaks korda 70% etanooliga ja kuivatati +37°C, 10 minutit. rRNA elueeriti räni küljest 30 mikrolitri ddH₂O-ga 3 minutit, +37°C. Ränist sedimenteeriti lauatsentrifuugis 13 000 rpm kolm minutit ja rRNA vesilahus viidi uude reaktsioonituubi.

Et säilitada rRNA konformatsiooni, eraldati ribosoomidest rRNA fenool-kloroform töötlusega. 10U 50S ribosoomaalsed alaühikud lahustati 200 mikrolitris puhvris (0,1M NaCl, 1% SDS, 10mM MgCl₂ 10mM Tris HCl pH 7,5). Lahusele lisati 200µl fenooli pH 5,0 ja segati vorteksil. Lahust tsentrifuugiti 13 000 rpm üks minut toatemperatuuril (lauatsentrifuug) ja tõsteti vesifaas uude reaktsioonituubi. Vesifaasile lisati võrdne maht fenooli pH 5,0, segati 10 minutit vorteksil ja tsentrifuugiti 13 000rpm üks minut, toatemperatuuril (lauatsentrifuug). Järgnevalt lisati vesifaasile võrdne maht kloroformi, segati vorteksil üks minut ja tsentrifuugiti 13 000 rpm üks minut, toatemperatuuril (lauatsentrifuug). rRNA sadestati vesifaasist 2,5 mahu 99,9% etanooli lisamisega ja inkubeerides 30 minutit, temperatuuril -20°C. Lahust tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13 000 rpm, 20 minutit, +4°C. Sadet kuivatati +37°C kaks minutit ja lahustati 30 mikrolitris 1X LLP-s.

Pseudouridiinide määramine

RNA-s pseudouridiine sisaldavate positsioonide kindlaks tegemiseks kasutati CMCT modifitseerimisel põhinevat meetodit (*Ofengand et al., 2001*). Pseudouridiinide määramiseks viidi ühe 23S rRNA variandi jaoks läbi kaks reaktsiooni. Esimese, ehk plus (+) reaktsiooni jaoks lisati 15 mikrolitrile rRNA lahusele (15µg -20µg) 80µl BEU puhvrit ja 20µl 1M CMCT/BEU puhvrit. Kontroll, ehk miinus (-) reaktsiooni jaoks lisati 15µl rRNA-le (15µg-20µg) 100µl BEU puhvrit. Reaktsioonisegusid inkubeeriti 10 minutit, +37°C, sellel ajal modifitseeris CMCT U, G ja Ψ nukleotiide (Joonis 12). Reaktsioon peatati 2µl dekstraani ja 38µl 4M NaOAc (pH5,5) lisamisega ning RNA sadestati 2,5 mahu külma, 96% etanooliga (-20°C), 20 minutit. Lahust tsentrifuugiti 13 000 rpm, 10 minutit, +4°C (lauatsentrifug) ning sadet pesti kaks korda 70% -20°C etanooliga ja kuivatati +37°C 10 minutit ja lahustati 50 mikrolitris NKP puhvrts. Reaktsioonisegle tehti aluseline töötus 4 tundi +37°C, et eemaldada CMCT U ja G nukleotiidide küljest (Joonis 12). Peale inkubatsiooni lisati 2µl dekstraani, 6µl 4M NaOAc (pH 5,5) ja 110µl külma 96% etanooli (-20°C). RNA sadestati ja pesti, nagu kirjeldati eelnevalt ja lahustati 20µl ddH₂O-s. Pseudouridiinide, tuvastamiseks kasutati praimeri pikendamise reaktsiooni. Reaktsioonid tehti nii CMCT-ga modifitseeritud, kui modifitseerimata RNA-dele.



Joonis 12. CMCT töötus. Joonisel on kujutatud CMCT poolt modifitseeritavad nukleotiidid. Nooltega on näidatud lämmastike positsioonid, millega CMCT jääk moodustab sideme. Aluselise töötusega eemaldatakse uridiini ja guaniini küljest CMCT jääk. Modifikatsiooni ei eemaldata pseudouridiini N3 positsiooni küljest. CMCT pseudouridiini N3 positsioonis ei võimalda Watson-Click paardumist mistõttu praimerekstensiooni reaktsioonis peatub polümeraas enne seda positsiooni.

Oligonukleotiidi (U1) pikendamine

Reaktsiooni võeti 5µl (1-2pmol) rRNA-d, lisati 2µl hübridisatsiooni puhvrit (HB) ja 1 pmol praimerit U1. Reaktsioonisegu lõppruumala viidi ddH₂O-ga 9 mikrolitrini, kuumutati temperatuurini +90°C ja jahutati aeglaselt temperatuurini 47°C (10- 20min) ning proovid tõsteti jääle. Reaktsioonisegule lisati 1,2µl 10X pöördtranskriptaasi reaktsiooni puhvrit (RB), 0,5-0,8µl α^{32} PdCTP-d (sõltuvalt isotoobi värskusest), 0,8µl dNTP(-C)-d, 4U AMV pöördtranskriptaasi, reaktsioonisegu lõppruumala viidi ddH₂O-ga 12 mikrolitrini. Reaktsioonisegu inkubeeriti 30 minutit +42°C, misjärel lisati 2µl 1mM dNTP segu ja jätkati inkubeerimist +42°C, 15 minutit. Reaktsioon peatati 120µl RT-STOP lahusega. RNA sadestati üleöö -20°C ning tsentrifuugiti 13 000 rpm, 15 minutit, +4°C (lauatsentrifuug). RNA sade lahustati 10µl formamiidi STOP-is (FS). Pöördtranskriptaasi reaktsioonil sünteesitud DNA fragmendid lahutati 7% UUREA-PAAG elektroforeesil, 2000V. Enne geelile kandmist denatureeriti proove +95°C kolm minutit. Geelil lahutatud radioaktiivset märget sisaldavad DNA fragmendid visualiseeriti phosphoimageriga ja analüüsiti Image Quant programmiga.

Oligonukleotiidi pikendamise reaktsioon märgitud praimeriga

Praimeri kineerimise reaktsioon (120 pmol praimer, 10µl värsket γ^{32} PdATP-d, 5µl 10X puhvrit A ja 20U T4 polinukleotiidi kinaas) viidi läbi 1,5h, +37°C, lõppruumalas 50µl. Märgistatud oligonukleotiidi puhastamiseks kasutati Qiagen-i Nucleotide removal kit-i vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele.

Praimeri pikendamise reaktsiooni võeti 1-2pmol 23S rRNA-d, 2pmol kineeritud praimerit Mini taq ja 2µl hübridisatsiooni puhvrit (HB). Reaktsioonisegu maht viidi ddH₂O-ga 10 mikrolitrini ja kuumutati need temperatuurini +90°C. Segud jahutati aeglaselt temperatuurini +37°C (10-20 minutit), tõsteti jääle ja jagati võrdselt kahe reaktsioonituubi vahel (A ja G) ja 1µl 10X RT-RB-d, 3,5U AMV pöördtranskriptaasi ning viidi mõlema reaktsioonisegu maht 9 mikrolitrini. Mõlemale reaktsioonisegule (A ja G segud) lisati vastavalt 1µl ddA segu (125mM dNTP (v.a. dATP)+0,25mM ddATP) ja 1µl ddG segu (125mM dNTP (v.a.dGTP)+0,25mM ddGTP). Reaktsioonisegusid inkubeeriti 30 minutit +42°C. Reaktsioon peatati 120µl RT-STOP lahusega. RNA sadestati üleöö -20°C ning tsentrifuugiti 13 000 rpm, 15 minutit, +4°C (lauatsentrifuug) ja lahustati 10µl formamiidi

STOP-is (FS). Pöördtranskriptaasi reaktsioonil sünteesitud DNA fragmendid lahutati 12% UUREA-PAAG elektroforeesil, 2000V. Enne geelile kandmist denatureeriti proove +95°C kolm minutit. Geelil lahutatud radioaktiivset märget sisaldavad DNA fragmendid visualiseeriti phosphoimageriga ja analüüsiti Image Quant programmiga.

Eksperimentaalne osa

Töö eesmärk

Kõigis funktsionaalsetest RNA-dest (rRNA, tRNA) on leitud pseudouridiine, mis viitab sellele, et pseudouridiinil on RNA ahelas tähtis roll. Kõik pseudouridiinid on sünteesitud konkreetse pseudouridiini süntaasi poolt. 23S rRNA heeliks-lingu 69 lingu osas asub kaks ja heeliksi osas üks pseudouridiin. Kõik heeliks-ling 69 pseudouridiinid on sünteesitud pseudouridiini süntaasi RluD poolt. RluD on *E.coli* rakkudele äärmiselt vajalik, selle ensüümi geeni inaktiveerimine omab rakkude kasvule märkimisväärselt suurt efekti.

