

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

***Escherichia coli* 23S ribosomaalset RNA-d modifitseeriva ensüümi RlmE roll  
ribosoomide biogeneesil**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Tiina Kaljuste

Juhendaja PhD Aivar Liiv

TARTU 2023

## INFOLEHT

### ***Escherichia coli* 23S ribosomaalset RNA-d modifitseeriva ensüümi RlmE roll ribosoomide biogeneesisil**

Ribosoom on ribonukleoproteiini kompleks, mis viib läbi valgusünteesi nii prokarüootides kui eukarüootides. Ribosoom koosneb ribosomaalsetest valkudest ja ribosomaalsest RNA-st. Ribosomaalset RNA-d modifitseeritakse transkriptsioonijärgselt ribosoomi biogeneesi käigus. Kuigi enamus rRNA modifikatsioone ja neid läbiviivaid ensüüme on teada, pole nende kindel funktsioon üheselt selge.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli välja selgitada *Escherichia coli* 23S rRNA-d modifitseeriva ensüümi RlmE roll ribosoomide biogeneesisil. Põhitulemustest on selgub, et katalüütiliselt inaktiivsed RlmE mutandid K38A ja D124A suudavad kompenseerida  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defekte. Töö tulemuste põhjal saab järeldada, et RlmE-l võib olla rRNA metüleerimisest sõltumatu funktsioon.

**Märksõnad:** valgusüntees, ribosoomide biogenees, rRNA modifikatsioonid, rRNA modifikatsiooniensüümid, metüültransferaas RlmE

**CERCS kood:** P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

### **The role of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA modification enzyme RlmE in ribosome biogenesis**

Ribosome is a ribonucleoprotein complex that plays a key role in protein synthesis. Ribosomes are made of ribosomal RNA and ribosomal proteins. The ribosomal RNA is modified in all organisms. Most of the modifications are known to be in functionally important regions of the ribosome. Although most modifications are known, their exact function in ribosome is not clear.

This thesis aimed to analyze the role of methyltransferase RlmE and investigate whether it has another role besides methylating the RNA. The main results show that the catalytically inactive RlmE mutants K38A and D124A compensate for the growth and ribosome biogenesis defects of the  $\Delta rlmE$  and  $\Delta 10$  strains. Based on the results, it can be concluded that RlmE may have a methylation-independent function.

**Keywords:** protein synthesis, ribosomal biogenesis, rRNA modifications, rRNA modification enzymes, methyltransferase RlmE

**CERCS code:** P320 Nucleic acids, protein synthesis

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Ribosoomi üldiseloomustus .....	7
1.2. Ribosomaalne RNA (rRNA).....	7
1.3. rRNA modifikatsioonid .....	12
1.4. Modifikatsiooniensüümid .....	13
1.5. Metüültransferaas RlmE ja modifikatsioon Um2552 .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika .....	17
2.2.1. <i>E. coli</i> tüved ja plasmiidid .....	17
2.2.2. Praimerid .....	18
2.2.3. Söötmed.....	19
2.2.4. Puhvrid, ensüümid ja reagentid .....	19
2.2.5. <i>E. coli</i> tüvede konstrueerimine .....	19
2.2.5.1. Mutagenees polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR) .....	19
2.2.6. Kasvuanalüüs.....	21
2.2.7. Ribosoomide fraktsioneerimine ultratsentrifuugiga sahharoosgradiendis .....	21
2.3. Tulemused ja arutelu.....	23
2.3.1. Eksperimentaalosa tegevusplaan .....	23
2.3.2. Konstrueeritud <i>Escherichia coli</i> tüved .....	25
2.3.3. Kasvukiiruse ja generatsiooniaegade analüüs .....	26
2.3.4. Ribosoomide profiili analüüs .....	33
KOKKUVÕTE .....	39
SUMMARY .....	40

TÄNUSÕNAD .....	41
KASUTATUD KIRJANDUS .....	42
LISAD .....	48
LISA 1. Modifitseeritud nukleosiidide HPLC analüüs.....	48
LIHTLITSENTS.....	49

## KASUTATUD LÜHENDID

CAM – klooramfenikool

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia

K<sub>m</sub> – kanamütsiin

LP – lüüsipuhver

MQ - Milli-Q vesi, mis on ülipuhas

nm – nanomeeter

OD – optiline tihedus

OV puhver – *overlay* puhver

PTC – peptidüültransferaasne tsester

RlmE – ribosomaalse RNA suure subühiku metüültransferaas E

*rpm* – pööret minutis (*revolutions per minute*)

rRNA – ribosomaalne RNA

tRNA – transport RNA

U – ühik (*unit*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Ribosoom on kõikides organismides valgusünteesi eest vastutav makromolekulaarne kompleks. Nii ribosoomid kui valgusüntees on pikalt olnud huvipakkuvaks teemaks teadusmaastikul. Üks uuritumaid ribosoomi ja selle funktsioneerimise mudelorganisme on *Escherichia coli*.

*E. coli* ribosoom moodustub suurest ja väiksest alaühikust. Suur subühik koosneb 23S ja 5S rRNA-st ning ribosomaalsetest valkudest ja väike subühik 16S rRNA-st ning ribosomaalsetest valkudest. 23S rRNA jaguneb omakorda seitsmeks domeeniks. Domeenis V asub peptiidideme moodustumiseks oluline peptidüültransferaasne tsender (PTC).

Ribosomaalse RNA modifikatsioonid arvatakse olevat olulised ribosoomi peenhäälestuses. Modifikatsioone viivad läbi kindlad ensüümid ribosoomi biogeneesi käigus. Suur osa modifikatsioonidest on koondunud ribosoomi funktsionaalselt olulistesse piirkondadesse. 23S rRNA domeenis V, kus asub peptidüültransferaasne tsender, on enim modifitseeritud nukleotiide, täpsemalt 13. Modifikatsioone jagatakse laias laastus kaheks – erinevateks nukleotiidide metülatsioonideks ning uridiini isomerisatsiooni pseudouridiiniks. Kuigi enamus modifikatsioone ja neid katalüüsivaid ensüüme on teada, puudub selge arusaam nende täpsest funktsioonist ribosoomis. Käesolevas töös omab keskset rolli 23S rRNA domeen V modifikatsiooniensüüm RlmE, mis metüleerib riboosi 2'-hüdoksüüli positsioonis U2552. Hager *et al.* (2002) artikli tulemuste põhjal on kirjeldatud kolm RlmE katalüütiliselt aktiivset aminohappejääki – kaks lüsiini positsioonides 38 ja 164 ning üks aspartaat positsioonis 124. RlmE puudumisel esineb rakkudes tugev kasvu- ja ribosoomi biogeneesi defekt (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Pole üheselt selge, kas kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defekti põhjustab Um2552 metülatsiooni puudumine või on RlmE-l sekundaarne roll ribosoomide biogeneesisil.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaade jaguneb viieks osaks, kus antakse lühiülevaade ribosoomist, ribosomaalsest rRNA-st, keskendudes 23S rRNA ja selle domeenidele, rRNA modifikatsioonidest ja neid läbiviivatest ensüümidest. Eraldi tuuakse välja ka teadaolev informatsioon metüültransferaas RlmE-st ning Um2552 modifikatsioonist. Töö eesmärk on välja selgitada, kas modifikatsiooniensüümil RlmE võib olla peale rRNA metüleerimise veel sekundaarne funktsioon. Selleks konstrueeritakse katalüütiliselt inaktiivset valku ekspresseeriva plasmiidiga tüved ning analüüsitakse nende tüvede kasvu ja ribosoomide biogeneesi.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Ribosoomi üldiseloomustus

Ribosoom on ribosomaalsest RNA-st (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud) koosnev keeruline makromolekul, mis vastutab kõikides eludomeenides valgusünteesi ehk translatsiooni läbiviimise eest. Ribosoom transleerib mRNA-s sisalduva geneetilise info aminohapetest koosnevaks polüpeptiidahelaks.

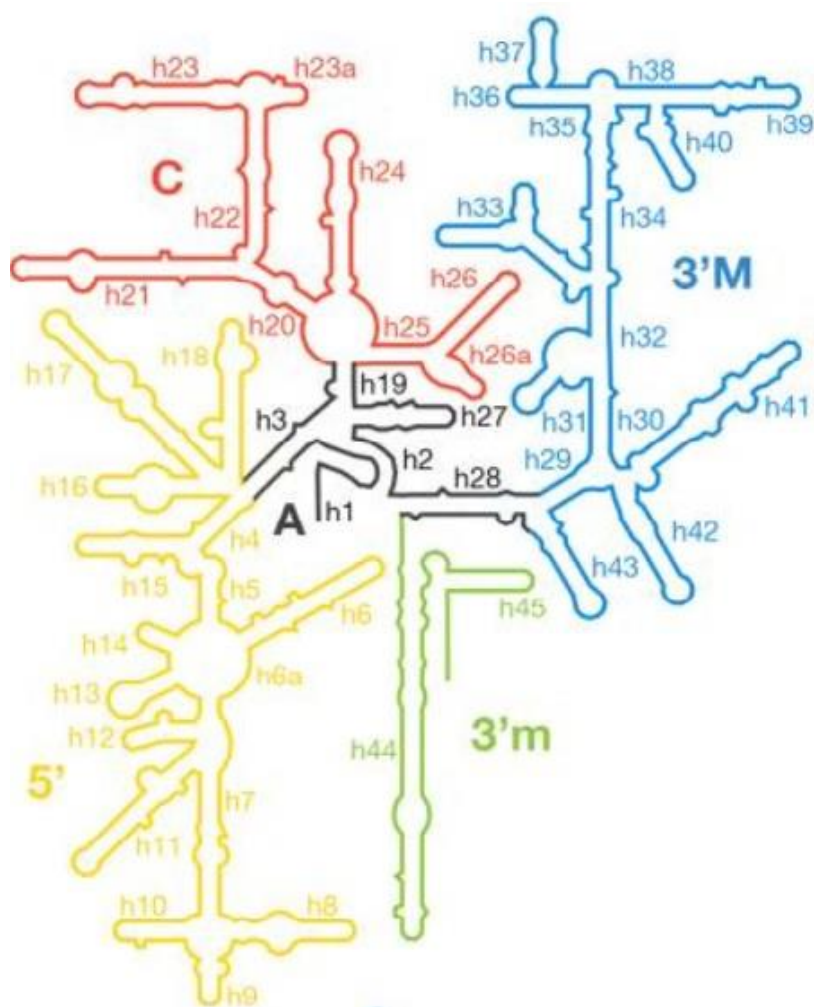
Funktsionaalne ribosoom moodustub kahest alaühikust, väikesest, 30S (prokarüootidel) või 40S (eukarüootidel), subühikust ja suurest, 50S (prokarüootidel) või 60S (eukarüootidel), subühikust, mida defineeritakse nende sedimentatsioonikoefitsendi järgi Svedbergi ühikutes (S). Kokku moodustavad väike ja suur subühik prokarüootidel 70S ribosoomi ja eukarüootidel 80S ribosoomi. Subühikud on omavahel seotud mitmete sildadega (Frank *et al.*, 1995), kokku on sildu üle 10 (Yusupov *et al.*, 2001). Kuna ribosoomide biogenees peab olema kiire ja efektiivne, kulutab rakk oma metabolismist märkimisväärne osa ribosoomi komponentide sünteesimiseks (Frank, 2000).

*Escherichia coli*'l koosneb ribosoom ribosomaalsetest valkudest ja kolmest rRNA molekulist – suures subühikus 23S ja 5S rRNA molekulist ja väikeses subühikus 16S rRNA molekulist. Kõrges ribosoomis on kolm funktsionaalselt väga olulist piirkonda, A-, P- ja E-piirkond, millega seondub transport-RNA (tRNA) (Rheinberger *et al.*, 1981). A- ehk aminoatsüül-piirkonnaga on seotud tRNA, mille 3' otsas olev aminohape on kättesaadav uueks peptiidideme moodustumiseks (Selmer *et al.*, 2006). P- ehk peptidüül-piirkonnas hoitakse kasvava polüpeptiidahelaga tRNA-d kindlalt paigal, et tagada korrektne peptidüülülekanne ja säilitada lugemisraam (Selmer *et al.*, 2006). E- ehk *exit*-piirkonnast väljub deatsüülitud tRNA. Suures subühikus asub peptidüültransferaasne tšenter (PTC), kus toimub aminohapetevaheline peptiidideme moodustumine, samuti asuvad seal translatsiooniks olulisi faktoreid siduvad piirkonnad (Ban *et al.*, 2000). PTC koosneb suure osas 23S rRNA-st ja katalüüsib peptiididemete sünteesi. Seetõttu nimetatakse ribosoomi ka ribosüümideks ehk katalüütilisteks RNA-deks (Nissen *et al.*, 2000). PTC all asub sünteesitud polüpeptiidi väljumistunnel, mis lõpeb suure subühiku tagaküljel (Moore ja Steitz, 2003). Väikeses subühikus toimub mRNA ja tRNA koodon-antikoodon omavaheline äratundmine, mis on oluline mRNA dekodeerimiseks (Clemons Jr *et al.*, 1999).

## 1.2. Ribosomaalne RNA (rRNA)

Ribosomaalne RNA on ribonukleiinhape, mis on ribosoomi üks peamisi komponente, moodustades ribosoomist umbes 2/3. rRNA koondub nii 30S kui 50S subühikus domeenideks.