Antud töö eesmärgiks oli uurida faktoreid, mis mõjutavad RluD spetsiifilisust uridiinide isomeriseerimisel pseudouridiinideks 23S rRNA heeliks-lingus 69. Teiseks eesmärgiks oli uurida RluD defektse substraadi spetsiifika mõju ribosoomile.

Tulemused

Mutantseid A1916C ja A1916U 23S rRNA variante sisaldavate plasmiidide konstrueerimine

Mutantseid rRNA variante ekspresseerivad plasmiidid konstrueeriti, nagu kirjeldatud meetodites. Saadud ekspressioonivektoreid kontrolliti streptavidiini ligandi järjestuse suhtes SacI-NcoI restriksiooniga ja plasmidi kodeeritud mutantse rRNA ekspressiooni *E.coli* rakkudes kontrolliti RT-PCR-ga (Tulemused näitamata). Saadud mutantset *rrnB* operoni sisaldava p_{tBB}-t ekspressioonivektori C5-MPC52 piirkonna DNA järjestus määrati. C5-MPC52 piirkonnas ei tuvastatud lisaks soovitud mutatsioonide rohkem mutatsioone (Tulemused näitamata).

RluD spetsiifilisus uridiinide positsioonide suhtes

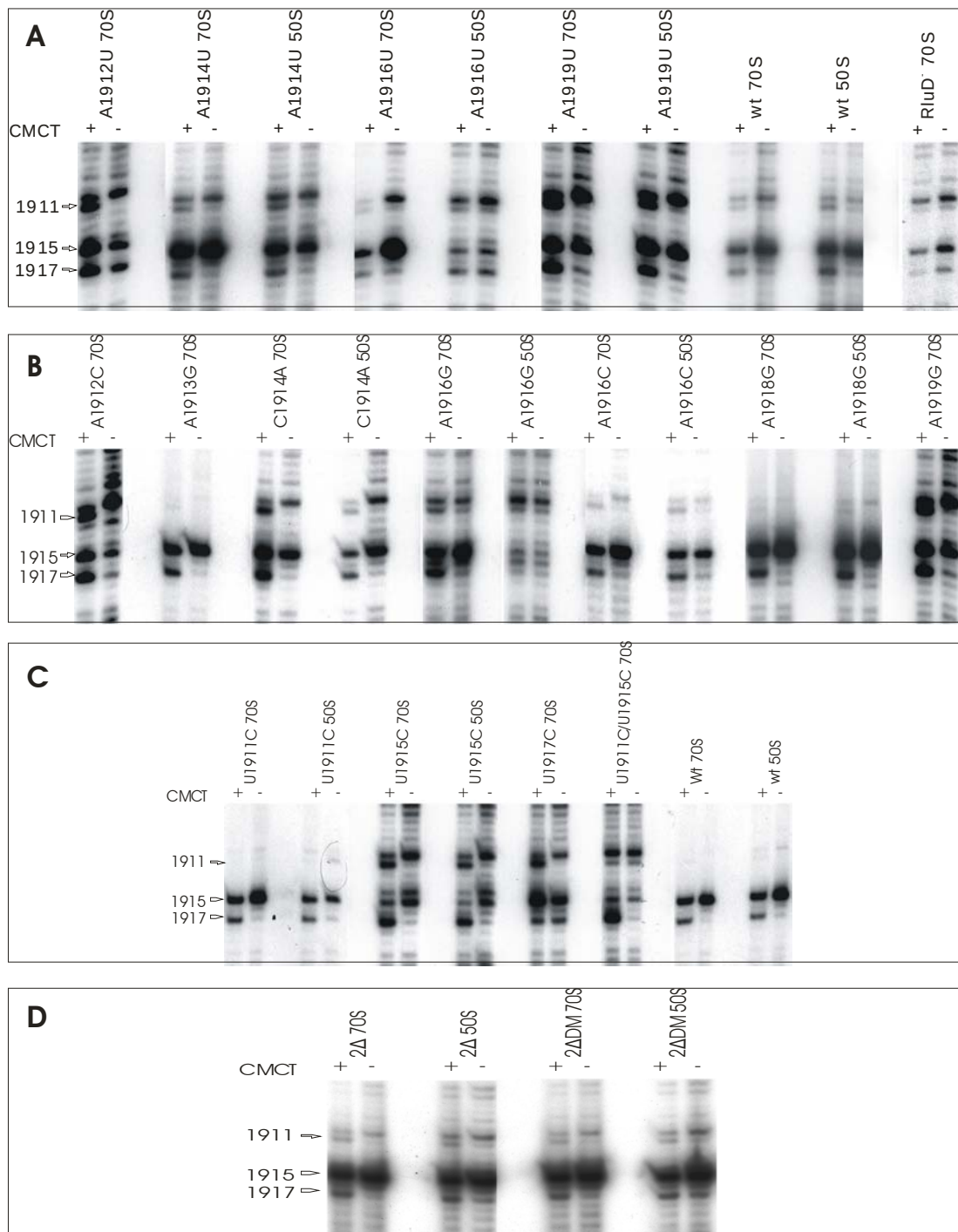
E.coli rakkudes ekspresseeriti A1912U, C1914U, A1916U ja A1919U 23S rRNA variante, et tuvastada RluD spetsiifilisust erinevas positsioonis olevate uridiinide suhtes. Rakkudest eraldati ja puhastati mutantseid rRNA variante sisaldavad ribosoomid. Pseudouridiinid heeliks-lingus 69 tehti kindlaks CMCT/leelis modifitseerimise ja praimeril pikendamise reaktsiooniga (α^{32} PdCTP-ga). Praimeril pikendamisel ja produkti lahutamisel 7% UUREA-PAAG elektroforeesil, saadi plus (+) ja miinus (-) rajad, vastavalt CMCT/leelis töötlusele. Pseudouridiinid asuvad positsioonides, kus + rajal asub polümeraasi stop ja - rajal stop puudub. Võrreldes joonisel 13 A paneelil olevaid plus ja miinus radasid, selgus, et *in vivo* ei isomeriseeri RluD lisaks oma substraatidele rohkem uridiine, kuna võrrelduna kontrollidega (wt ja RluD⁻), ei ole + rajale spetsiifilisi polümeraasi stoppe juurde tekkinud. 23S rRNA mutatsioon A1916U toob aga kaasa 50S ribosomaalsetest partiklitest kõigi spetsiifiliste polümeraasi stoppide kadumise plus rajal. Samuti põhjustab A1916U 23S rRNA variant 70S ribosoomide fraktsioonide plus raja spetsiifiliste polümeraasi stoppide märkimisväärse vähenemise (Joonis 13 A, A1916U 70S ja A1916U 50S). Lisaks sellele on märkimisväärselt vähenenud ka polümeraasi peatumine positsioonis 1915, kus polümeraasi peatumise põhjustab pseudouridiini kolmandas positsioonis olev metüülgrupp. Sõltumata uridiinide arvust ja positsioonist on RluD siiski spetsiifiline vaid 1911 ja 1917 positsioonis asuvate uridiinide suhtes.

Heeliks-lingu 69 positsioonide tähtsus RluD spetsiifikale

E.coli rakkudes ekspresseeriti rRNA A1912C, A1913G, C1914A, A1916G, A1916C, A1918G ja A1919G 23S rRNA variante, et tuvastada erinevate heeliks-ling 69 positsioonide mõju RluD spetsiifilisusele. Võrreldes nende 23S rRNA variantide (Joonis 13 B) plus ja miinus radasid, on näha, et pseudouridiinide sünteesimist mõjutab vaid 23S rRNA mutatsioon A1916G. Mutantset A1916G rRNA varianti sisaldavatest 50S ribosomaalsetest partiklitest on täielikult kadunud ka 1915 positsiooni metülatsiooni poolt tekitatud polümeraasi stop, nagu seda oli ka A1916U mutatsiooni puhul (Joonis 13 A, A1916U). Mutantsed 23S rRNA A1913G ja A1918G variandid põhjustavad märkimisväärselt tugeva polümeraasi peatumise positsiooni 1915 ees, mis muudab sellele positsioonile järgnevad polümeraasi stopid halvasti detekteeritavaks. Siiski on näha, et positsioonis 1911 on pseudouridiin. Sarnast ülitugeva stoppi tekkimist positsiooni 1915 positsiooni ees on võimalik näha ka metsiktüüpi 23S rRNA puhul (Joonis 13 C, wt 70S ja wt 50S).

Mutatsioonide mõju positsioonides 1911, 1915 ja 1917

E.coli rakkudes ekspresseeriti U1911C, U1915C, U1917C ja U1911C/U1915C 23S rRNA variante, et tuvastada, kas RluD isomeriseerib oma substraate eraldi või kooperatiivselt. Mutantsete ribosoomid afiinsuspuhastati ja määrati 23S rRNA heeliks-lingu 69 pseudouridiinid. Tulemuste analüüsimine toimus, nagu kirjeldatud eelnevalt. Oodatult on U1911C ribosoomidel kadunud plus raja spetsiifiline polümeraasi stop positsioonist 1911. Samasugust polümeraasi stopi kadumist on näha ka positsioonide 1915 ja 1917 puhul, kus on polümeraasi spetsiifiline stop kadunud 1915 ja 1917 pseudouridiinidele vastavatelt kohtadelt (Joonis 13 C). Topeltmutandi (U1911C/U1915C) puhul on oodatult plus rajalt kadunud nii 1911 ja 1915 positsioonide polümeraasi spetsiifilised stopid ja 1917 positsioonile vastav stop on alles. Mutatsiooni U1915C puhul on ebaspetsiifilise stopi tugevus oluliselt vähenenud, mis viitab sellele, et sellesse positsiooni viidud tsütidiin ei ole kolmandast positsioonist metüleeritud (Joonis 13 C, U1915 70S ja 50S ning U1911C/U1915C 70S ja 50S).



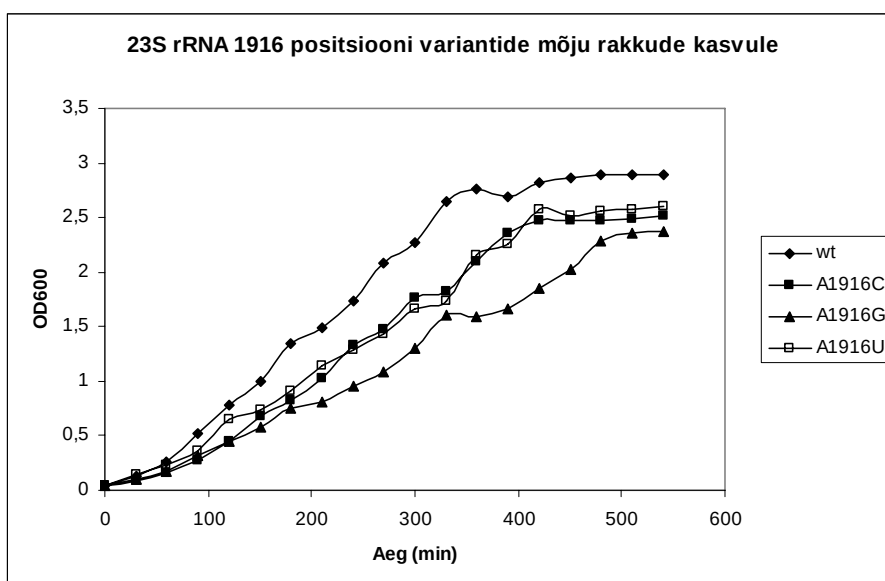
Joonis 13. Pseudouridiinide määramine *in vivo* modifitseeritud 23S rRNA variantidest, CMCT/leelis töötlusega. +radadel on visualiseeritud CMCT-ga modifitseeritud ja – radadel modifitseerimata 23S rRNA variantide primerekstensioonil sünteesitud fragmendid. Kontrolliks on kasutatud metsiktüüpi 70S ja 50S ning RluD⁺ tüve ribosoomidest puhastatud rRNA-sid. Joonistel on näidatud vaid heeliks-ling 69 regioon ja nooltega on näidatud DNA fragmendid, mis on tekkinud primaerekstensiooni reaktsioonis, positsioonide 1911, 1915 ja 1917 ees polümeraasi peatumise tagajärjel. Pseudouridiinid asuvad positsioonides mille + rajal on spetsiifiline polümeraasi stop ja – rajal stop puudub. Paneelil A on näidatud katse tulemus, kus heeliks-lingu 69 erinevatesse positsioonidesse viidi punktmutatsioonidena sisse uridiine. Paneelil B on toodud tulemused, kus punktmuteeriti tervet heeliks-ling 69 regiooni (1912-1918) ja lisaks positsiooni 1919. Paneelil C on toodud tulemused, mis saadi heeliks-ling 69 positsioonides 1911, 1915 ja 1917 olevate uridiinide punktmuteerimisel tsütidiinideks. Paneelil D on toodud peptiidsideme sünteesil inaktiivsetest ribosoomidest puhastatud rRNA-de pseudouridiinide määramise tulemus.

RluD spetsiifilisuse sõltuvus ribosoomide aktiivsusest.

E.coli rakkudes ekspresseeriti $\Delta 2507$ ja G2581A/ $\Delta 2589$ rRNA variante, et tuvastada RluD spetsiifilisust peptidüüli transferaasil inaktiivsete ribosoomide suhtes. Neid mutatsioone sisaldavad ribosomaalsed partiklid on võimelised moodustama 70S ribosoomi, kuid ei ole võimelised sünteesima peptiidsidet (*Spahn et al., 1996*). Joonisel 13 paneelil D on näha, et pseudouridiinidele vastavatel kohtadel on plus rajal spetsiifiline stop olemas ja näha on ka positsiooni 1915 tugev ebaspetsiifiline polümeraasi stop. Seega peptidüüli transferaasil inaktiivsete ribosoomide 23S rRNA heeliks-lingus 69 on kõik pseudouridiinid, nii 50S kui ka 70S ribosoomides sünteesitud ja ribosoomi inaktiivsus peptidüüli transferaasis ei mõjuta RluD spetsiifilisust (Joonis 13 D).

Positsiooni A1916 mutatsioonide mõju rakkude kasvule

Tuvastamaks 23S rRNA positsiooni A1916 mutatsioonide mõju rakkude kasvule, ekspresseeriti *E.coli* rakkudes A1916C, A1916G, A1916U rRNA variante ja mõõdeti rakkude kasvukiirust. Streptavidiini ligandi sisaldavaid metsiktüüpi rRNA variante, ekspresseerimine *E.coli* rakkudes ei mõjutanud rakkude kasvukiirust võrrelduna rakkudega, kus ekspresseeriti metsiktüüpi ilma streptavidiini ligandita rRNA variante (Tulemused näitamata). Kontrolliks ekspresseeriti *E.coli* rakkudes metsiktüüpi *rrnB* (sisaldas vaid streptavidiini siduvat ligandi) operoni sisaldavat plasmidi ptBB-t. Võrreldes metsiktüübiga, on kõgil 23S rRNA variantidel märgatav kasvudefekt (Joonis 14). Kõige suurem kasvudefekt on rakkudes, kus ekspresseeriti A1916G rRNA varianti. Rakud, kus ekspresseeriti A1916U ja A1916C rRNA variante, omasid kasvule ühesugust defekti (Joonis 14).



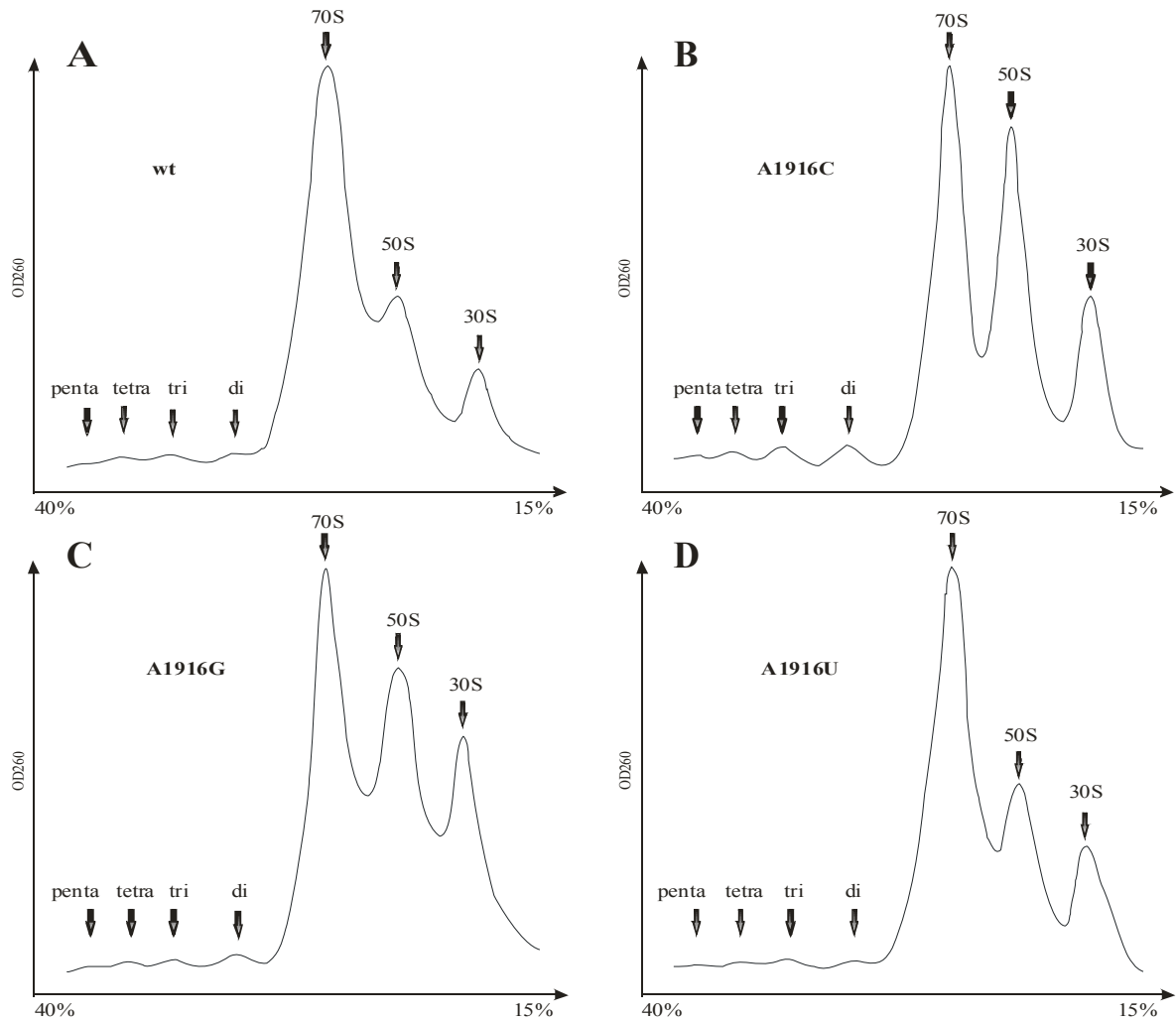
Joonis 14. 23S rRNA variantide ekspresseerimise mõju rakkude kasvule. Kõiki rRNA variante ekspresseeriti plasmiidilt ptBB-t *E.coli* XL-1 blue tüves. rRNA ekspressioon indutseeriti optilisel tihedusel (OD_{600}) 0,05 ja rakke kasvatati temperatuuril +37°C.