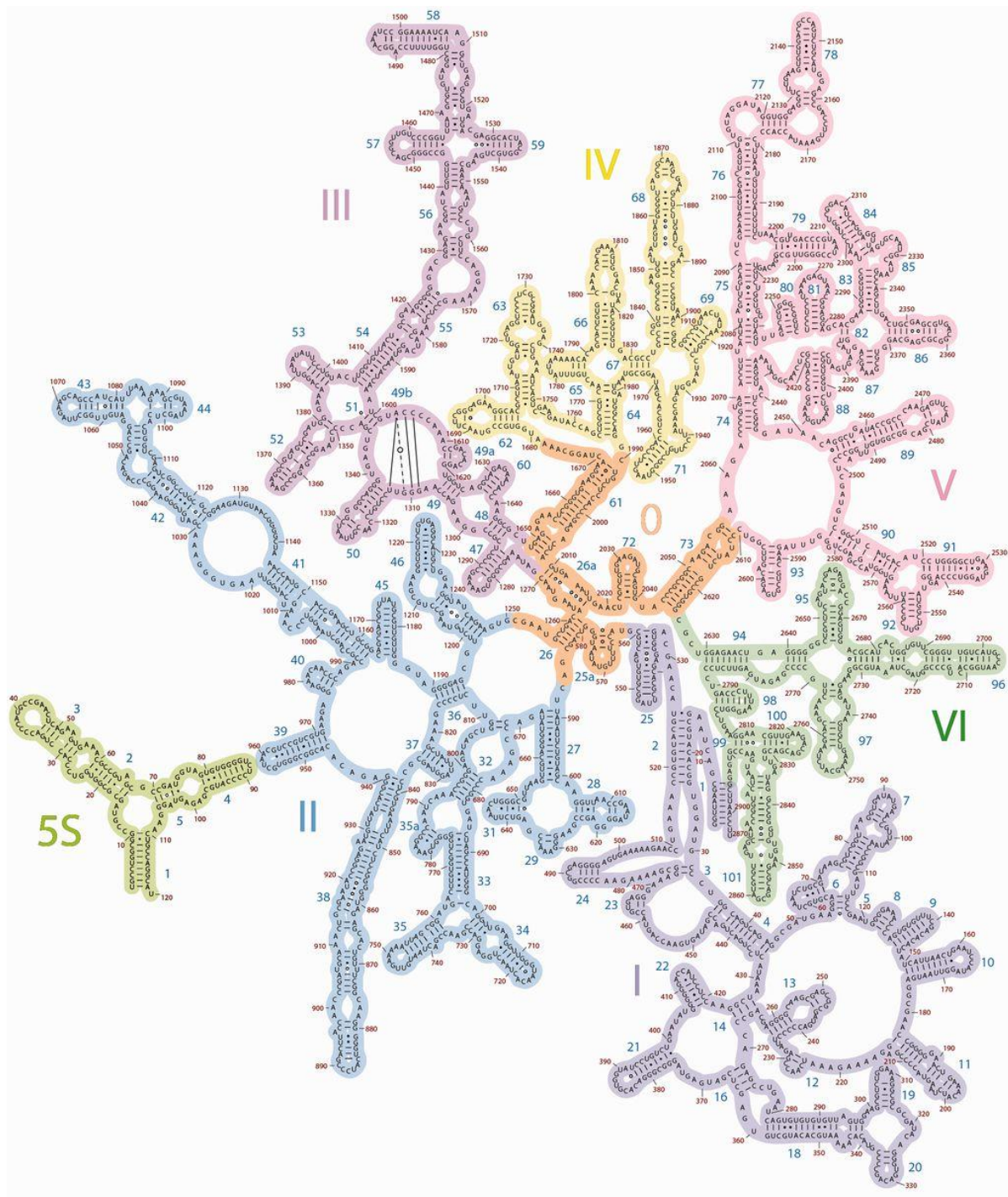
Petrov *et al.* (2013) defineerisid domeeni kui kompaktse ja tervikliku, kuid üksteisest sõltumatute osadega (modulaarse) struktuuri, mis on võimeline iseseisvalt voltuma. Sellele viitab iseseisev molekulaarsete interaktsioonide seos, mis stabiliseerib struktuuri. mRNA 5' otsas asub Shine-Dalgarno järjestus, mis paardub 16S rRNA 3' otsas oleva anti-Shine-Dalgarno järjestusega (Schluzen *et al.*, 2000), mis on vajalik translatsiooni initsiatsiooniks. 16S rRNA koosneb neljast domeenist – tsentraalne domeen, 5' domeen, 3' mažoorne ning 3' minoorne domeen, kõiki domeene ühendab domeen A (Joonis 1) (Gulen *et al.*, 2016). 16S rRNA domeenid on suhteliselt iseseisvad, st moodustavad ribosoomis iseseisvaid üksusi. 5' domeen ja 3' minoorne domeen moodustavad 30S subühiku keha ja 3' mažoorne domeen pea osa (Wimberly *et al.*, 2000).



**Joonis 1. *Escherichia coli* 16S rRNA sekundaarstruktuur.** Kõiki domeene ühendav keskne domeen A on märgitud mustaga, 5' domeen kollasega, tsentraalne (C) domeen punasega, 3' mažoorne (3'M) sinisega ja 3' minoorne domeen rohelisega (Gulen *et al.*, 2016).

Käesolevas töös keskendutakse 23S rRNA-le. 23S rRNA koosneb 2904 nukleotiidist ning jaguneb 7 domeeniks: 0, I, II, III, IV, V ja VI (Joonis 2). 5S rRNA interakteerub domeenidega II ja V ning seda peetakse ka kaheksandaks domeeniks (Petrov *et al.*, 2013). Võrreldes 16S

rRNA-ga interakteeruvad 23S rRNA domeenid üksteisega tihedalt ning moodustavad ühtse n-ö läbipõimunud struktuuri (Ban *et al.*, 2000). Seetõttu on suurt subühikut tervikuna vaadates raske domeene üksteisest eristada.



**Joonis 2.** 23S rRNA sekundaarstruktuuri 7 domeeni ja 5S rRNA. Domeen 0 on märgitud oranžiga, domeen I lillaga, domeen II sinisega, domeen III tumeroosaga, domeen IV rohelisega, domeen V heleroosaga ja domeen VI on märgitud rohelisega, 5S rRNA on märgitud helerohelisega (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen 0 moodustab 23S rRNA keskosa, mis ühendab kõiki teisi domeene (Petrov *et al.*, 2013). See koosneb nukleotiididest 562–586, 1251–1270, 1648–1678, 1990–2057, 2611–2625,

mis omakorda moodustavad kuus heeliksit – 25, 26, 26a, 61, 72 ja 73. Heeliksud on üksteisega tihedalt ühendatud ja interakteeruvad seetõttu vähem välise rRNA-ga. Domeenil 0 arvatakse olevat ka struktuurne roll, kuna see sisaldab vagu, mis võtab enda alla peptitüültransferaase tsentri (PTC) A- ja P-piirkonna ning hoiab neid üksteise lähedal (Petrov *et al.*, 2013). Domeenis 0 asub üks modifitseeritud nukleotiid, m<sup>6</sup>A2030, mille sünteesi eest vastutab valk RlmJ/YhiR (Golovina *et al.*, 2012).

Domeen I moodustavad nukleotiidid 1–561, 2895–2904 (Petrov *et al.*, 2013). Domeen I ümbritseb koos domeeniga III polüpeptiidi väljumiskanalit (Yusupov *et al.*, 2001). Domeen I omab interaktsioone domeenidega II, III, IV ja V (Ban *et al.*, 2000) ning ei sisalda teadaolevalt ühtegi modifitseeritud nukleotiidi.

Domeen II koosneb nukleotiididest 587–1250 (Petrov *et al.*, 2013) ja on 23S rRNA suurim domeen. Domeenis II asub GTPaasne tsepter, mis on oluline translatsiooni elongatsioonifaktorite seondumiseks. Domeen II interakteerub domeenidega I, III, IV, V (Ban *et al.*, 2000). Domeen II-s on leitud järgmised modifikatsioonid: m<sup>1</sup>G745, Ψ746, m<sup>5</sup>G747 ning Ψ955 (Ofengand ja Campo, 2004).

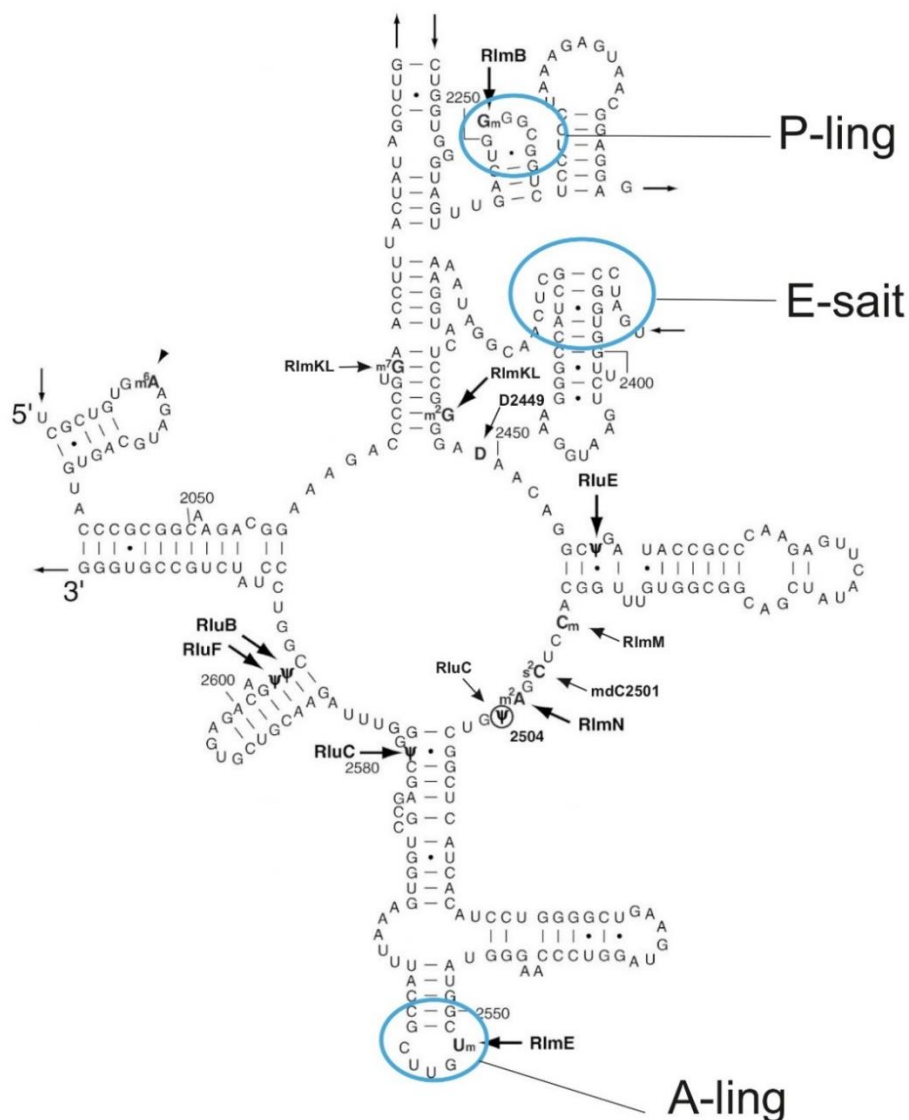
Domeen III moodustub nukleotiididest 1271–1647 (Petrov *et al.*, 2013). Domeen III asub suure subühiku alumisel, subühikutevahelisel poolel ning interakteerub kõikidest domeenidest vähim domeeniga V (Ban *et al.*, 2000). Domeenis III on üks modifitseeritud nukleotiid m<sup>6</sup>A1618 (Ofengand ja Campo, 2004).

Domeen IV koosneb nukleotiididest 1679–1989 (Petrov *et al.*, 2013). Domeen IV vahendusel moodustub enim sildu suure ja väikese subühiku vahel (Yusupov *et al.*, 2001). Domeenis IV olev heeliks 69 interakteerub 16S rRNA-ga (Ban *et al.*, 2000). Lisaks on heeliksil võime samaaegselt interakteeruda A- ja P-saidis oleva tRNA-ga (Yusupov *et al.*, 2001). Heeliks 69 on koos heeliksiga 34 vajalik ribosoomi stabiilsuseks (Maiväli ja Remme, 2004). On leitud, et mutatsioonid heeliksis 69 põhjustavad nii translatsiooni inhibitsiooni kui probleeme 70S ribosoomi moodustumisel (Liiv *et al.*, 2005). Domeenis IV on teadaolevalt kuus modifikatsiooni – m<sup>2</sup>G1835, Ψ1911, m<sup>5</sup>Ψ1915, Ψ1917, m<sup>5</sup>U1939 ning m<sup>5</sup>C1962 (Ofengand ja Campo, 2004).

Domeen V moodustavad nukleotiidid 2058–2610 (Petrov *et al.*, 2013). Domeen V on 50S subühikus kesksel kohal ning sellega interakteeruvad domeenid I, II, IV ja VI (Ban *et al.*, 2000). Domeenis V paikneb peptidüültransferaasne tsepter (PTC), millel on oluline roll translatsioonil. Samuti on domeenis V on kolm funktsionaalselt tähtsat piirkonda – A-ling (heeliks 92), P-ling (heeliks 80) ja E-piirkond, mille kaudu väljub deatsüülitud tRNA. A-ling interakteerub

aminoatsüül-tRNA-ga (Blanchard ja Puglisi, 2001) ja P-ling peptidüül-tRNA-ga. Heeliks 89-93 stabiliseerivad ribosoomi elongatsioonifaktoreid siduvat ala (Ban *et al.*, 2000). Domeenis V on kõigest domeenidest enim modifikatsioone (Joonis 3). Selles leiduvad 13 modifikatsiooni on järgmised: m<sup>7</sup>G2069, Gm2251, m<sup>2</sup>G2445, hU2449, Ψ2454, Cm2498, mdC2501, m<sup>2</sup>A2503, Ψ2504, Um2552, Ψ2580, Ψ2604 ning Ψ2605 (Ofengand ja Campo, 2004).

Domeen VI moodustub nukleotiididest 2626–2894 (Petrov *et al.*, 2013) ja on 23S rRNA väikseim domeen. Domeen VI heeliksis 95 asub sartsiin-ritsiin-ling (SRL) (Ban *et al.*, 2000), mis on oluline elongatsioonifaktorite seondumisel (Correll *et al.*, 1998). Domeen VI interakteerub domeenidega II, III, IV ja V ning nagu ka domeenis I, puuduvad selles modifitseeritud nukleotiidid.