Erinevate A1916 rRNA variantide jaotus ribosoomi partiklites.

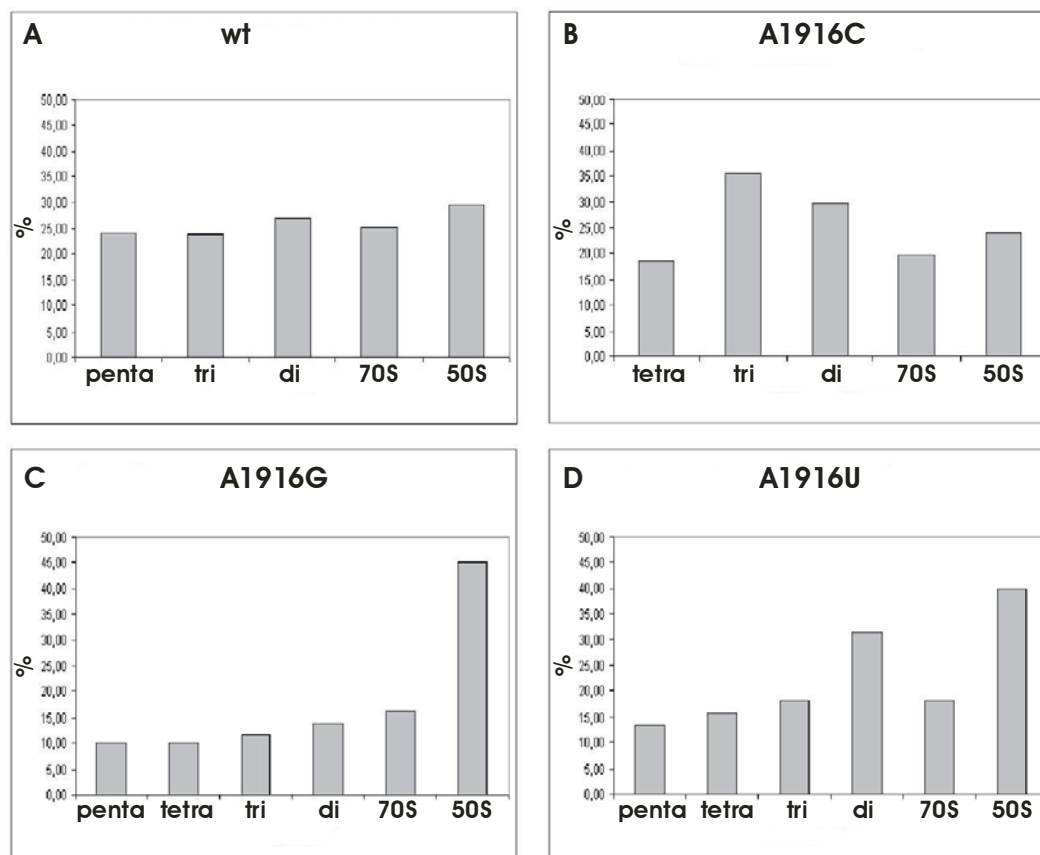
E.coli rakkudes ekspresseeriti A1916C, A1916G, A1916U rRNA variante, et tuvastada nende muatasioonide mõju 23S rRNA funktsionaalsusele. Kontrolliks ekspresseeriti *E.coli* rakkudes metsiktüüpi *rrnB* operoni sisaldavat plasmidi ptBB-t. Rakud, kus ekspresseeriti A1916 rRNA variante, kasvatati, lüüsi, ja eraldati sahharoosi gradiendis, nagu kirjeldatud meetodite osas. Sahharoosi gradiendi profiilidelt on näha, et kõigi mutantide vabade 50S ja 30S subühikute piigid on võrreldes metsiktüübi piikidega suuremad (Joonis 15). 23S rRNA A1916G varianti ekspresseerivate rakkude sahharoosi gradiendis on näha, et 50S ribosomaalsete partiklite piik on laienenud ja vabade subühikute piigid on oluliselt suurenenud, võrreldes kontrolliks oleva sahharoosi gradiendi pildis nähtavate piikidega (Joonis 16 A ja C). A1916C rRNA varianti ekspresseerimisel ei ole küll märgata 50S piigi laienemist, kuid vabade subühikute piigid on oluliselt suurenenud (Joonis 15 B). Mutatsiooni A1916U ekspresseerimine toob kaasa kõige väiksema efekti vabade subühikute piikide suurusel. A1916C ja A1916U rRNA variantide ekspresseerimine *E.coli* rakkudes ja ei too kaasa 50S subühiku piigi laienemist, nagu A1916G rRNA variant (Joonis 15 B ja D).

Sahharoosi gradiendist kogutud erinevate fraktsioonide ribosoomidest eraldati RNA ning määrati mutantsete ja metsiktüüpi ribosoomide vahekord radioaktiivselt märgitud praimerit Mini taq pikendamise reaktsiooniga. Pöördtranskriptaasiga sünteesitud DNA fragmendid lahutati 12% UUREA-PAAG elektrogoreesil. Tulemustest selgus, et A1916C

rRNA variante sisaldavate ribosoomide sisaldus erinevates ribosomaalsetes partiklites ei erine oluliselt kontrollribosoomide (wt) jaotusest (Joonis 16 A ja B). A1916U ja A1916G rRNA variantide ekspresseerimine põhjustab aga polüsoomide ja 70S fraktsioonides oluliselt mutantset 23S rRNA-d sisaldavate ribosoomide vähenemise ning mutantide kogunemise vabade 50S ribosomaalsete partiklite fraktsiooni (Joonis 16 C ja D).



Joonis 15. 23S 1916 rRNA variantsete ribosoomide analüüs 15%-40% sahharoosi gradiendis. Kõiki rRNA variante ekspresseeriti *E.coli* XL-1 blue rakkudes, plasmiidilt ptBB-t. Nooltega on näidatud ribosomaalsed fraktsioonid.



Joonis 16. Plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA variantide jaotumine ribosomaalsetes partiklites.

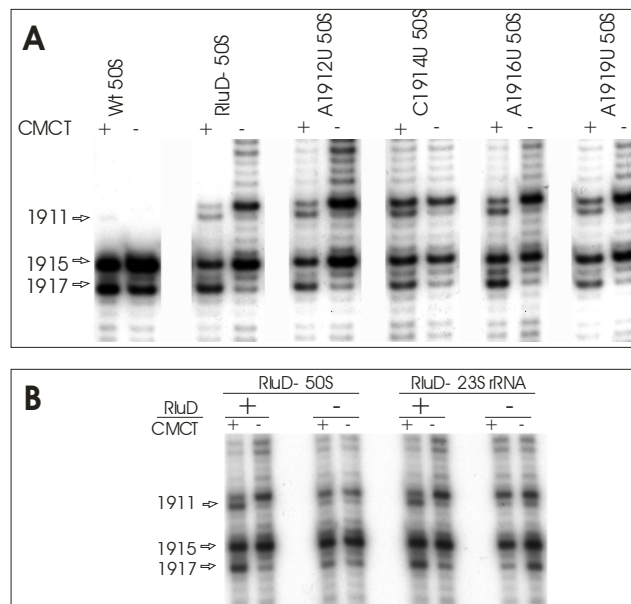
Positsioonis 1916 punktmutsatsiooni kandvaid 23S rRNA-sid ekspresseeriti plasmiidilt ptBB-t *E.coli* XL-1 blue rakkudes. Ribosoomid lahutati 15%-40% sahharoosi gradiendis ja plasmiidilt kodeeritud 23S rRNA protsentuaalne sisaldus määrati praimerekstensiooni meetodil.

Pseudouridiini süntaasi RluD spetsiifilisus *in vitro*

Määramaks RluD substraadi spetsiifilisust *in vitro*, ekspresseeriti *E.coli* RluD⁻ tüves A1912U, C1914U, A1916U ja A1919U rRNA variante. Rakud lüüsi ja 50S ribosomaalsed partiklid eraldati dissotseerivas sahharoosi gradiendis (12mM MgOAc asemel kasutati siin 1mM lõppkonsentratsiooniga MgOAc). Ribosomaalsete 50S partiklite segapopulatsiooni inkubeeriti puhastatud RluD-ga ja eraldati neist rRNA. Puhastatud rRNA-sid töödeldi CMCT-ga ja viidi läbi pöördtranskriptaasiga praimeri pikendamise reaktsioon. Pöördtranskriptaasiga sünteesitud DNA fragmendid lahutati saadud produktid 7% UUREA-PAAG elektroforeesil. Kontrolliks kasutati XL1 blue ja RluD⁻ tüvedest puhastatud metsiktüüpi 50S ribosomaalseid partikleid. Tulemustest selgus, et ka *in vitro* RluD-ga töödeldud 50S ribosomaalsetest partiklitest eraldatud rRNA-des toimub plus rajal praimeri pikendamise reaktsioonis polümeraasi peatumine enne positsioone 1911, 1915 ja 1917, kus asuvad RluD looduslikud substraadid (Joonis 17 A). Lisaks RluD looduslike substraatide

kohal asuvatele plus raja stoppidele, on lisaks tekkinud veel ka polümeraasi spetsiifiline stop positsiooni 1916 plus rajale (Joonis 17 A, A1916U 50S). Ka siin tuleb märkida, et kontrolliks kautatud metsiktüüpi 23S rRNA-s on tekkinud positsiooni 1915 väga tugev stop, mis segab 1911 positsioonis oleva stopi nägemist (Joonis 17 A, wt50S).

Pseudouridiini süntaasi RluD spetsiifilisuse määramiseks 23S rRNA suhtes, eraldati *E.coli* RluD⁻ tüvest metsiktüüpi 50S ribosomaalsed partiklid ja puhastati neist fenool-kloroform töötusega 23S rRNA. Puhastatud 23S rRNA-d töödeldi RluD-ga, modifitseeriti CMCT-ga ja viidi läbi praimeri pikendamise reaktsioon, ning saadud produktid lahutati 7% UUREA-PAA geelil. Kontrolliks modifitseeriti *E.coli* RluD⁻ tüves kasvatatud metsiktüüpi 50S ribosomaalseid partikleid. Võrrelduna kontrolliga, ei ole näha vahet, 23S rRNA ja 50S subühikute modifitseerumises, kõik spetsiifilised polümeraasi peatumised, plus radadel, on kontrolliga ühesugustes kohtades (Joonis 17 B).



Joonis 17. Pseudouridiinide määramine *in vitro* RluD-ga modifitseeritud ribosoomide ja 23S rRNA variantidest CMCT/leelis töötusega. CMCT + radadel on visualiseeritud modifitseeritud ja – radadel modifitseerimata 23S rRNA praimerekstensioonil sünteesitud DNA fragmendid. Nooltega on näidatud praimerekstensioonil positsioonide 1911, 1915 ja 1917 eest tekkinud polümeraasi peatumise tagajärjel tekkinud DNA fragmendid. Paneelil A näidatud tulemused on saadud RluD⁻ tüvest eraldatud 50S ribosoomide segapopulatsiooni töötlemisel RluD-ga *in vitro* ja töödeldud ribosoomidest puhastatud 23S rRNA-lt pseudouridiinide määramisel. Paneelil B on RluD⁻ tüvest eraldatud metsiktüüpi ribosoomidest puhastatud 23S rRNA. Kontrollina on kasutatud RluD⁻ tüvest eraldatud metsiktüüpi ribosoomide.

Arutelu

Heeliks-ling 69 on teadlastele juba pikka aega huvi pakkunud. Kümnest 23S ribosomaalses RNA-s asuvast pseudouridiinist kolm asuvad heeliks-lingus 69, mis teeb heeliks-ling 69-st veel huvipakkuvama uurimisobjekti. Kõik kolm H69-s asuvat pseudouridiini isomeriseeritakse uridiinidest ühe pseudouridiini süntaasi RluD poolt. On arvatud, et pseudouridiini süntaas RluD isomeriseerib kõiki uridiine, mis asuvad heeliks-lingu 69 lingu osas (*Ofengand et al., 2002*). Käesolevas töö eesmärgiks oli uurida pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifilisust nii *in vivo*, kui *in vitro*. Selgus, et RluD on *in vivo* äärmiselt spetsiifiline ensüüm, mis tunneb substraadina ära vaid neid positsioone 23S rRNA heeliks-lingus 69, mis on tema looduslikeks substraatideks (Joonis 13). Lisaks leiti veel, et 23S rRNA heeliks-lingus 69 asuv positsioon A1916 omab märkimisväärset tähtsust RluD funktsioneerimiseks (Joonis 13 A ja B).

Punktmutatsioonanalüüs, kus 23S rRNA heeliks-ling 69 lingu osasse tekitati mutatsioonid A1912U, A1914U, A1916U ja A1919U, näitas et *in vivo* ei isomeriseeri RluD mitte ühtegi kuntslikult heeliks-lingu 69 tekitatud uridiini (Joonis 13 A, Tabel 1). Seega võib väita, et lisaks 23S rRNA heeliks-lingu 69 ära tundmisele, on RluD-l ka positsioonide 1911, 1915 ja 1917 jaoks spetsiifiline ära tundmise mehanism. RluD katalüütilises saidis on mitmeid arginiini jääke (*Sivaraman et al., 2004*), mida võidakse kasutada sarnaselt TruA-le aluse spetsiifiliseks aluse välja pööramiseks (*Hur & Stroud, 2007*).

Eksperimentaalsed tulemused näitasid, et terves H69 lingu osas on vaid positsioon A1916, mis on RluD funktsioneerimiseks vajalik. A1916 asub kahe isomeeriseeritava uridiini U1915 ja U1917 vahel (Joonis 6). Punktmutatsioon A1916G põhjustab 1911, ja 1917 positsioonide uridiinide isomeriseerimata jätmise 50S alaühikutes (Joonis 13 B, Tabel 1). 1916 positsiooni adeniini asendamine uratsiiliga, põhjustab pseudouridiinide kadumise 1911 ja 1917 positsioonidest ribosomaalsete 50S alaühikutest ja 70S ribosoomide fraktsioonide nendes positsioonides näha pseudouridiinide olulist vähenemist (Joonis 13 A, Tabel 1), mis viitab sellele, et A1916U omab RluD spetsiifilisusele tugevamat efekti, kui A1916G (Joonis 13 B). 1916 positsiooni adeniini muutmise tsütidiiniks, ei põhjusta märgatavat efekti pseudouridiinide süntesile (Joonis 13 B, Tabel 1). A1916 positsiooni mutatsiooni analüüs viitab selgelt sellele, et positsioon 1916 on vajalik RluD-le substraadi ära tundmiseks.

Tabel I. RluD *in vivo* spetsiifika analüüs

	70S		50S	
Mutant	1911	1917	1911	1917
U1911C	-	+	-	+
A1912U	+	+		
A1912C	+	+		
A1913G	+	+	+	+
C1914U	+	+	+	+
C1914A	+	+	+	+
U1915C	+	+	+	+
A1916G	+	+	-	-
A1916C	+	+	+	+
A1916U	+ -	+ -	-	-
U1917C	+	-	+	-
A1918G	+	+	+	+
A1919G	+	+		
A1919U	+	+		
2Δ	+	+	+	+

Tabelis on toodud kokkuvõtlikud tulemused pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifika ja aktiivsuse kohta *in vivo*. Tabelis on toodud punktmutatsioonid, mis on RluD poolt modifitseeritud *in vivo*. Tühjad kastid näitavad positsioone, kus ei ole CMCT analüüsiga pseudouridiini tuvastatud. + tähendab, et antud positsioonis on polümeraasi spetsiifiline stop PAA geeli plus rajal olemas ja seega tegemist pseudouridiiniga. – tähendab, et antud positsioonis ei ole pseudouridiini tuvastatud. +- näitab, et selles positsioonis on pseudouridiinide poolt põhjustatud spetsiifiline polümeraasi stop oluliselt vähenenud.