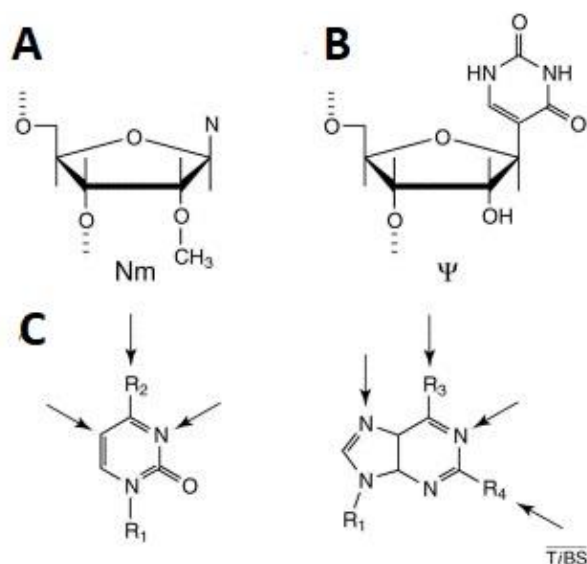


**Joonis 3. 23S rRNA domeen V modifikatsioonid ning nende sünteesi eest vastutavad teadaolevad ensüümid.** Modifitseeritud nukleotiidid ja neid modifikatsioone läbiviivad ensüümid on tähistatud tumedamas kirjas. Sinise ringiga on märgitud A-ling, P-ling ja E-sait. (Joonis kohandatud Toh ja Mankin, (2008) artikli põhjal)

### 1.3. rRNA modifikatsioonid

Ribosomaalne RNA on modifitseeritud kõigis eludomeenides. rRNA modifitseerimine toimub biogeneesi käigus ning seda viivad läbi erinevad modifikatsiooniensüümid. Modifikatsioone on võimalik jagada kokkuvõtvalt kolmeks: uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks, metülatsioonid ning lämmastikaluste (*base*) modifikatsioonid (Joonis 4). Decatur ja Fournier (2002) andmete põhjal saab rRNA metülatsioone jagada veel omakorda 2'-O riboosi metülatsioonideks ja lämmastikaluste metülatsioonideks. Nii prokarüootides kui eukarüootides on kõige enam just metüleeritud nukleotiide. rRNA modifikatsioone saab jagada ka selle järgi, millises ribosoomide biogeneesi etapis on need sünteesitud – kas siis varajased, vahepealsed (*intermediate*) või hilised assambleerumisspetsiifilised modifikatsioonid (Siibak ja Remme, 2010).

Modifikatsioonide arv ja keerukus rRNA-s sõltub organismist. *Escherichia coli*'s on kokku teadaolevalt 36 modifitseeritud rRNA nukleotiidi (Decatur ja Fournier, 2002). 16S rRNA-s on 11 modifitseeritud nukleotiidi ja 23S rRNA-s on neid 25 (Ofengand ja Campo, 2004). Inimeses on juba ainuüksi 2'-O metülatsioone leitud üle saja (Maden, 1990). Pärmis on vähemalt 109 modifitseeritud nukleotiidi, millest suures subühikus on üle 70 ja väikses üle 30 (Decatur ja Fournier, 2002).



**Joonis 4. rRNA enimlevinud modifikatsioonid.** (A) Riboosi 2'-O metülatsioon (Nm). (B) Uridiini isomerisatsioonil tekkinud pseudouridiin ( $\Psi$ ). (C) Nooltega on näidatud lämmastikaluste metülatsiooni positsioonid, mis moodustavad ülejäänud osa rRNA modifikatsioonidest. (Decatur ja Fournier, 2002)

Kuigi suur osa modifitseeritud nukleotiididest on teada nii prokarüootides kui eukarüootides, on paljude roll ribosoomides välja selgitamata. Valdav osa rRNA modifikatsioonidest asuvad

konserveerunud ning funktsionaalselt olulistes piirkondades, mis viitab modifikatsioonide tähtsusele. Näiteks on *E. coli* pseudouridiinid Ψ2454, Ψ2504, Ψ2580, Ψ2604 ja Ψ2605 suures subühikus koondunud peptidüültransferaasse tsentriga ühenduses või selle lähedal olevatesse aladesse (Ofengand et al., 1995). Kuigi rRNA modifikatsioonid on küll olulised, pole need üksikult võttes raku ellujäämiseks vajalikud (Green ja Noller, 1996). On pakutud, et rRNA modifikatsioonid panustavad seega ribosoomi peenhäälestusse. 16S rRNA kõikide modifikatsioonide puudumisel moodustub endiselt funktsionaalne 30S subühik (Krzyszosiak et al., 1987), kuid 50S subühik on tugevamalt mõjutatud rRNA modifikatsioonide olemasolust ja koosmõjust. Seda näitasid Green ja Noller (1996), kes leidsid 23S rRNA domeenis V umbes 80 nukleotiidi pikkuse ala (nt 2445–2523), mille deleteerimine põhjustas võimetuse *in vitro* moodustada funktsionaalset 50S subühikut. Nimetatud piirkonnas asub 7 modifikatsiooni, mis võivad koos olla ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud. Kui eemaldada kümne PTC läheduses modifikatsioone läbiviiva ensüümi geenid, on *E. coli*'s näha tugevat kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defekti (Ero et al., avaldamisel andmed). See kinnitab rRNA modifikatsioonide olulisust suures subühikus.

#### 1.4. Modifikatsioonienzüümid

*E. coli*'s modifitseerivad nukleotiide koha- või regioonispetsiifilised valgud, samas kui eukarüootides vastutavad modifikatsioonide katalüüsivast väikesed tuuma-RNA-valk kompleksid (snoRNP-d) (Decatur ja Fournier, 2002). Väikesed tuuma-RNA-d (sno-RNA) määravad ära modifitseeritava rRNA positsiooni ja vastavad kompleksi valgud modifitseerivad seda (Kiss, 2001).

Modifikatsioonienzüümid modifitseerivad rRNA-d ribosoomi biogeneesi erinevates etappides. Sellest sõltuvalt modifitseerivad ensüümid kas vaba rRNA-d, biogeneesi vaheprodukte või juba küpset ribosoomi subühikut.

23S rRNA modifikatsioonienzüümid jagatakse järgmiselt: pseudouridiini süntetaasid ja metüültransferaasid ning ensüümid, mis katalüüsivad harva esinevate modifikatsioonide sünteesi. Selline on näiteks valk RlhA, mis vastutab ho<sup>5</sup>C2501 sünteesi eest (Kimura et al., 2017). Pseudouridiinisüntetaasid isomeriseerivad uridiini pseudouridiiniks, sünteesimiseks pole vaja lisaenergiat ega kofaktoreid. *E. coli* 23S rRNA uridiini isomerisatsiooni läbiviivad ensüümid on näidatud *Tabelis 1*. RluC ja RluD vastutavad üksi kolme uridiini isomerisatsiooni eest (Conrad et al., 1998; Raychaudhuri et al., 1998). Metüültransferaasid katalüüsivad metüülrühma ülekannet ja kasutavad metüülrühma doonorina S-adenosüül-L-metioniini (SAM). *E. coli* 23S rRNA metüültransferaasid on esitatud *Tabelis 2*.

**Tabel 1. *Escherichia coli* 23S rRNA pseudouridiinid ja neid sünteesivad pseudouridiini süntetaasid.**

Modifikatsioon	Ensüüm	Allikas
Ψ746	RluA	(Raychaudhuri <i>et al.</i> , 1999)
Ψ2457	RluE	(DEL CAMPO <i>et al.</i> , 2001)
Ψ2604	RluF	(DEL CAMPO <i>et al.</i> , 2001)
Ψ2605	RluB	(DEL CAMPO <i>et al.</i> , 2001)
Ψ955, Ψ2504, Ψ2580	RluC	(Conrad <i>et al.</i> , 1998)
Ψ1911, Ψ1915, Ψ1917	RluD	(Raychaudhuri <i>et al.</i> , 1998)

**Tabel 2. *Escherichia coli* 23S rRNA metülatsioonid ja metüültransferaasid.**

Modifikatsioon	Ensüüm	Allikas
m <sup>1</sup> G745	RlmA	(Gustafsson ja Persson, 1998)
m <sup>5</sup> U747	RlmC	(Madsen <i>et al.</i> , 2003)
m <sup>5</sup> A1618	RlmF	(Sergiev <i>et al.</i> , 2008)
m <sup>2</sup> G1835	RlmG	(Sergiev <i>et al.</i> , 2006)
m <sup>3</sup> Ψ1915	RlmH	(Ero <i>et al.</i> , 2008; Purta, Kaminska, <i>et al.</i> , 2008)
m <sup>5</sup> U1939	RlmD	(Madsen <i>et al.</i> , 2003)
m <sup>5</sup> C1962	RlmI	(Purta <i>et al.</i> , 2008)
m <sup>6</sup> A2030	RlmJ	(Golovina <i>et al.</i> , 2012)
m <sup>7</sup> G2069, m <sup>2</sup> G2445	RlmKL	(Kimura <i>et al.</i> , 2011)
Gm2251	RlmB	(Lövgren ja Wikström, 2001)
Cm2498	RlmM	(Purta <i>et al.</i> , 2009)
m <sup>2</sup> A2503	RlmN	(Toh <i>et al.</i> , 2008)
Um2552	RlmE	(Bügl <i>et al.</i> , 2000; Caldas <i>et al.</i> , 2000)

Kuna käesolev bakalaureusetöö keskendub domeeni V modifikatsioonienzymele RlmE, antakse lühilevaade ka teistest domeenis V olevatest metüültransferaasidest. 23S rRNA V domeenis asub kokku 13 modifikatsiooni (Joonis 3), millest 6 on metülatsioonid. Neid metülatsioone viivad läbi viis metüültransferaasi: RlmKL, RlmB, RlmM, RlmN ja RlmE.

RlmKL metüleerib guanosiini positsioonides 2069 ja 2445, millest moodustuvad 7-metüülguanosiin ja N<sup>2</sup>-metüülguanosiin (Kimura *et al.*, 2011). RlmK sünteesib m<sup>7</sup>G2069 modifikatsiooni. m<sup>2</sup>G2445 modifikatsiooni puudumine, mida viib läbi RlmL, põhjustab *E. coli* rakkudes aeglasemat kasvu (Lesnyak *et al.*, 2006). RlmKL modifitseerib oma substraati ribosoomi biogeneesi varajases etapis (Siibak ja Remme, 2010), ensüümi substraadiks on vaba 23S rRNA. Kimura *et al.* (2011) tulemuste põhjal moodustub ensüüm RlmKL N-terminaalsest RlmL-ist ja C-terminaalsest RlmK-st, mistõttu pakutakse, et see on tekkinud kahe ensüümi liitumisel.

RlmB viib läbi nukleotiidi G2251 metüleerimist (Gm2251), mis asub domeen V P-lingus. RlmB metüleerib guanosiini positsioonis 2251 ribosoomi biogeneesi keskmises etapis (Siibak ja Remme, 2010). Gm2251 metülatsiooni puudumine ei põhjusta ribosoomi biogeneesi ega kasvudefekte (Lövgren ja Wikström, 2001).

RlmM katalüüsib nukleotiidi C2498 2'-O-metülatsiooni (Cm2498). RlmM modifitseerib 23S rRNA-d ribosoomi biogeneesi keskmises etapis (Siibak ja Remme, 2010). Metüültransferaas RlmM suudab metüleerida vaid valguvaba 23S rRNA-d, 50S subühikut või 70S ribosoomi aga mitte (Purta et al., 2009). Ensüümi puudumine aeglustab rakkude kasvu vähesel määral (Purta et al., 2009).

RlmN metüleerib nukleotiidi A2503, moodustades m<sup>2</sup>A2503. Vastav nukleotiid asub peptiidahela väljumistunneli alguses. Ensüümi RlmN puudumine *E. coli*'s ei mõjuta rakkude kasvukiirust, kuid vähendab rakkude tundlikkust antibiootikumide suhtes ja ka rakkude kohasust (Toh et al., 2008).

Ero et al. (avaldamisel) andmete põhjal panustavad bakteri kohasusele ensüümide RluC, RlmKL RlmN, RlmB ja RlmE sünteesitud modifikatsioonid, aidates kaasa ribosoomi biogeneesile ja funktsionaalsusele.

### **1.5. Metüültransferaas RlmE ja modifikatsioon Um2552**

RlmE (ribosomaalse RNA suure subühiku metüültransferaas E), sünonüümselt FtsJ/RrmJ, on ensüüm, mis katalüüsib uridiini 2'-O-metülatsiooni 23S rRNA A-lingus positsioonis 2552. Um2552 on universaalselt konserveerunud nukleotiid peptitüüdtransferaasse tsentri keskmises 23S rRNA V domeenis (Moazed & Noller, 1989). RlmE-d kodeerib geen *rrmJ* (Caldas et al., 2000) ning ensüüm on SAM-ist sõltuv (Bügl et al., 2000). RlmE on konserveerunud kõigis eludomeenides, mis viitab ensüümi universaalsele tähtsusele. On leitud, et U2552 metüleerimine toimub ribosoomi küpsemise hilistes etappides (Bügl et al., 2000). Väitele annab kinnitust ka see, et RlmE eelistab substraadina ribosoomi või selle partikleid, mitte vaba rRNA-d (Caldas et al., 2000).

RlmE kuulub kuumašokivalkude perekonda. RlmE puudumisest tekkinud defektid avalduvad siiski ka madalamatel temperatuuridel (Caldas et al., 2000). Metüültransferaasi RlmE deletsioonitüve generatsiooniaeg rikkas söötmes on metsiktüvest kaks korda pikem mõõdetuna temperatuuridel 10°C-42°C (Caldas et al., 2000). Um2552 metülatsiooni puudumisel 50S ja 30S subühikud akumulereuvad, mis viitab ribosoomide biogeneesi defektile. RlmE deletsioonitüves suureneb vabade 50S ja 30S subühikute osakaal ning väheneb polüsoomide ja

70S ribosoomide hulk (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Samuti akumulatsioonid 50S subühikute kõrval ka 45S partiklid (Bügl *et al.*, 2000), mis on 50S subühiku eellaspartiklik (Arai *et al.*, 2015). Arai *et al.* (2015) tõestasid, et 45S partiklist saab *in vitro* osaliselt rekonstrueerida 50S subühiku, kui RlmE metüleerib nukleotiidi U2552 töötlemata ribosoomide juuresolekul. Lisaks väitsid nad oma töö tulemust põhjal, et 50S assambleerumise hiliseid etappe mõjutab pigem Um2552 modifikatsiooni olemasolu kui ensüüm RlmE seondumine 45S eellaspartikliga.  $\Delta rlmE$  tüves suudavad vaid pooled 50S subühikutest seonduda kiirel subühikute assotsiatsioonil (*fast subunit association*) ning on kaks korda aeglasemad *wild type* (WT) 50S subühikust (Wang *et al.*, 2020). See selgitab vabade 50S subühikute akumulatsiooni ribosoomis ning võib olla aeglase kasvu põhjustajaks.

RlmE puudumisest tekkinud ribosoomide biogeneesi defekti on võimalik leevendada. On leitud, et GTPaaside Obg (YhbZ) ja EngA üleekspresseerimine  $\Delta rlmE$  tüves kompenseerib RlmE valgu puudumisest tulenevat kasvudefekti ning taastab normaalse ribosoomide assambleerumise ja 70S ribosoomide stabiilsuse (Tan *et al.*, 2002).