Asjaolu, et A1916U ja A1916G mutatsioone 23S rRNA-des omavad 70S ribosoomid sisaldavad pseudouridiini, kuid nende 50S alaühikud ei sisalda (Joonis 13 A ja B, Tabel 1), viitab sellele, et heeliks-lingu 69 pseudouridiinide sünteesimine toimub ribosoomide assambleerumise hilises etapis ja pseudouridiinid on tõenäoliselt vajalikud ribosomaalsete 50S ja 30S alaühikute assambleerumiseks 70S ribosoomi.

Ribosoomides, kus on mutatsioon A1916G, A1916U või on ribosoomid kasvatatud RluD⁻ tüves, on näha, et oluliselt on vähenenud ka 1915 positsioonis oleva pseudouridiini N3 positsiooni metülatsioon (Joonis 13 A ja B). 1916 positsiooni rRNA variantide puhul on metüleerimata vaid ribosomaalsete 50S alaühikute fraktsioonide 23S rRNA heeliks-lingu 69 positsioon 1915. Selline 1915 positsiooni metüleerimata jätmine viitab sellele, et seni identifitseerimata metülaas, mis 1915 positsiooni pseudouridiini metüleerib, vajab substraadiks pseudouridiini, mitte heeliks-lingu 69 positsioonis 1916 asuvat adeniini. Siiski jääb ka võimalus, et metülaasi poolt positsioonis 1915 asuva substraadi ära tundmiseks on vajalik pseudouridiinide sünteesiga kaasnev konformatsiooniline muutus heeliks-lingus 69.

Joonise 13 paneelidelt A ja B on näha, et A1916G ja A1916U rRNA variantide poolt põhjustatud RluD spetsiifilisuse kadumine hõlmab korraga kõiki heeliks-lingu 69

pseudouridiine. Nende tulemuste põhjal võib väita, et pseudouridiini süntaas RluD töötab „kõik või mitte midagi” printsiibi järgi. Kontrollimaks, kas RluD jaoks on oluline, et kõik kolm uridiini oleksid positsioonides 1911, 1915 ja 1917 olemas, vahetati antud positsioonides olevaid uridiine tsütidiinide vastu punkt ja topeltmutatsiooni kandavtes 23S rRNA variantides. Tulemustest selgus, et RluD jaoks ei ole oluline kõigi kolme uridiini olemasolu heeliks-ling 69 positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Joonis 13 C, Tabel 1). Joonisel 13 C ja tabelis 1 olevate tulemuste põhjal, kus pseudouridiine ei tuvastatud vaid neis positsioonides, mille uridiinid on tsütidiini vastu vahetatud, võib väita, et RluD jaoks ei ole oluline heeliks-lingus 69 asuvate uridiinide isomeriseerimise järjekord. Samuti ei ole oluline uridiini isomeriseerimise eelduseks sellele eelneva uridiini pseudouridiiniks isomeriseeritus ja sellega kaasnev konformatsiooniline muutus 23S rRNA heeliks-lingus 69. Seega kui RluD on võimeline heeliks-ling 69 ära tundma, siis *in vivo* isomeriseerib see pseudouridiinideks oma substraadis, olenemata sellest, kas heeliks-lingus 69 on kõik kolm uridiini olemas või mitte. RluD spetsiifilisuse limiteerivaks faktoriks on tõenäoliselt esmane substraadi äratundmine.

Katsed peptidüüli transferaasil inaktiivsete ribosoomi variantidega (Joonis 13 D, Tabel 1) näitavad selgelt, et uridiinide isomeriseerimine pseudouridiinideks heeliks-lingus 69 ei sõltu ribosoomide aktiivsusest. Kuna PTC mutantsetes rRNA variantides on pseudouridiinid olemas nii 50S kui 70S ribosoomides, võib väita, et isomerisatsioonireaktsiooniks ei ole oluline ribosoomide võime valgusünteesi elongatsiooniks.

Kõigi A1916 rRNA variantide puhul on märgata ribosoomide assambleerumise defekte. Kõigil kolmel juhul on märgata vabade 50S ja 30S ribosomaalsete alaühikute piikide suurenemist sahharoosi gradiendis (Joonis 15). Mõnevõrra üllatuslikult on suurt defekti märgata ka A1916C mutatsiooni puhul (Joonis 15 B), olgugi, et A1916C rRNA variandi puhul on 50S ribosomaalsetes alaühikutes uridiinid pseudouridiinideks isomeriseeritud (Joonis 13 B). Kuna vabade ribosomaalsete subühikute osakaal on vähemal või rohkemal määral suurenenud kõigi A1916 rRNA variantide puhul, siis võib väita, et tegemist on mutatsioonispetsiifilise fenomeniga, mis ei ole sõltuvuses RluD võimest heeliks-lingus 69 uridiine pseudouridiinideks isomeriseerida.

A1916G mutatsiooniga 23S rRNA-de ekspresseerimine rakkudes toob kaasa 50S ribosomaalsete alaühikute piigi laienemise (Joonis 15 C), mis viitab sellele, et 50S ribosomaalsete subühikute populatsioon on heterogeenne. Selline heterogeensete subühikute populatsioon saab tekkida kas 50S alaühikute valest assambleerumisest või valesti

dissotseerumisest 70S ribosoomidest. Gutgsell et al 2005 on pakkunud, et RluD⁻ tüvest eraldatud ja sahharoosi gradiendis lahutatud ribosoomide pildist nähtav defekt on põhjustatud ebastabiilsete 70S ribosoomide ebahühtlasest dissotseerumisest subühikuteks. A1916G mutatsiooni puhul ei saa olla tegemist ebastabiilsete 70S ribosoomide valessti dissotseerumisest 50S ja 30S subühikuteks, sest sellisel juhul peaks olema laienenud ka 30S subühiku piik, seega on tõenäoliselt tegemist siiski ebahühtlase A1916G mutatsiooni kandvate 23S rRNA-de assambleerimisega 50S ribosomaalsetesse alaühikutesse. A1916C ja A1916U mutantsete rRNA-de ekspresseerimisel rakkudes laienenud piike näha ei ole, seega nende mutantide puhul assambleerumise defekte gradiendi pildist järeldata ei saa.

A1916 mutantseid 23S rRNA-sid ekspresseerivate rakkude kasvukiirused näitavad, et kõge suuremat efekti omab rakkude kasvule A1916G mutantsete rRNA-de ekspresseerimine. A1916C ja A1916U mutatsioone sisaldavate 23S rRNA-de ekspresseerimine omab rakkude kasvule võrreldavat efekti (Joonis 14). Erinevate 1916 positsiooni mutatsioonide kasvudefekte on võimalik võrrelda gradiendi piltidega. Kuna A1916G mutantsete rRNA-de ekspresseerimisel on gradiendi pildis laienenud 50S alaühikute piik, siis võib kasvudefekti põhjutsada assambleerimise defekt, mis on tingitud RluD defektsest substraadide ära tundmisest või mutatsiooni spetsiifilisusest.

Asjaolu, et A1916U ja A1916G rRNA variantide sisaldus polüsoomide ja 70S fraktsioonides on tugevalt vähenenud (Joonis 16 C ja D) näitab seda, et neid rRNA-de variante sisaldavad ribosoomid ei ole võimelised elongatsiooniks. Ka siin on A1916G mutatsiooni põhjustatav defekt suurem, kui teistel A1916 rRNA variantidel. A1916C 23S rRNA variantide jaotus sahharoosi gradiendi erinevates ribosomaalsetes fraktsioonides on võrreldav metsiktüüpi 23S rRNA sisaldusega. Tulemustest võib järeldata, et heeliks-ling 69 pseudouridiinidel on tähtis roll ribosoomide translatsiooni initsiatsioonile, kuna polüsoomide fraktsioonist on võimalik normaalsel hulgal leida vaid A1916C mutatsioone kandvaid ribosoomid, mille pseudouridiini tekkimise defekte ei tuvastatud (Joonis 13 B, Tabel 1).

In vitro katsed on näidanud, et RluD kaotab olulisel määral oma spetsiifilisuse, modifitseerides *in vitro* transkribeeritud rRNA-dest nii 23S, kui ka 16S rRNA-d, sealjuures tundes substraadina ära oluliselt rohkem uridiini, kui *in vivo* (Huang et al., 1998). Selles töös ekspresseeriti RluD⁻ tüves 23S rRNA-sid, mis sisaldasid mutatsioone A1912U, C1914U, A1916U ja A1919U, saadud mutantsete ja metsik tüüpi ribosoomide segapopulatsiooni töödeldi RluD-ga *in vitro*. Selgus, et lisaks oma looduslikele substraadidele tunneb ära ja isomeriseerib RluD ka positsiooni 1916 tekitatud uridiini (Joonis 17 A, Tabel 2). RluD⁻ tüves kasvatatud 50S ribosoomidest puhastatud 23S rRNA-d *in vitro* RluD-ga töödeldes on näha, et

uridiinid tekkivad vaid nendes kohtades, kus asuvad RluD looduslikud substraadid U1911, ja U1917 (Joonis 17 B, Tabel 2). Kui viimast tulemust võrrelda Huang et al., 1998 *in vitro* rRNA-dega saadud tulemustega, siis võib väita, et RluD jaoks on oma substraadi ära tundmisel oluline roll rRNA tertsiaalstruktuuril, kuna siin töös kasutatud rRNA oli *in vivo* ribosoomidesse assambleeritud ja sealt pehmetes tingimustes puhastatud. Tõenäoliselt ei ole *in vitro* transkribeeritud rRNA-l õiget tertsiaalstruktuuri võrreldune ribosoomidest puhastatud 23S rRNA-ga. Siisiki jääb õhku võimalus, et *in vitro* isomeriseerib RluD vähesel määral kõiki RNA üksikahelas olevaid uridiine, mida tavalise CMCT-ga modifitseerimise meetodil ei ole võimalik tuvastada. Selle hüpoteesi kontrollimiseks tuleb teostada täiendavaid eksperimente. Kindlalt võib aga väita, et eelistatult on siiski RluD substraadiks positsioonide 1911 ja 1917 positsioonides olevad uridiinid ja tõenäoliselt isomeriseeritakse ka 1915 positsiooni uridiini, kuid seda CMCT modifitseerimise meetodi ebaspetsiifika tõttu tuvastada ei saa. Kindlalt võib väita ka, et nendes positsioonides asuvate uridiinide isomeriseerimiseks piisab vaid ribosomaalse RNA olemasolust, mis ei ole kompleksis ribosomaalsete valkudega, mis on kooskõlas Wrzesinski et al., 2000 ja Raychaudhuri et al., 1998 tulemustega.

Tabel II. RluD *in vitro* spetsiifika analüüs

Substraat	50S		
	1911	1916	1917
A1912U	+	-	+
A1914U	+	-	+
A1916U	+	+	+
A1919U	+	-	+
wt 23S rRNA	+	-	+

Tabelis on toodud kokkuvõtlikud tulemused pseudouridiini süntaasi RluD spetsiifilisuse kohta *in vitro*. Mutandid on ekspresseeritud RluD⁻ tüves ja töödeldud RluD-ga *in vitro*. Metsik tüüpi 23S rRNA on saadud RluD⁻ tüves ekspresseeritud 50S ribosomaalsetest alaühikutest fenool-kloroform töötusega ja töödeldud RluD-ga *in vitro*. + tähendab, et pseudouridiin on antud positsioonis olemas ja – tähendab, et antud positsioonis pseudouridiin puudub.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida pseudouridiini süntaasi RluD spetsiifikat. Selleks konstrueeriti rida 23S rRNA variante, mis sisaldasid punktmutatsioone heeliks-lingus 69. Erinevaid 23S rRNA variante ekspresseeriti *E.coli* rakkudes ja analüüsti puhastatud rRNA-sid pseudouridiinide suhtes.

Tulemustest selgus, et RluD on väga spetsiifiline ensüüm, mis isomeriseerib *in vivo* vaid kindlaid positsioone heeliks-lingus 69. Lisaks spetsiifilisusele selgus, et RluD isomeriseerib oma substraate üksteisest sõltumatult.

Selles töös uuritud 23S rRNA heeliks-lingu 69 positsioonidest (1911-1919), on A1916 RluD jaoks ainuke oluline spetsiifilisuse determinant. Mutatsioonid selles positsioonis mõjutavad olulisel määral RluD spetsiifilisust substraadi suhtes.

RluD ei vaja substraadina peptiidside sünteesil aktiivseid ribosome.

In vitro katsetest selgus, et RluD isomeriseerib lisaks oma tavalistele substraat uridiinidele (1911, 1915, 1917) ka positsiooni A1916 viidud uridiini. Seega *in vitro* RluD spetsiifika väheneb.

Ribosomaalsed vagud ei ole RluD spetsiifilisuseks vajalikud, kuid RluD on tundlik RNA konformatsiooni suhtes.

Lisaks selgus, et uridiinide mitte isomeriseerimine pseudouridiiniks, toob kaasa ka 1915 positsiooni spetsiifilise metülaasi aktiivsuse vähenemine substraadi suhtes.

Summary

In the current study specificity of the pseudouridine synthase RluD was studied. For this purpose a number of rRNA variants that contained point mutations in the helix-loop 69, was generated. Mutant rRNA-s were expressed in *E.coli* cells. Mutant ribosomes were purified by affinity chromatography and analysed for Ψ formation.

Our *in vivo* results show that RluD synthesizes uridines only at certain positions. We also found that pseudouridines are synthesized independently from each other by RluD.

Analysis of single point mutations in 23S rRNA positions 1911 to 1919 showed that only position 1916 is crucial for RluD specificity in helix-loop 69.

Mutant ribosomes that are defective in peptidyltransferase reaction contain pseudouridines in helix-loop 69 which are made by RluD. Therefore RluD does not need ribosomes that are active in protein synthesis for its specificity.

Pseudouridine in position 1915 is usually methylated by a still unknown methylase. We found that lack of pseudouridines in helix-loop 69 causes decreased activity of this unknown methylase.

Our *in vitro* experiments showed that RluD synthesizes not only uridines that are its natural substrates but also isomerizes uridine at position 1916. This means that RluD is less specific *in vitro* than *in vivo*.

RluD does not need ribosomal proteins for its specificity but it is sensitive to RNA conformation.

Kasutatud kirjandus

- Agrawal, R.K., Sharma, M.R., Kiel, M.C., Hirokawa, G., Booth, T.M., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Kaji, A., and Frank, J.** (2004). Visualization of ribosome-recycling factor on the Escherichia coli 70S ribosome: functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8900-8905.
- Ali, I.K., Lancaster, L., Feinberg, J., Joseph, S., and Noller, H.F.** (2006). Deletion of a conserved, central ribosomal intersubunit RNA bridge. *Molecular cell* 23, 865-874.
- Arluison, V., Hountondji, C., Robert, B., and Grosjean, H.** (1998). Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry* 37, 7268-7276.
- Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R.A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A.** (1998). A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* 93, 1105-1115.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A.** (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science (New York, N.Y)* 289, 905-920.
- Brosius, J., Dull, T.J., and Noller, H.F.** (1980). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 201-204.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., and Noller, H.F.** (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4801-4805.
- Brownlee, G.G., Sanger, F., and Barrell, B.G.** (1967). Nucleotide sequence of 5S-ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nature* 215, 735-736.
- Charette, M., and Gray, M.W.** (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB life* 49, 341-351.
- Chaudhuri, B.N., Chan, S., Perry, L.J., and Yeates, T.O.** (2004). Crystal structure of the apo forms of psi 55 tRNA pseudouridine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*: a hinge at the base of the catalytic cleft. *The Journal of biological chemistry* 279, 24585-24591.
- Conrad, J., Niu, L., Rudd, K., Lane, B.G., and Ofengand, J.** (1999). 16S ribosomal RNA pseudouridine synthase RsuA of *Escherichia coli*: deletion, mutation of the conserved Asp102 residue, and sequence comparison among all other pseudouridine synthases. *RNA (New York, N.Y)* 5, 751-763.
- Davis, D.R.** (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research* 23, 5020-5026.

Davis, D.R., Veltri, C.A., and Nielsen, L. (1998). An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA^{Lys}, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr}. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 15, 1121-1132.

Davis, F.F., and Allen, F.W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of biological chemistry* 227, 907-915.

Del Campo, M., Kaya, Y., and Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA* (New York, N.Y 7, 1603-1615.

Del Campo, M., Ofengand, J., and Malhotra, A. (2004). Crystal structure of the catalytic domain of RluD, the only rRNA pseudouridine synthase required for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* (New York, N.Y 10, 231-239.

Dohme, F., and Nierhaus, K.H. (1976). Role of 5S RNA in assembly and function of the 50S subunit from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 2221-2225.

Erdmann, V.A., Fahnestock, S., Higo, K., and Nomura, M. (1971). Role of 5S RNA in the functions of 50S ribosomal subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 2932-2936.

Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 318-322.

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

Green, R., and Noller, H.F. (1999). Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* 38, 1772-1779.

Gu, X., Liu, Y., and Santi, D.V. (1999). The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14270-14275.