Hager *et al.* (2002) avaldasid töö, milles analüüsisid, millised aminohappejäägid on vajalikud Um2552 metülatsiooni katalüüsis. Selleks konstrueerisid nad mitmeid kohtspetsiifilisi mutante ja leidsid, et RlmE-l on kolm katalüütiliselt aktiivset aminohappejääki. Nendeks on kaks lüsiini ja üks aspartaat positsioonides K38, D124 ja K164. Aminohappejäägid asendati nimetatud positsioonidesalaniiniga. Artikli tulemuste põhjal väitsid autorid, et mutantsetes valkudes ei toimu struktuurseid ümberkorraldusi, sest SAM-iga seondumise afiinsus oli samaväärne *wild type* RlmE-ga. Leitud aminohappejääkide mutandid põhjustasid metüültransferaasi aktiivsuse tugevat langust *in vitro*. Selleks, et uurida mutantide *in vivo* funktsiooni, analüüsitati nende kasvu ja polüsoomide profiile. Saadud tulemused näitasid, et mutandid ei suuda kompenseerida RlmE deletsioonitüve kasvudefekti ega taastada metsiktüvele omast polüsoomide profiili. Selle põhjal järeldati, et mutandid on katalüütiliselt inaktiivsed ning aminohappejäägid K38, D124 ja K164 omavad olulist rolli RlmE funktsioneerimisel.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö laiem eesmärk oli iseloomustada 23S ribosomaalset RNA-d modifitseeriva ensüümi RlmE rolli ribosoomide biogeneesis. Täpsemalt sooviti teada saada, kas RlmE-l on peale rRNA modifitseerimise (metüleerimise) sekundaarne funktsioon. Püstitati tööhüpotees, mille kohaselt on metüültransferaas RlmE-l sekundaarne, metüleerimisvõimest sõltumatu, funktsioon ribosoomide biogeneesis.

Hüpoteesi valideerimiseks koostati eksperimendiplaan, mis sisaldas järgmisi etappe:

- 1) muteeritud RlmE-d ekspresseerivate tüvede konstrueerimine;
- 2) muteeritud RlmE-d ekspresseerivate tüvede kasvufenotüüpide analüüs;
- 3) muteeritud RlmE-d ekspresseerivate tüvede ribosoomide profiili analüüs.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. *E. coli* tüved ja plasmiidid

Tabel 3. *E. coli* tüved.

Tüve nimi	Iseloomustus	Allikas
<b>MG1655</b>	F- $\lambda$ - ilvG- rfb-50 rph-1	Kommertsiaalne tüvi
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	F-, $\Delta$ (argF-lac)169, $\phi$ 80dlacZ58(M15), $\Delta$ phoA8, glnX44(AS), $\lambda$ -, deoR481, rfbC1?, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17	Kommertsiaalne tüvi
<b><math>\Delta</math>10</b>	MG1655; F- $\lambda$ - ilvG- rfb-50 rph-1, $\Delta$ rluC, $\Delta$ rlmKL, $\Delta$ rlmM, $\Delta$ rlmN, $\Delta$ rluE, $\Delta$ rluB, $\Delta$ rluF, $\Delta$ rlmB ja $\Delta$ rlhA, Km <sup>R</sup>	Jaanus Remme labor
<b><math>\Delta</math>rlmE</b>	MG1655; $\Delta$ rlmE, Km <sup>R</sup>	Jaanus Remme labor

Tabel 4. Kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
<b>pHBT-<i>rlmE</i></b>	pHSG576 derivaat, pCS101 replikatsiooni origin; tac promootor; CAM <sup>R</sup> , sisaldab RlmE-d kodeerivat geeni	Jaanus Remme labor
<b>pHBT-<i>rlmE</i> (K38A)</b>	pHBT- <i>rlmE</i> derivaat; CAM <sup>R</sup> , sisaldab K38A mutatsiooni <i>rlmE</i> geenis	Käesolev bakalaureusetöö
<b>pHBT-<i>rlmE</i> (D124A)</b>	pHBT- <i>rlmE</i> derivaat; CAM <sup>R</sup> , sisaldab D124A mutatsiooni <i>rlmE</i> geenis	Käesolev bakalaureusetöö

<b>pHBT-<i>rlmE</i> (K164A)</b>	pHBT- <i>rlmE</i> derivaat; CAM <sup>R</sup> , sisaldab K164A mutatsiooni <i>rlmE</i> geenis	Käesolev bakalaureusetöö
<b>pHBT</b>	pHSG576 derivaat, pCS101 replikatsiooni origin; <i>tac</i> promootor; CAM <sup>R</sup> , „tühi“ kontrollplasmiid	Jaanus Remme labor

Plasmiid pHBT-*rlmE* on madala koopiaarvuga plasmiid (sisaldab pCS101 *origini*), mis konstrueeriti kahest plasmiidist – pDR540, millelt võeti *tac* promootor, ja pHSG576, mida kasutati plasmiidi kehana ning kuhu oli kloonitud *rlmE* geen. pHBT-*rlmE* sisaldab klooramfenikooli (CAM) resistentsusmarkerit.

### 2.2.2. Praimerid

**Tabel 5. Kasutatud praimerid.**

Praimeri nimi	5'→3' järjestus	Kasutamine
<b>K38A FOR</b>	CAACAGGCACAGGCAAAGGGGTACGTTCC	pHBT- <i>rlmE</i> (K38A) konstrueerimine
<b>K38A REV</b>	AACATATTTATCGCTAAAGTGTCCTGAAGCCAGC	pHBT- <i>rlmE</i> (K38A) konstrueerimine
<b>D124A FOR</b>	GTTGTCATGTCCGCGATGGCACCAAACATGAG	pHBT- <i>rlmE</i> (D124A) konstrueerimine
<b>D124A REV</b>	CTGGACTTTGCTGTCGCCAACGCGCTCCAGCAGTGC	pHBT- <i>rlmE</i> (D124A) konstrueerimine
<b>K164A FOR</b>	GCAGTTTTGTAGTGGCGGTGTTCCAGGGC	pHBT- <i>rlmE</i> (K164A) konstrueerimine
<b>K164A REV</b>	CACCTGGCGCTAATACATCACGACACATTTTC	pHBT- <i>rlmE</i> (K164A) konstrueerimine
<b>Puc DIR</b>	GTAAAACGACGGCCAGT	pHBT- <i>rlmE</i> konstruktide kontrollimine koloonia-PCR-iga
<b>Puc REV</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	pHBT- <i>rlmE</i> konstruktide kontrollimine koloonia-PCR-iga

### 2.2.3. Söötmed

Tabel 6. Kasutatud söötmed.

Sööde	Koostis	Allikas
Luria-Bertani (LB) agarsööde	1% trüptooni, 0,5% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl, 1,5% agarit	Bertani, 1951
2xYT	1,6% trüptooni, 1% pärmiekstrakti 0,5% NaCl	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

2xYT söötmetele lisati klooramfenikooli vastavalt plasmidi resistentsusmarkerile lõppkontsentratsiooniga 15µg/ml ja kanamütsiini vastavalt bakteritüve resistentsusele lõppkontsentratsiooniga 25µg/ml. LB agarsöötmele lisati vastavalt plasmidi resistentsusele klooramfenikooli (CAM) lõppkontsentratsiooniga 15µg/ml.

### 2.2.4. Puhvrid, ensüümid ja reagentid

Tabel 7. Kasutatud puhvrid, reagentid ja ensüümid.

Nimetus	Koostis
Lüüsi puhver	50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM MgOAc, 16% sahharoos, 6 mM β-merkaptopetanool, mQ vesi
OVERLAY-10 mM puhver	20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM MgOAc, 6 mM β-merkaptopetanool, mQ vesi

Kasutatud ensüümid ja reagentid: DpnI (*Thermo Scientific*); Dnaas I (*Thermo Scientific*); GeneRuler 1 kb marker (*Thermo Scientific*); 5X Phusion HF puhver (*Thermo Scientific*); Phusion PCR Kit (*Thermo Scientific*); polünukleotiidkinaasi (PNK) (*Thermo Scientific*) PEG4000 (*Thermo Scientific*)

### 2.2.5. *E. coli* tüvede konstrueerimine

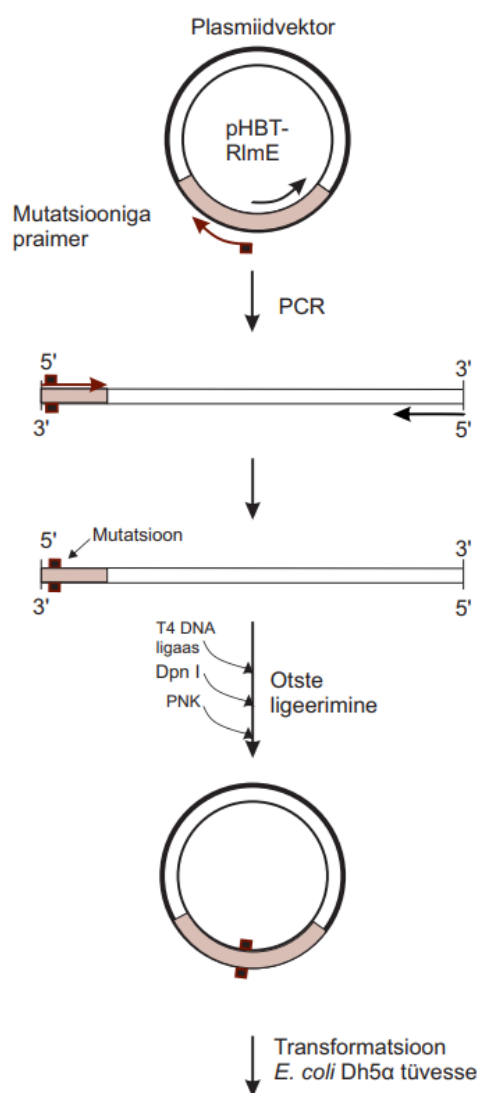
#### 2.2.5.1. Mutagenees polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR)

Mutatsiooni DNA-sse viimiseks kasutati oligonukleotiididega suunatud mutageneesi, mille lihtsustatud skeem on näha *Joonisel 5*. PCR-iks kasutatud praimerid on välja toodud *Tabelis 5*. PCR matriits DNA-na kasutati plasmidi pHBT-*rlmE* (*Tabel 4*) Reaktsioonimaht oli 25µl, mis peale matriits-DNA ja praimerite sisaldas 5X Phusion HF puhvrit, 10mM dNTP-d, Phusion DNA polümeraasi ja mQ (Milli-Q) vett (vastavalt *Thermo Scientific* protokollile). PCR reaktsiooni kestus oli 30 tsükli ja koosnes järgnevatest etappidest:

- 1) Algne denaturatsioon – 30 sekundit temperatuuril 98°C;
- 2) Denaturatsioon – 10 sekundit temperatuuril 98°C;
- 3) Praimeri seondumine ja elongatsioon – 2,5 minutit temperatuuril 72°C;
- 4) Lõplik elongatsioon – 5 minutit temperatuuril 72 °C.

PCR tulemusi vaadeldi 1% agarosgeelil. Saadud DNA fragmentide pikkuse hindamiseks kasutati GeneRuler 1 kb markerit (*Thermo Scientific*).

PCR-DNA töötlemiseks segati 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas peale PCR-segu (50 ng) 10x T4 DNA ligaasi puhvrit (2 µl), 1 µl polünukleotiidkinaasi (PNK) (10 U/µL), mis katalüüsis fosfaatrühma ülekannet DNA 5' otsa, 1 µl DpnI-d (10U/µl), mis lõikas metüleeritud matriits-DNA-d ja mQ-d (vastavalt tootjapoolsele protokollile). Segu inkubeeriti 30 minutit 37°C termostaadis. Reaktsioonisegule lisati 2 µl 50% PEG4000 (*Thermo Scientific*), mida kasutati ligatsiooni efektiivsuse tõstmiseks, ning 1 µl T4 DNA ligaasi (5U/µl) (*Thermo Scientific*). Reaktsioonisegu inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril.



**Joonis 5. Illustratiivne skeem oligonukleotiidiga suunatud mutageneesist.** Mutagenees viidi läbi PCR-iga, kus üks praimeritest sisaldas mutatsiooniga järjestust. PCR segu töödeldi restriksiooniensüümi DpnI-ga, et vabaneda matriits-DNA-st, ja PNK-ga, mis lisas fosfaatrühma DNA 5' otsa. Seejärel ligeeriti DNA otsad ja transformeeriti *E. coli* DH5α tüvesse.

Kompetentsed DH5 $\alpha$  rakud segati jääs ligatsiooniseguga ning hoiti 0°C juures 12 minutit. Transformatsioon DH5 $\alpha$  rakkudesse viidi läbi üheminutilise kuumašoki meetodiga 42°C juures, millele järgnes segu hoidmine 5 minutit jääs. Rakusegu lisati ~1ml 2xYT söödet (Tabel 6) ja inkubeeriti 37°C juures termoblokil 50 minutit 1300 rpm. Rakke tsentrifugeeriti neli minutit lauatsentrifuugis 4000 rpm, eemaldati ~ 900  $\mu$ l supernatanti ja allesjäänud segu suspendeeriti ühtlaseks. ~100  $\mu$ l rakusegu külvati LB+CAM tardsöötmele transformeerunud rakkude selekteerimiseks ja inkubeeriti üleöö 37°C kuumakapis.

Üksikkolooniad kasvatati üleöö 2 ml 2xYT söötmes koos 1  $\mu$ l CAM antibiootikumiga (15 $\mu$ g/ml) 37°C 180 rpm. Plasmiidne DNA eraldati vastavalt *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*'i protokollile ja sekveneeriti mutatsiooni olemasolu kontrollimiseks. Plasmiid transformeeriti  $\Delta$ 10 ja  $\Delta$ rlmE tüvedesse eelmises lõigus kirjeldatud meetodiga.

### 2.2.6. Kasvuanalüüs

Kasvukõverate leidmiseks inokuleeriti igast tüvest üksikkoloonia 2ml 2xYT vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud klooramfenikooli või kanamütsiini lõppkontsentratsioon 15 $\mu$ g/ml või 25 $\mu$ g/ml (v.a MG1655 WT) ja inkubeeriti üleöö 37°C 180 rpm. Üleöökultuurist tehti 2250x lahjendus 2xYT söötmesse. Saadud lahjendussegu kanti 96 kaevuga plaadile, 125  $\mu$ l ühe kaevu kohta. Kultuuri optilist tiheidust mõõdeti üleöö  $A_{600nm}$  juures Biotek Synergy H1 mikroplaadilugejas temperatuuridel 37°C ja 30°C. Iga tüve optiline tihedus mõõdeti vähemalt kolmes bioloogilises korduses ja iga korduse kohta tehti kaks tehnilist replikaati. Pooldumisaja arvutamiseks lahutati saadud mõõtmistulemustest foon (bakteriteta söötme tulemuste keskmine) ja logaritmiti alusel kaks. Saadud andmed kanti graafikule, leiti lineaarse tõusu piirkond ning tõusu pöördväärtuse põhjal arvutati generatsiooniaeg. Tulemustele teostati statistiline analüüs (95% usaldupiiridega t-test).