Gu, X., Yu, M., Ivanetich, K.M., and Santi, D.V. (1998). Molecular recognition of tRNA by tRNA pseudouridine 55 synthase. *Biochemistry* 37, 339-343.

Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Raychaudhuri, S., and Ofengand, J. (2001). A second function for pseudouridine synthases: A point mutant of RluD unable to form pseudouridines 1911, 1915, and 1917 in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA restores normal growth to an RluD-minus strain. *RNA* (New York, N.Y 7, 990-998.

Gutgsell, N.S., Deutscher, M.P., and Ofengand, J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *RNA* (New York, N.Y 11, 1141-1152.

Hamma, T., and Ferre-D'Amare, A.R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & biology* 13, 1125-1135.

Hamma, T., and Ferre-D'Amare, A.R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & biology* 13, 1125-1135.

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

Hoang, C., Chen, J., Vizthum, C.A., Kandel, J.M., Hamilton, C.S., Mueller, E.G., and Ferre-D'Amare, A.R. (2006). Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure. *Molecular cell* 24, 535-545.

Hoang, C., and Ferre-D'Amare, A.R. (2001). Cocystal structure of a tRNA Psi55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme. *Cell* 107, 929-939.

Hoang, C., and Ferre-D'Amare, A.R. (2004). Crystal structure of the highly divergent pseudouridine synthase TruD reveals a circular permutation of a conserved fold. *RNA (New York, N.Y)* 10, 1026-1033.

Horan, L.H., and Noller, H.F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4881-4885.

Huang, L., Ku, J., Pookanjanatavip, M., Gu, X., Wang, D., Greene, P.J., and Santi, D.V. (1998). Identification of two Escherichia coli pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry* 37, 15951-15957.

Huang, L., Pookanjanatavip, M., Gu, X., and Santi, D.V. (1998). A conserved aspartate of tRNA pseudouridine synthase is essential for activity and a probable nucleophilic catalyst. *Biochemistry* 37, 344-351.

Hur, S., and Stroud, R.M. (2007). How U38, 39, and 40 of Many tRNAs Become the Targets for Pseudouridylation by TruA. *Molecular cell* 26, 189-203.

Kaya, Y., and Ofengand, J. (2003). A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *RNA (New York, N.Y)* 9, 711-721.

Khaitovich, P., Tenson, T., Kloss, P., and Mankin, A.S. (1999). Reconstitution of functionally active Thermus aquaticus large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA. *Biochemistry* 38, 1780-1788.

Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO journal* 20, 3617-3622.

Klaholz, B.P., Myasnikov, A.G., and Van Heel, M. (2004). Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis. *Nature* 427, 862-865.

Koonin, E.V. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic acids research* 24, 2411-2415.

Kowalak, J.A., Bruenger, E., Hashizume, T., Peltier, J.M., Ofengand, J., and McCloskey, J.A. (1996). Structural characterization of U*-1915 in domain IV from *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA as 3-methylpseudouridine. *Nucleic acids research* 24, 688-693.

Lane, B.G., Ofengand, J., and Gray, M.W. (1992). Pseudouridine in the large-subunit (23 S-like) ribosomal RNA. The site of peptidyl transfer in the ribosome? *FEBS letters* 302, 1-4.

Lane, B.G., Ofengand, J., and Gray, M.W. (1995). Pseudouridine and O2'-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. *Biochimie* 77, 7-15.

Lebars, I., Yoshizawa, S., Stenholm, A.R., Guittet, E., Douthwaite, S., and Fourmy, D. (2003). Structure of 23S rRNA hairpin 35 and its interaction with the tylosin-resistance methyltransferase RlmAII. *The EMBO journal* 22, 183-192.

Leclerc, D., and Brakier-Gingras, L. (1990). Study of the function of *Escherichia coli* ribosomal RNA through site-directed mutagenesis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 68, 169-179.

Leonov, A.A., Sergiev, P.V., Bogdanov, A.A., Brimacombe, R., and Dontsova, O.A. (2003). Affinity purification of ribosomes with a lethal G2655C mutation in 23 S rRNA that affects the translocation. *The Journal of biological chemistry* 278, 25664-25670.

Lewicki, B.T., Margus, T., Remme, J., and 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.

Liiv, A., Karitkina, D., Maivali, U., and Remme, J. (2005). Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC molecular biology* 6, 18.

Liu, M., Novotny, G.W., and Douthwaite, S. (2004). Methylation of 23S rRNA nucleotide G745 is a secondary function of the RlmAI methyltransferase. *RNA (New York, N.Y)* 10, 1713-1720.

Maivali, U., and Remme, J. (2004). Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *RNA (New York, N.Y)* 10, 600-604.

Mizutani, K., Machida, Y., Unzai, S., Park, S.Y., and Tame, J.R. (2004). Crystal structures of the catalytic domains of pseudouridine synthases RluC and RluD from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43, 4454-4463.

Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annual review of biochemistry* 72, 813-850.

- Neumann, J.M., Bernassau, J.M., Gueron, M., and Tran-Dinh, S.** (1980). Comparative conformations of uridine and pseudouridine and their derivatives. *European journal of biochemistry / FEBS* 108, 457-463.
- Noller, H.F.** (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annual review of biochemistry* 60, 191-227.
- Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R., and Waese, C.R.** (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic acids research* 9, 6167-6189.
- O'Connor, M., and Dahlberg, A.E.** (1995). The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *Journal of molecular biology* 254, 838-847.
- Ofengand, J.** (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS letters* 514, 17-25.
- Ofengand, J., and Bakin, A.** (1997). Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts. *Journal of molecular biology* 266, 246-268.
- Ramakrishnan, V.** (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572.
- Ramamurthy, V., Swann, S.L., Paulson, J.L., Spedaliere, C.J., and Mueller, E.G.** (1999). Critical aspartic acid residues in pseudouridine synthases. *The Journal of biological chemistry* 274, 22225-22230.
- Rawat, U.B., Zavialov, A.V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R.A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., and Frank, J.** (2003). A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* 421, 87-90.
- Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B.G., and Ofengand, J.** (1998). A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y)* 4, 1407-1417.
- Samuelsson, T., and Olsson, M.** (1990). Transfer RNA pseudouridine synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 265, 8782-8787.
- Schattner, P., Decatur, W.A., Davis, C.A., Ares, M., Jr., Fournier, M.J., and Lowe, T.M.** (2004). Genome-wide searching for pseudouridylation guide snoRNAs: analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic acids research* 32, 4281-4296.
- Sivaraman, J., Iannuzzi, P., Cygler, M., and Matte, A.** (2004). Crystal structure of the RluD pseudouridine synthase catalytic module, an enzyme that modifies 23S rRNA and is essential for normal cell growth of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 335, 87-101.

- Smith, J.E., Cooperman, B.S., and Mitchell, P.** (1992). Methylation sites in *Escherichia coli* ribosomal RNA: localization and identification of four new sites of methylation in 23S rRNA. *Biochemistry* 31, 10825-10834.
- Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J.** (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107, 373-386.
- Spahn, C.M., Remme, J., Schafer, M.A., and Nierhaus, K.H.** (1996). Mutational analysis of two highly conserved UGG sequences of 23 S rRNA from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 271, 32849-32856.
- Spedaliere, C.J., Hamilton, C.S., and Mueller, E.G.** (2000). Functional importance of motif I of pseudouridine synthases: mutagenesis of aligned lysine and proline residues. *Biochemistry* 39, 9459-9465.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M., and Frank, J.** (2003). Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nature structural biology* 10, 899-906.
- Wilson, D.N., Blaha, G., Connell, S.R., Ivanov, P.V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y., and Nierhaus, K.H.** (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Current protein & peptide science* 3, 1-53.
- Wilson, D.N., and Nierhaus, K.H.** (2003). The ribosome through the looking glass. *Angewandte Chemie (International ed)* 42, 3464-3486.
- Wrzesinski, J., Bakin, A., Ofengand, J., and Lane, B.G.** (2000). Isolation and properties of *Escherichia coli* 23S-RNA pseudouridine 1911, 1915, 1917 synthase (RluD). *IUBMB life* 50, 33-37.
- Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B.G., and 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 (New York, N.Y)* 1, 437-448.
- Yarian, C.S., Basti, M.M., Cain, R.J., Ansari, G., Guenther, R.H., Sochacka, E., Czerwinska, G., Malkiewicz, A., and Agris, P.F.** (1999). Structural and functional roles of the N1- and N3-protons of psi at tRNA's position 39. *Nucleic acids research* 27, 3543-3549.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F.** (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y)* 292, 883-896.

Lisa 1.

Thermus thermophilus 16S rRNA sekundaarstruktuur (Yusupov *et al.* 2001).
Sekundaarstruktuuri 5', tsentraalne, 3' suur ja 3'väike domeen on vastavalt tähistatud.