### 2.2.7. Ribosoomide fraktsioneerimine ultratsentrifuugiga sahharoosgradiendis

Ribosoomide eraldamiseks külvati tardsöötmele üksikkoloonia 2ml 2xYT söötmesse koos 1  $\mu$ l CAM antibiootikumiga (15 $\mu$ g/ml) (v.a MG1655 WT). Segu inkubeeriti üleöö loksutis 37°C 180 rpm. Bakterikultuur lahjendati 100 ml 2xYT söötmes algtiheduseni  $A_{600} \approx 0,05-0,07$ , seejärel inkubeeriti loksutis (37°C, 180rpm), kuni optilise tiheduseni  $A_{600} \approx 1,0-1,5$ . Rakud koguti Rotina 420R lauatsentrifuugis (12 min, 4500 rpm, 4°C) fuugides ja rakuksade resuspendeeriti 0°C juures lüüsipuhvril (LP), milles oli DNase I ( $C_{lõpp} = 40U/ml$ ). Rakud homogeniseeriti kasutades 0,1 mm diameetriga klaaskuule Precellys 24 masinas 3x60s tsükliga, 6000 rpm. Klaaskuulidega rakulüsaat klaariti lauatsentrifuugis 20 min 13 000 rpm 4°C juures. Järgnevalt koguti supernatant ja mõõdeti nukleiinhappe kontsentratsioon lainepikkusel 260 nm.

Lüsaadi ruumala viidi 1xOV-10 puhvris (*Tabel 7*) 500µl-ni nii, et 500 µl-s oleks 30U materjali  $A_{260\text{nm}}$  juures. Lüsaat kanti 15%-30% sahharoosgradiendile ning ultratsentrifuugiti 16,5h 21 500 rpm temperatuuril 4°C,  $\omega^2t = 3 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ . Ultratsentrifuugimiseks kasutati Beckman Coulter rootoreid SW28 ja SW32. Ribosoomi fraktsiooni visualiseerimiseks kasutati läbivoolu-spektrofotomeetrit UVis-920 (tundlikkus 2 AUTS), Heidolph Pumpdrive 5201 peristaltist pumpa (kiirus 5,2 ml/min) ja Biotech REC112 isekirjutajat (kiirus 10mm/min, pinge 1mV). Ribosoomide 50S/70S suhte leidmiseks kvantifitseeriti ribosoomide profiilid ja piigialuse pindala leidmiseks kasutati ImageJ tarkvara (Schneider *et al.*, 2012), mille põhjal arvutati 50S/70S suhe. Tulemustele teostati statistiline analüüs (95% usalduspiiridega t-test).

## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Eksperimendiplaani

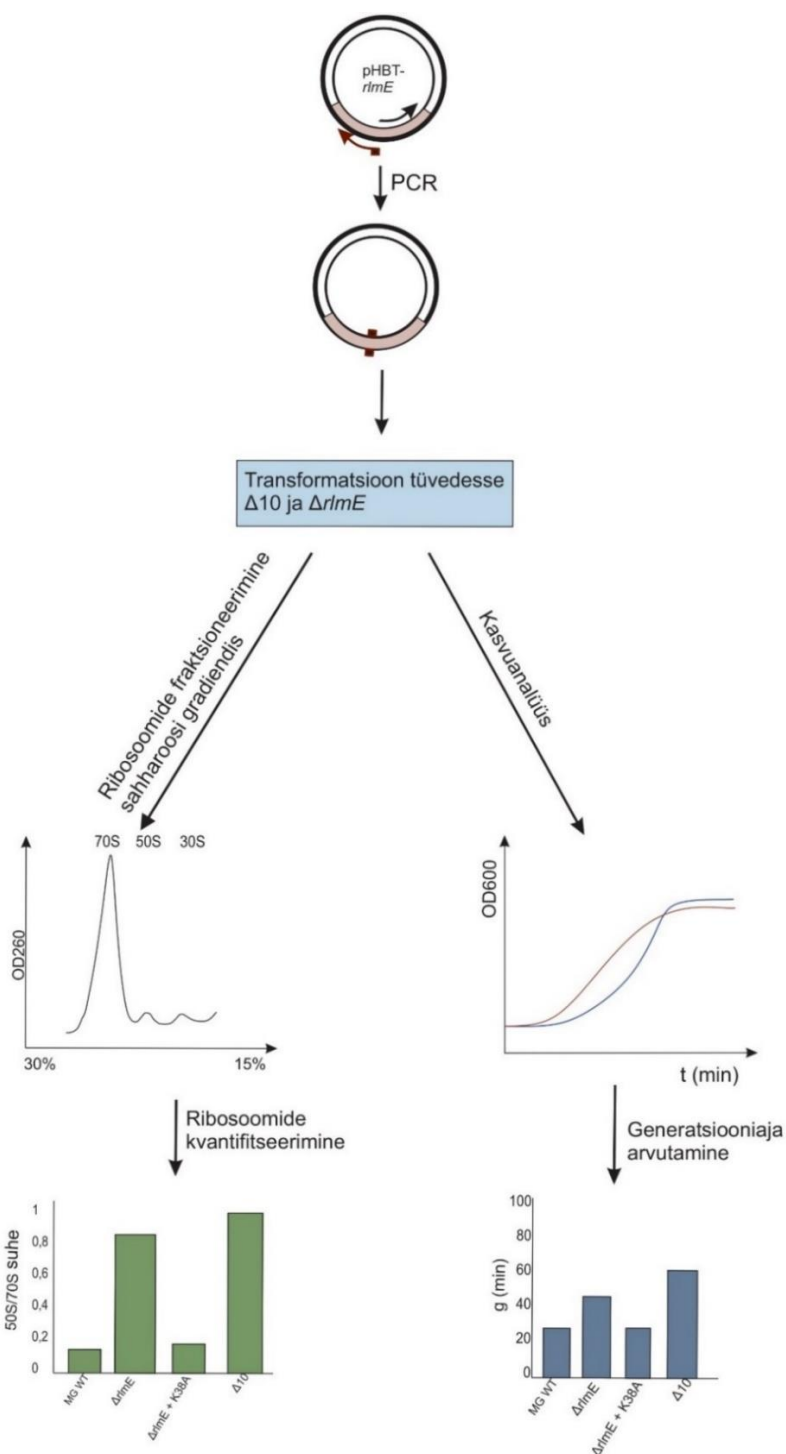
Töö eesmärgiks oli selgitada ensüümi RlmE võimalikku sekundaarset rolli lisaks rRNA metüleerimisele. Selleks konstrueeriti plasmiidid, kus vastava ensüümi katalüütiliselt aktiivsed aminohappejäägid on asendatud. Mutantide konstrueerimisel lähtuti varem kirjanduses avaldatud andmetest, kus on kirjeldatud RlmE kolm katalüütiliselt aktiivset aminohappejääki, millel on oluline roll metüüllekande katalüüsisel – lüsiin positsioonis 38, aspartaat positsioonis 124 ja lüsiin positsioonis 164 (Hager *et al.*, 2002).

Eksperimendiplaani on esitatud *Joonisel 6*. Eksperimenti alustati plasmiidvektorisse (pHBT-*rlmE*) punktmutatsiooni sisseviimisega. RlmE katalüütiliselt aktiivsed aminohappejäägid asendatialaniiniga (Hager *et al.*, 2002). Selleks kasutati ühe-etapilist ja efektiivset oligonukleotiididega suunatud mutageneesi (metoodika optimeeritud J. Remme laboris). Mutageneesi käigus amplifitseeriti terve matriits-DNA, millest hiljem vabanemiseks kasutati metüülatsiooni sõltuvat endonukleaasi DpnI-d. See lagundab vaid metüleeritud DNA-d, mistõttu pole PCR-DNA DpnI substraat ning see jääb alles.

Töös kasutati *E. coli* tüve MG1655 WT referentstüvena. Konstrueeritud plasmiidid transformeeriti *E. coli* tüvedesse  $\Delta 10$  ja  $\Delta rlmE$  (*Tabel 3*), mis on MG1655 derivaadid (konstrueeritud J. Remme laboris). Mõlemas tüves puudus metüültransferaas RlmE-d kodeeriv geen.  $\Delta 10$  tüves on deleteeritud lisaks *rlmE* geenile ka järgmised domeeni V modifikatsioonienüümide geenid:  $\Delta rluC$ ,  $\Delta rlmKL$ ,  $\Delta rlmM$ ,  $\Delta rlmN$ ,  $\Delta rluE$ ,  $\Delta rluB$ ,  $\Delta rluF$ ,  $\Delta rlmB$  ja  $\Delta rlhA$ .

Katalüütiliselt inaktiivset valku ekspresseerivate plasmiidide mõju rakkude kasvule hinnati kahel temperatuuril ning arvutati nende põhjal generatsiooniajad. Kasvukiirust mõõdeti 37°C ja 30°C juures rikkas söötmes (2xYT sööde). Kasvu analüüsiks valiti suboptimaalne temperatuur – 30°C, sest üldjuhul avalduvad madalamal temperatuuril paremini võimalikud biogeneesi- ja kasvudefektid. Selgitamiseks metüleerimisvõimeta mutantide mõju ribosoomide biogeneesile, ribosoomid fraktsioneeriti 15%-30% sahharoosgradiendis ning analüüsiti ribosoomide profiile. Ribosoomid eraldati bakterirakkude logaritmilises kasvufaasis, sest selles faasis toimub aktiivne ribosoomide biogenees. Ribosoomide profiili põhjal saab anda esmase hinnangu sellele, kas ribosoomide biogenees on häiritud. Üheks parameetrik, mis seda iseloomustab, on vabade 50S subühikute hulk võrrelduna küpse 70S ribosoomiga. Kõrge vabade 50S subühikute hulk viitab suure tõenäosusega probleemidele biogeneesis. 50S/70S suhet hinnati ribosoomi profiili vastavate fraktsioonide põhjal, kasutades ImageJ programmi.

Täpsemalt kvantifitseeriti 70S ja 50S piikidealune pindala, mis andis numbrilise väärtuse ribosoomide hulga kohta proovis. Saadud numbrilisi väärtusi võrreldi ja arvutati 50S/70S suhe.



**Joonis 6. Eksperimentaalosa tegevusplaan.** Plasmiidvektorisse *pHBT-rlmE* sisestati mutatsioon oligonukleotiididega suunatud PCR-iga ning transformeeriti see *E. coli* DH5 $\alpha$  tükkesse. Eraldati plasmiid ja transformeeriti see edasi vastavalt  $\Delta 10$  või  $\Delta rlmE$  tükkesse. Esmalt analüüsiti tükede kasvu ja saadi kasvukõverad, mille põhjal arvutati generatsiooniajad. Teises etapis fraktsioneeriti ribosoomid sahharoosgradiendis ning saadi ribosoomide gradiendiprofiil. Profiili põhjal määrati ImageJ programmiga piikidealune pindala ja arvutati selle põhjal 50S/70S suhe.

### 2.3.2. Konstrueeritud *Escherichia coli* tüved

On teada, et modifikatsiooniensüüm RlmE puudumisel kasv aeglustub märgatavalt võrreldes metsiktüvega, samuti on häiritud ribosoomi biogenees (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Siiski pole üheselt selge, kas seda põhjustab vaid Um2552 metülatsiooni puudumine või on RlmE-l veel sekundaarne funktsioon.

Käesoleva töö raames konstrueeriti 23S rRNA V domeeni modifikatsiooniensüümi RlmE uurimiseks *Escherichia coli* tüved, kus plasmiid ekspresseerib katalüütiliselt inaktiivset valku. Samuti konstrueeriti kontrolliks RlmE WT valku ekspresseeriva plasmiidiga ja kontrollplasmiidiga (pHBT) (Tabel 4) tüved. Tüved on näidatud Tabelis 8. Töös valiti lisaks  $\Delta rlmE$  tüvele ka  $\Delta 10$  tüvi. Kuna  $\Delta rlmE$  tüves on olemas kõik domeen V modifikatsiooniensüümide geenid peale *rlmE*, võib see põhjustada olukorra, kus ülejäänud modifikatsioonid võivad n-ö varjutada RlmE puudumise efekti.  $\Delta 10$  tüves on aga kõik domeen V modifikatsiooniensüümide geenid puudu, mistõttu on selline olukord välistatud ning on võimalik analüüsida vaid antud töös huvipakkuvat ensüümi. Muteeritud ensüümi ekspresseeriva plasmiidiga tüved konstrueeriti, et analüüsida nende mõju kasvule ja ribosoomide biogeneesile. Töö raames polnud võimalik uurida K164A mutatsiooni ekspresseeriva plasmiidiga tüvesid. Vaatamata korduvatele katsetele, ei õnnestunud nimetatud konstrukti genereerida, sest kõik analüüsitud plasmiidid sisaldasid insertsioone/deletsioone. On võimalik, et antud mutatsiooniga valgu ekspressioon on rakule mürgine. Kuna K164A mutanti on kirjeldatud varasemalt vaid ühes artiklis (Hager *et al.*, 2002), on vastuolu põhjus ebaselge. K38A või D124A mutanti sisaldava plasmiidiga tüvedel kontrolliti tüvedesse viidud plasmidi korrektsust plasmiidispetsiifiliste praimeritega (Tabel 5) koloonia-PCR meetodiga ja lisaks kontrolliti nii mutatsiooni olemasolu kui ka *rlmE* geeni üldist intaktsust sekveneerimise teel (viis läbi PhD Aivar Liiv).

**Tabel 8. Töös konstrueeritud *E. coli* tüved.**

Tüve nimi	Kasutatud tüvi	Tüves sisalduv plasmiid
$\Delta 10$ + RlmE WT	$\Delta 10$	pHBT- <i>rlmE</i>
$\Delta 10$ + K38A	$\Delta 10$	pHBT- <i>rlmE</i> (K38A)
$\Delta 10$ + D124A	$\Delta 10$	pHBT- <i>rlmE</i> (D124A)
$\Delta 10$ + kontrollplasmiid	$\Delta 10$	pHBT
$\Delta rlmE$ + RlmE WT	$\Delta rlmE$	pHBT- <i>rlmE</i>
$\Delta rlmE$ + K38A	$\Delta rlmE$	pHBT- <i>rlmE</i> (K38A)
$\Delta rlmE$ + D124A	$\Delta rlmE$	pHBT- <i>rlmE</i> (D124A)
$\Delta rlmE$ + kontrollplasmiid	$\Delta rlmE$	pHBT

### 2.3.3. Kasvukiiruse ja generatsiooniaegade analüüs

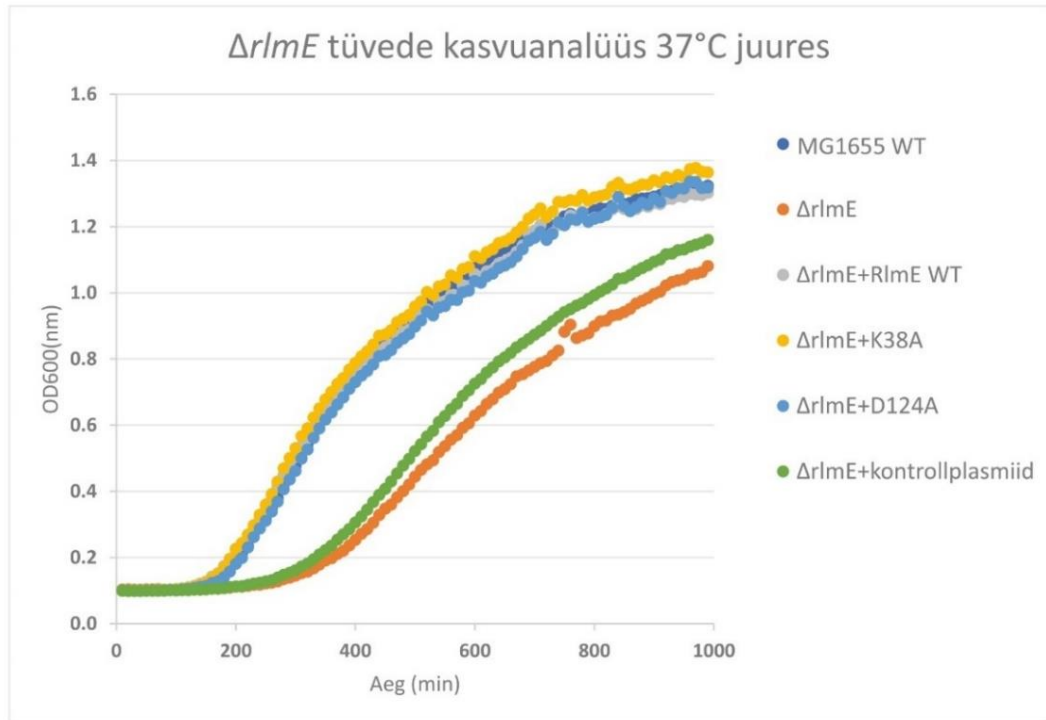
Metüültransferaas RlmE on vajalik rakkude normaalseks kasvuks. Ensüümi puudumine põhjustab *E. coli* rakkudes tugevat kasvudefekt (Bügl *et al.*, 2000). Töö hüpoteesile tuginedes tekib küsimus, kuidas mõjutavad metüleerimisvõimeta mutandid bakterikasvu tüvedes, kus puudub RlmE-d kodeeriv geen? Selleks, et teha kindlaks katalüütiliselt inaktiivsete valkude mõju kasvufenotüübile, analüüsiti bakteri kasvu ning kasvukiiruste põhjal arutati generatsiooniajaid. Juhul, kui metüleerimisvõimeta mutandid mõjutavad ribosoomide biogeneesi, avaldub see nii üldises raku kasvudünaamikas kui ka lühenenud generatsiooniajas. *E. coli* tüvede kasvukiirust hinnati 2xYT rikkas söötmes kahel temperatuuril – 37°C ja 30°C. Lisaks temperatuurile 37°C valiti kasvuanalüüsiks ka 30°C, et tuvastada võimalikud ribosoomi biogeneesi defektid, mis tulevad madalamatel temperatuuridel paremini esile. Iga muteeritud ensüümi ekspresseeriva plasmidi tüvega tehti vähemalt kolm bioloogilise kordusega katseseeriat. Kasvuanalüüsi meetodika on kirjeldatud peatükis 2.2.7. Generatsiooniajad leiti pool-logaritmilises teljestikus kasvukõverate tõusu pöördväärtuse põhjal. *E. coli*  $\Delta rlmE$  tüvede kasvukiiruse võrdlus optimaalsel ja sub-optimaalsel temperatuuril on esitatud *Joonisel 7* ja  $\Delta 10$  tüvede võrdlus *Joonisel 8*.

37°C juures on  $\Delta rlmE$ +RlmE WT,  $\Delta rlmE$ +K38A ja  $\Delta rlmE$ +D124A tüvedel sarnane kasvukiirus võrreldes MG1655 WT-ga.  $\Delta rlmE$  ja kontrollplasmidi sisaldaval  $\Delta rlmE$  tüvel on pikem oote- ehk lag-faas kui metsiktüvel (*Joonis 7A*). Temperatuuril 30°C on  $\Delta rlmE$ +RlmE WT sarnase kasvukiirusega kui MG1655 WT.  $\Delta rlmE$ +K38A ja  $\Delta rlmE$ +D124A log-faas algab ligikaudu 100 minutit hiljem võrreldes metsiktüvega (*Joonis 7B*).  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmid tüvedel algab 30°C juures log-faas märkimisväärselt hiljem kui MG1655 WT-l. Hager *et al.* (2002) avaldatud töös selgub, et 37°C juures K38A ja D124A mutandid ei suuda *rlmE* deletsioonitüve (LB sööde) aeglast kasvu päästa. Käesolevas töös on aga tulemus vastupidine: K38A või D124A mutatsiooniga RlmE valk kompenseerib kasvu  $\Delta rlmE$  tüves sarnaselt metsiktüüpi RlmE valguga. Vastuolu võib tulla töödes kasutatavatest erinevatest tüvedest või mis tüüpi plasmidilt on valk ekspresseeritud. Käesoleva töö katsetest järeldub, et muteeritud valgud käituvad samaväärselt RlmE *wild type* valguga ja suudavad taastada metsiktüve kasvufenotüübi optimaalsel temperatuuril. Siiski tulevad arvestatavad erinevused esile sub-optimaalsetes tingimustes (30°C). Selle põhjal võib oletada, et metüleerimisvõimeta valgud ei suuda madalamal temperatuuril *wild type* valguga võrreldes sama edukalt toetada raku kasvu.

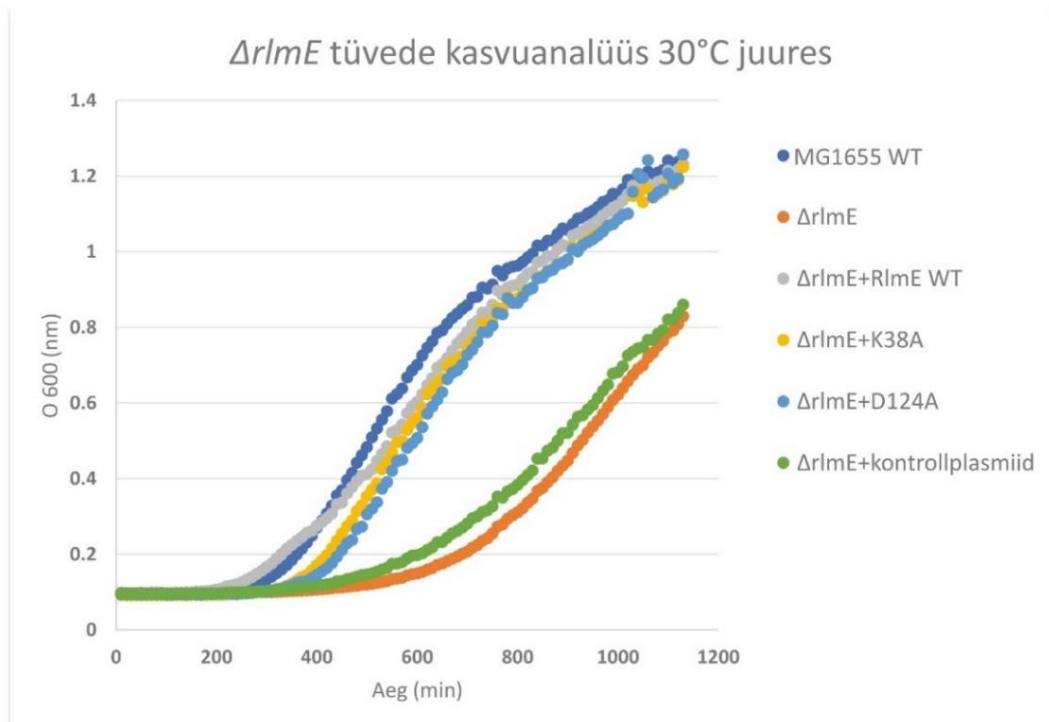
Analoogne kasvuanalüüs teostati ka  $\Delta 10$  tüvega, kus puuduvad kõik domeen V modifikatsiooniensüümid.  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmid tüvel on pikim log-faas nii 37°C kui

30°C juures võrrelduna metsiktüvega. 37°C-l  $\Delta 10$ +RlmE WT,  $\Delta 10$ +K38A ja  $\Delta 10$ +D124A tüvede log-faas on lühem kui  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvedel (*Joonis 8A*). *Wild type* valku või mutantset valku ekspresseeriva plasmiidiga  $\Delta 10$  tüved kasvavad siiski kaks korda aeglasemalt kui metsiktüvi. Seega ei suuda WT valk ja RlmE aktiivtsentri mutandid täielikult kompenseerida MG1655 WT-le omast kasvu optimaaltemperatuuril. 30°C juures kasvavad  $\Delta 10$ +RlmE WT ja  $\Delta 10$ +K38A tüved samuti kaks korda aeglasemalt kui metsiktüvi.  $\Delta 10$ +D124A tüve log-faas on mitteoptimaalsel temperatuuril sarnane  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvega (*Joonis 8B*). Sellest võib oletada, et metüleerimisvõimeta D124A mutant ei suuda madalamal temperatuuril edukalt raku kasvu päästa, kuna ribosoomide biogenees võib olla häiritud.

A

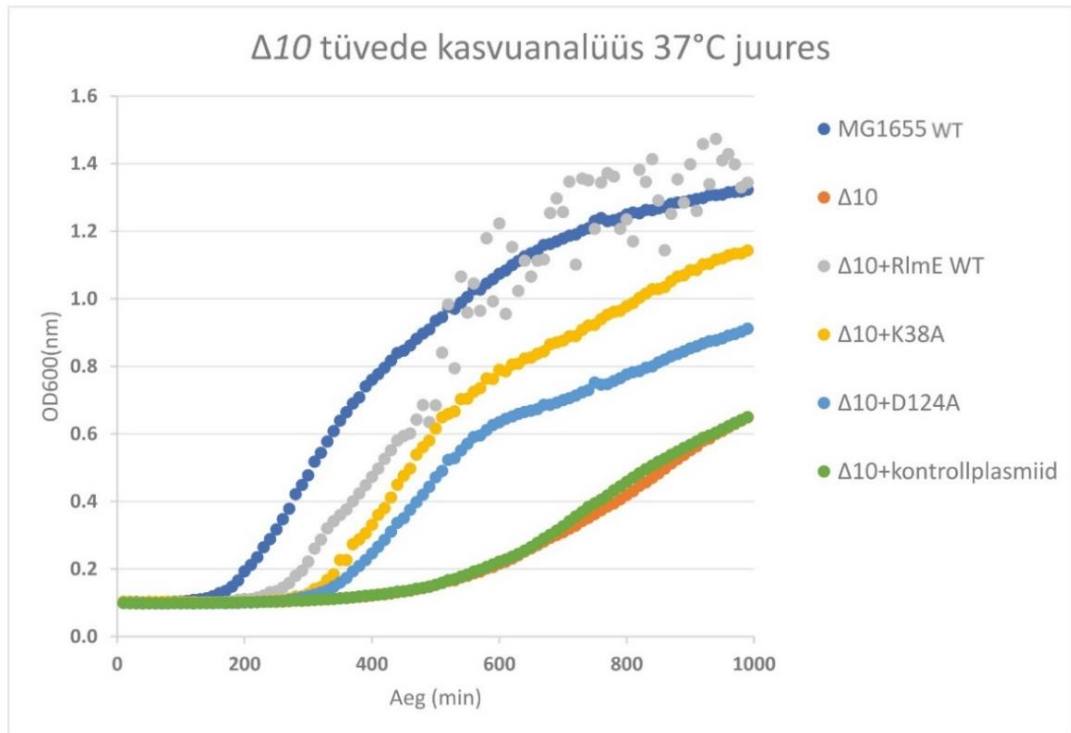


B

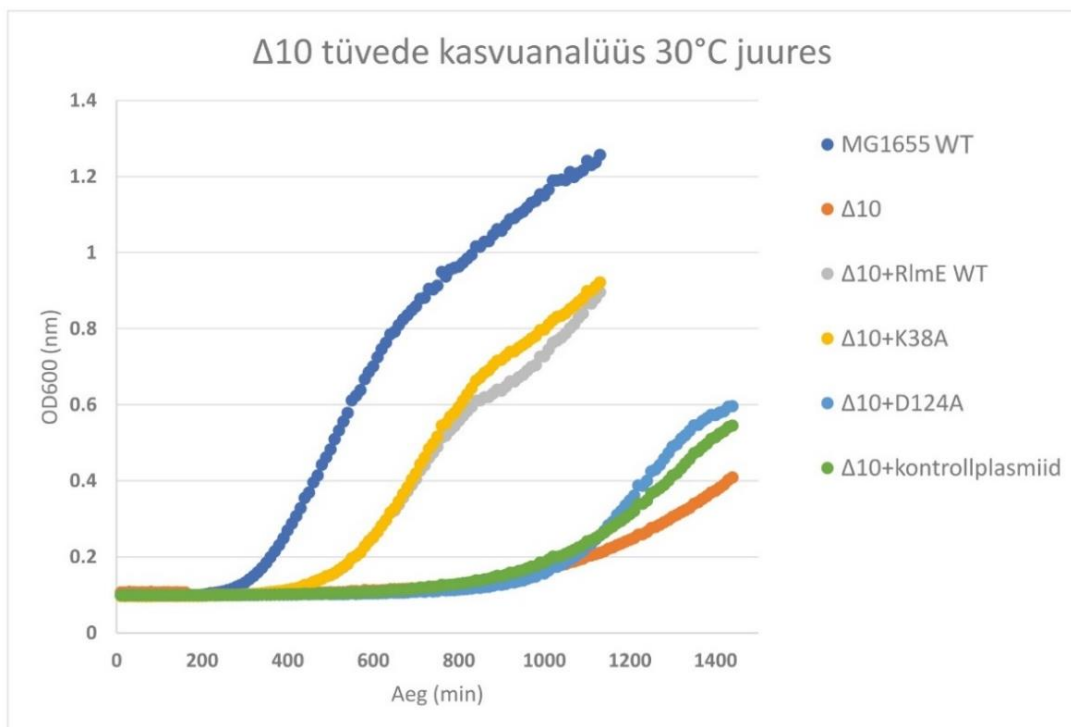


**Joonis 7. *E. coli*  $\Delta$ rlmE tüvede kasvukiiruse võrdlus 37°C ja 30°C juures.** Üleökultuuri (2xYT, 37°C) lahjendati 2225x samas rikkas söötmes (ilma antibiootikumita). Rakke kasvatati ~18-20h ja optilist tihedust mõõdeti iga 10 minuti järel. (A) Tüvede kasvukiirus mõõdetud temperatuuril 37°C, (B) tüvede kasvukiirus mõõdetud temperatuuril 30°C, vertikaalteljel kultuuri optiline tihedus (600 nm) ja horisontaalteljel aeg (minutites). Kasvukõverad saadud vähemalt kolme bioloogilise korduse ja kahe tehnilise replikaadi keskmise põhjal.

A



B

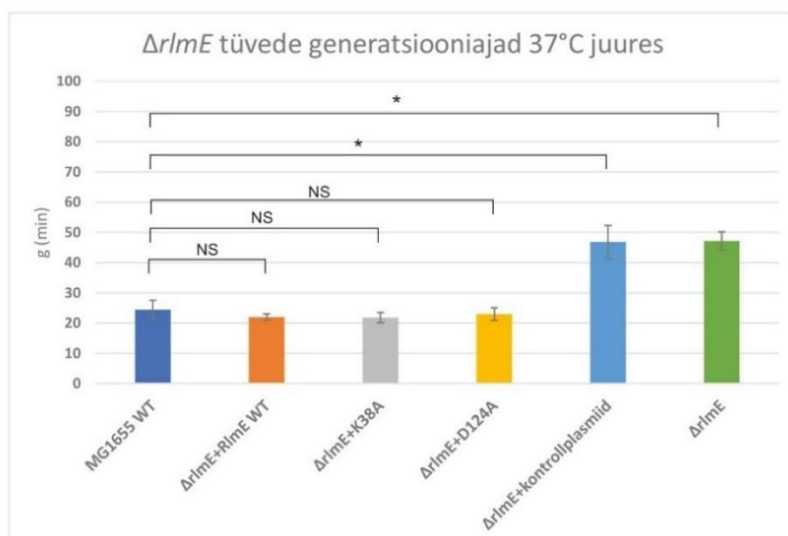


**Joonis 8. *E. coli*  $\Delta 10$  tüvede kasvukiiruse võrdlus 37°C ja 30°C juures.** Katse viidi läbi sarnaselt  *$\Delta rlmE$*  tüvedega (Joonis 7). Tüvesid MG1655 WT,  $\Delta 10$ +RlmE WT ja  $\Delta 10$ +K38A kasvatati ~16h.  $\Delta 10$ +D124A,  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid ja  $\Delta 10$  tüvesid kasvatati ~23h (A) Tüvede kasvukiirus mõõdetud temperatuuril 37°C, (B) tüvede kasvukiirus mõõdetud temperatuuril 30°C, vertikaalteljel kultuuri optiline tihedus (600 nm) ja horisontaalteljel aeg (minutites). Tulemused saadud vähemalt kolme bioloogilise korduse põhjal. Kasvukõverad saadud vähemalt kolme bioloogilise korduse ja kahe tehnilise replikaadi tulemuse põhjal.

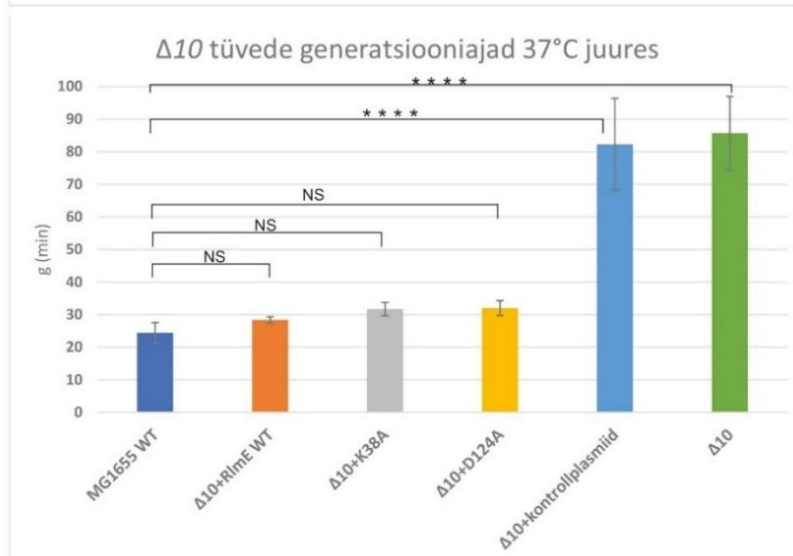
*Joonisel 9* on näidatud *E. coli* tüvede generatsiooniajad 37°C juures. Metsiktüve MG1655 generatsiooniaeg on samaväärne ( $\sim 24 \pm 3,1$  minutit) tüvedega  $\Delta rlmE$ +RlmE WT,  $\Delta rlmE$ +K38A ja  $\Delta rlmE$ +D124A ning nende generatsiooniaegade vahel puudub statistiline erinevus ( $p > 0,05$ ) (*Joonis 9A*). Sellest järeldub, et metüleerimisvõimeta mutandid K38A ja D124A kompenseerivad RlmE WT valgu puudumisest põhjustatud kasvudefekti 37°C-l.  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmiid tüvede generatsiooniaeg on ligikaudu 24 minutit pikem kui MG1655 WT-l (*Joonis 9C*). Lisaks on nimetatud tüvede generatsiooniajad statistiliselt erinevad metsiktüvest. Saadud tulemus ühtib Caldas *et al.* (2002) artikli tulemustega, kus näidati, et *rlmE* deletsioonitüve pooldumisaeg on metsiktüvest kaks korda pikem 37°C juures. Seega  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmiid geenratsioonijad näitavad, et metüültransferaas RlmE on vajalik rakkude normaalseks kasvuks.

Optimaalsetes kasvutingimustes on tüvedel  $\Delta 10$ +RlmE WT,  $\Delta 10$ +K38A ja  $\Delta 10$ +D124A võrreldes  $\Delta 10$  tüvega generatsiooniaeg umbes 50 minutit lühem (*Joonis 9B*). Lisaks ei erine nimetatud tüvede generatsiooniaeg statistiliselt metsiktüvest. Järelikult modifikatsioonientsüümi RlmE või selle katalüütiliselt inaktiivseid mutante ekspresseeriva plasmidi tagasiviimine tüvesse kompenseerib kasvudefekti.  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvede pooldumisaeg on  $\sim 3,5x$  ehk ligikaudu 60 minutit pikemad kui MG1655 WT-l ning on referentstüvest statistiliselt erinevad.

A



B

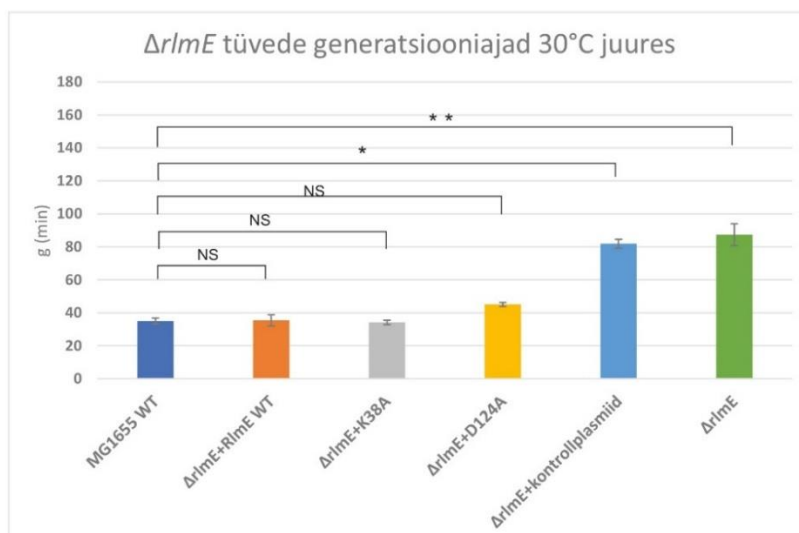


C

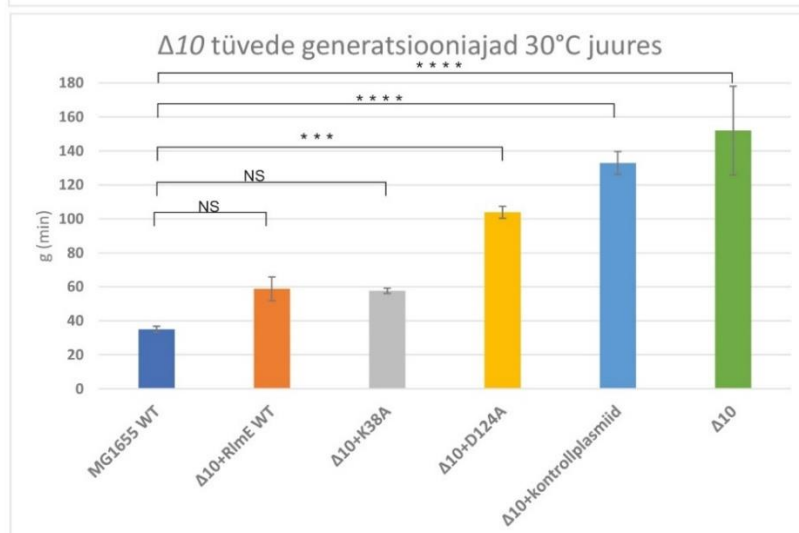
Tüvi	Generatsiooniaeg (min) ± st. hälve
MG1655 WT	24.4 ± 3.1
$\Delta rlmE+RlmE$ WT	22.1 ± 1.6
$\Delta rlmE+K38A$	21.8 ± 3.2
$\Delta rlmE+D124A$	22.8 ± 2.1
$\Delta rlmE+kontrollplasmiid$	46.8 ± 5.5
$\Delta rlmE$	47.0 ± 3.6
$\Delta 10+RlmE$ WT	28.3 ± 1.2
$\Delta 10+K38A$	31.7 ± 1.9
$\Delta 10+D124A$	32.0 ± 2.5
$\Delta 10+kontrollplasmiid$	82.3 ± 13.8
$\Delta 10$	85.7 ± 11.5

**Joonis 9. Tüvede keskmised generatsiooniajad 37°C juures.** (A) Graafik generatsiooniaegadega. Horisontaalteljel tüve nimed ja vertikaalteljel generatsiooniaeg (minutites). (B) Tabel keskmiste generatsiooniaegade ± standardhälbe, mis on saadud vähemalt kolme bioloogilise korduse mõõtmistulemusena. \* näitab statistilist erinevust ( $P < 0,05$ ), NS näitab, et statistiline erinevus puudub (kontrollitud t-testiga, 95% usalduspiirid). (C) Generatsiooniajad leiti pool-logaritmilises teljestikus kasvukõverate tõusu pöördväärtuse põhjal, tabelis on esindatud vähemalt kolme bioloogilise korduse ja kahe tehnilise replikaadi mõõtmiste keskmised.

A



B



C

Tüvi	Generatsiooniaeg (min) ± st. hälve
MG1655 WT	34.5 ± 2.4
$\Delta rlmE+RlmE$ WT	35.4 ± 3.4
$\Delta rlmE+K38A$	34.2 ± 1.4
$\Delta rlmE+D124A$	45.1 ± 1.5
$\Delta rlmE+kontrollplasmiid$	81.9 ± 3.1
$\Delta rlmE$	87.7 ± 6.9
$\Delta 10+RlmE$ WT	58.9 ± 6.9
$\Delta 10+K38A$	57.7 ± 2.1
$\Delta 10+D124A$	103.9 ± 5.3
$\Delta 10+kontrollplasmiid$	132.9 ± 7.3
$\Delta 10$	152 ± 25.6

**Joonis 10. Tüvede keskmine generatsiooniaeg 30°C juures.** (A) Graafik generatsiooniaegadega. Horisontaalteljel tüvenimed ja vertikaalteljel generatsiooniaeg (minutites). \* näitab statistilist erinevust ( $P < 0,05$ ), NS näitab, et statistiline erinevus puudub (kontrollitud t-testiga, 95% usalduspiirid) (B) Tabel keskmiste generatsiooniaegade ± standardhälbe, mis on saadud vähemalt kolme bioloogilise korduse mõõtmistulemusena. (C) Generatsiooniajad leiti pool-logaritmilises teljestikus kasvukõverate tõusu pöördväärtuse põhjal, tabelis on esindatud vähemalt kolme bioloogilise korduse ja kahe tehnilise replikaadi mõõtmiste keskmised.

Temperatuuril 30°C arvatud generatsiooniajad on esitatud *Joonisel 10*. Nagu ka 37°C puhul, on  $\Delta rlmE+RlmE$  WT ja  $\Delta rlmE+K38A$  tüvede generatsiooniaeg võrdväärne MG1655 WT-ga ( $g \approx 35 \pm 1,8$  minutit) (*Joonis 10A*). Kuigi  $\Delta rlmE+D124A$  generatsiooniaeg on 10 minutit pikem kui referentstüvel (*Joonis 10C*), pole kahe tüve pooldumisaja vahel statistilist erinevust. Sellest saab järeldada, et mutandid K38A ja D124A kompenseerivad  $\Delta rlmE$  tüves kasvudefekti ka suboptimaalsel temperatuuril.  $\Delta 10+D124A$  tüve pooldumisaeg on ligikaudu 40 minutit pikem kui  $\Delta 10+RlmE$  WT ja  $\Delta 10+K38A$  tüvedel, kuid umbes 50 minutit lühem kui  $\Delta 10$  tüvel (*Joonis 10B*).  $\Delta 10+D124A$  tüve generatsiooniaeg erineb statistiliselt metsiktüvest. Seega kompenseerib D124A mutant 30°C juures  $\Delta 10$  tüves osaliselt rakkude kasvu.  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmiid tüvede generatsiooniaeg on üle kahe korra ehk 50 minutit pikem kui vanemtüvel.  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvedel on üle nelja korra ehk üle 100 minuti pikem pooldumisaeg kui MG1655 WT-l.

Käesoleva töö tulemuste põhjal järeldub, et optimaaltemperatuuril suudavad nii K38A kui D124A mutandid kompenseerida  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvu. Generatsiooniaegade statistilise analüüsi põhjal võib väita, et mutandid käituvad võrdväärselt RlmE WT valguga. Suboptimaalsel temperatuuril K38A mutant toetab kasvu sama edukalt kui *wild type* RlmE nii  $\Delta rlmE$  kui  $\Delta 10$  tüvedes. Huvitaval kombel  $\Delta rlmE+D124A$  tüve generatsiooniaeg ei erine statistiliselt  $\Delta rlmE+RlmE$  WT tüvest,  $\Delta 10+D124A$  tüve generatsiooniaeg aga küll. Sellest tulenevalt võib öelda, et metüleerimisvõimeta K38A suudab kompenseerida  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvudefekti samaväärselt RlmE WT-ga, D124A kompenseerib kasvu aga osaliselt. Võrreldes antud töö tulemusi varasemalt avaldatud Hager *et al.* (2002) andmetega, ilmneb huvitav vastuolu, mis näitab, et ka metüleerimisvõimelt inaktiivne valk on võimeline päästma kasvudefekti. Käesoleva töö tulemused näitavad, et lisaks nukleotiidi U2552 metüleerimisele võib RlmE-l olla ka lisafunktsioon, mis ei sõltu valgu võimest modifitseerida rRNA-d.

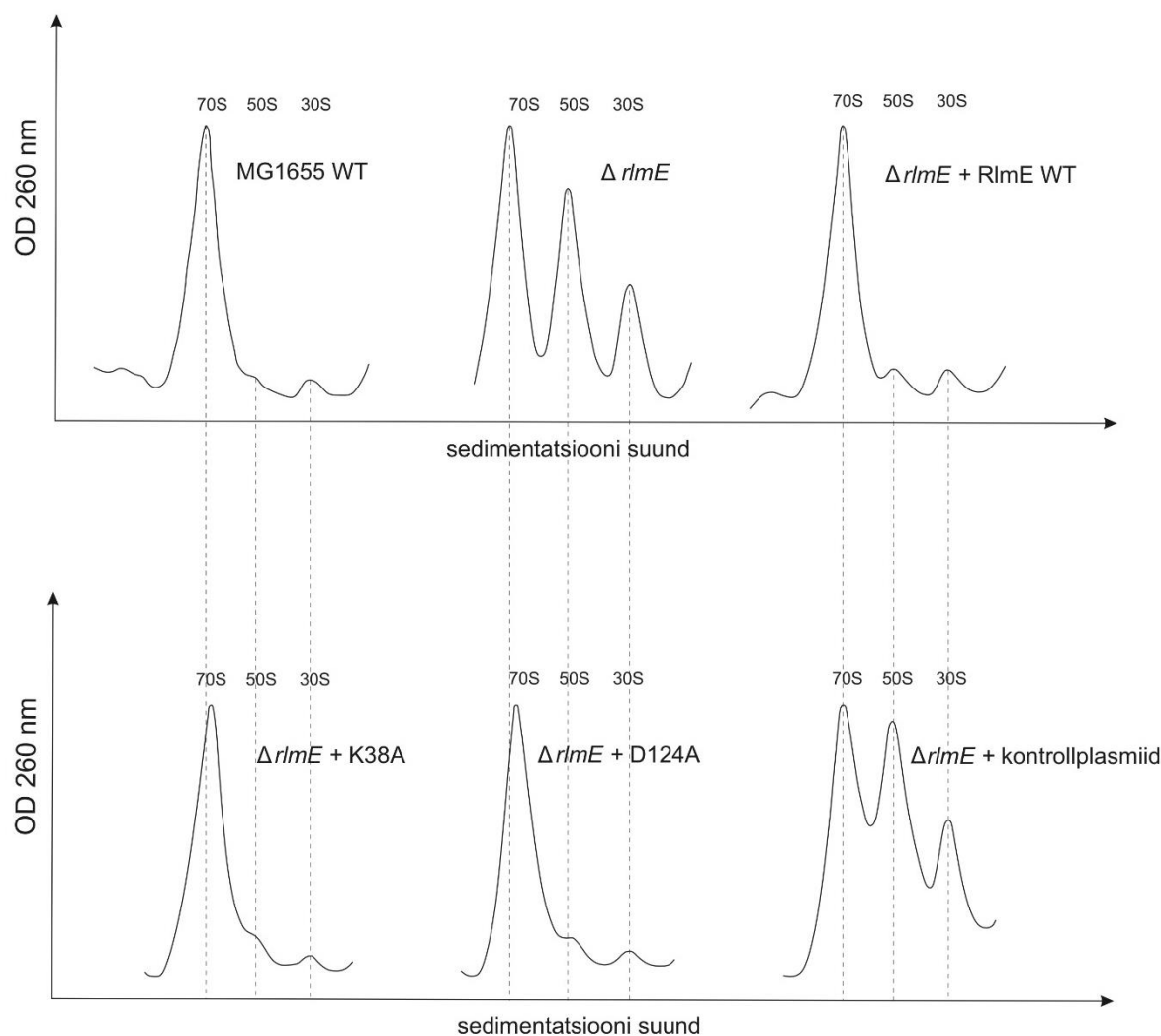
#### **2.3.4. Ribosoomide profiili analüüs**

Varasemate katsete põhjal on välja selgitatud, et RlmE deletsioonitüves avaldub tugev ribosoomi assambleerumise defekt (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Käesoleva töö hüpoteesi põhjal on RlmE-l sekundaarne roll ribosoomide biogeneesis. Sellest tulenevalt võiks ribosoomide profiili analüüs näidata, kas katalüütiliselt inaktiivsed valgud mõjutavad RlmE deletsioonitüvede ribosoomide biogeneesi või mitte.

Selleks, et selgitada RlmE võimalikku sekundaarset rolli ribosoomide biogeneesis, viidi läbi ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosigradinedis, mida iseloomustavad *Joonisel 11* esitatud  $\Delta rlmE$  tüvede ja *Joonisel 12* esitatud  $\Delta 10$  tüvede gradiendiprofiilid. Ribosoomid eraldati

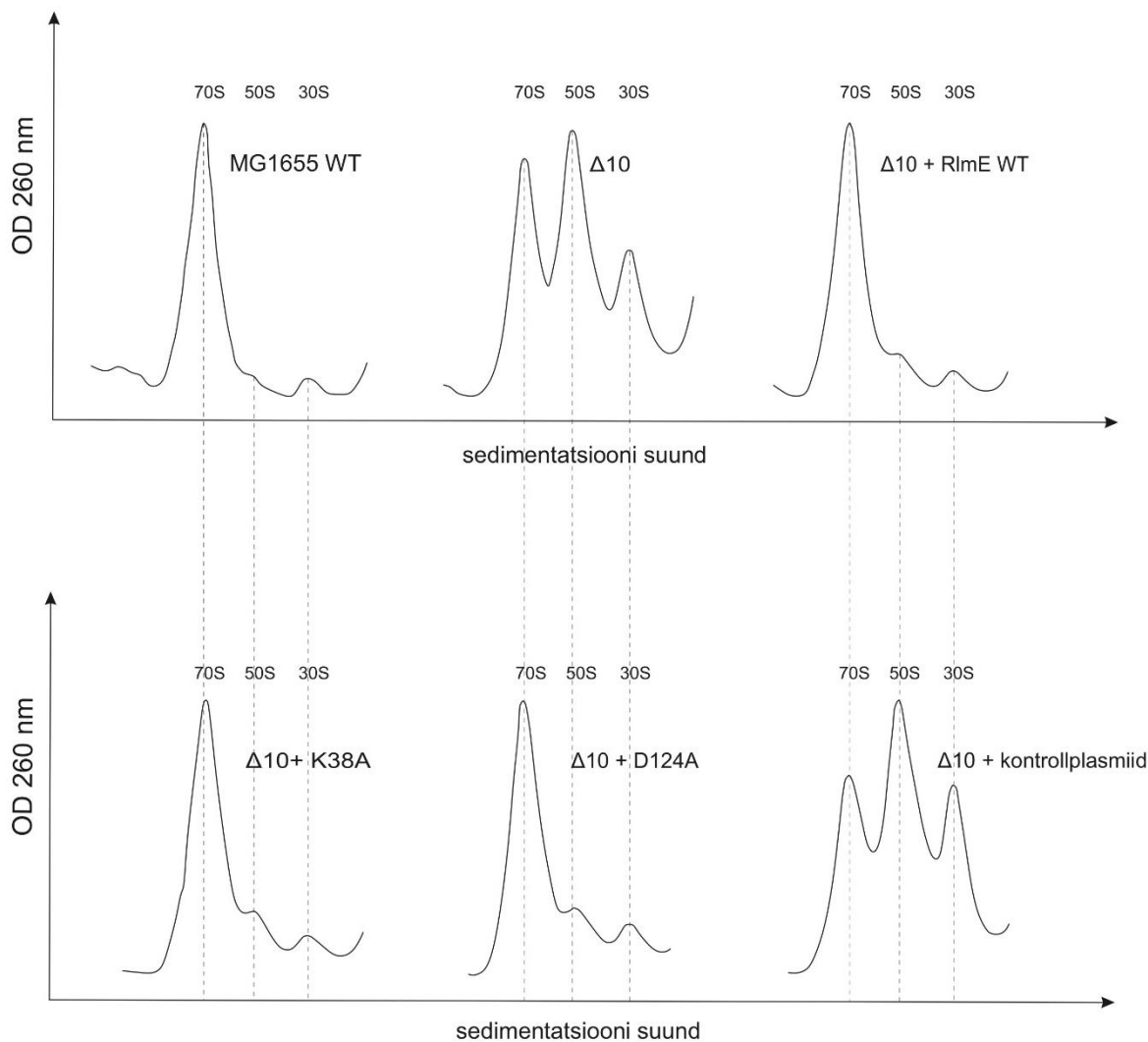
logaritmilises faasis olevatest rakkudest, sest siis on ribosoomide süntees aktiivseim ning saab hinnata võimalikke muutusi ribosoomide biogeneesis. Iga katalüütiliselt inaktiivset ensüümi ekspresseeriva plasmidi tüvega teostati kolm üksteisest sõltumatut korduskatset. Selleks, et hinnata ribosoomide biogeneesis esinevaid defekte täpsemalt, tuli arvutada 50S/70S suhe. See näitab vabade 50S subühikute hulka võrrelduna assembleerunud 70S ribosoomiga. Kui vabade 50S subühikute hulk on tõusnud võrreldes 70S ribosoomide hulgaga, võib viidata see biogeneesi defektile. Selle hindamiseks kasutati ribosoomide profiili, et arvutada vastavatele fraktsioonidele piigialune pindala. ImageJ tarkvaraga (Schneider *et al.*, 2012) arvutati uuritava ala pikslite arv ehk piigialune pindala. Ribosoomide profiili põhjal arvatud 50S/70S suhe on näidatud *Joonisel 13*.

$\Delta rlmE+RlmE$  WT,  $\Delta rlmE+K38A$  ja  $\Delta rlmE+D124A$  tüvede ribosoomide profiil on sarnane MG1655 WT-le (*Joonis 11*). Saadud tulemust kinnitab ka 50S/70S suhte analüüs, kus nimetatud tüvedel on 50S vabade subühikute arv palju väiksem  $\Delta rlmE$ -st, samuti puudub statistiline erinevus metsiktüve 50S/70S suhtega (*Joonis 13*). Sellest võib järeldada, et nii RlmE WT valk kui katalüütiliselt inaktiivsed mutandid taastavad metsiktüvele omase 70S ribosoomi moodustumise ja vähendavad vabade subühikute hulka  $\Delta rlmE$  tüves. Töö tulemused on intrigeerivad, kuna räägivad vastu Hager *et al.* (2002) tulemustele, kus RlmE K38A mutanti sisaldava tüve ribosoomide profiil on sarnane  $\Delta rlmE$  tüvele, mõlemas tüves näidati, et akumulatsioonid 45S partiklid. D124A mutandil on artikli andmetel vähem vabasid 50S subühikuid kui deletsioontüvel, kuid siiski märgatavalt rohkem kui metsiktüves. Hager *et al.* (2002) andmetel puudus K38A ja D124A mutantidel modifikatsioonivõime. Käesolevas töös assambleerumise defekti ei täheldatud, seega võib oletada, et RlmE-l on peale metüleerimise lisaks veel sekundaarne funktsioon. Saadud tulemus selgitab ka paranenud kasvukiirust.  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmid tüvedes on MG1655 WT-ga võrreldes suurenenud vabade 50S ja 30S subühikute osakaal (*Joonis 11*).  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta rlmE$ +kontrollplasmid tüvede 50S/70S suhe on vähemalt 20x suurem kui metsiktüvel (*Joonis 13*). Nimetatud tüvede 50S/70S suheted erinevad MG1655 WT-st statistiliselt. Käesoleva töö tulemused on kooskõlas Caldas *et al.* (2000) artiklis avaldatud andmetega, kus on näidatud et  $rlmE$  deletsioontüves on tõusnud 50S ja 30S vabade subühikute hulk ning langenud 70S ribosoomide suhteline osakaal.



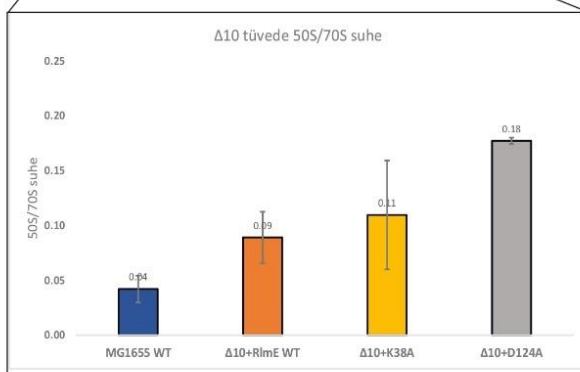
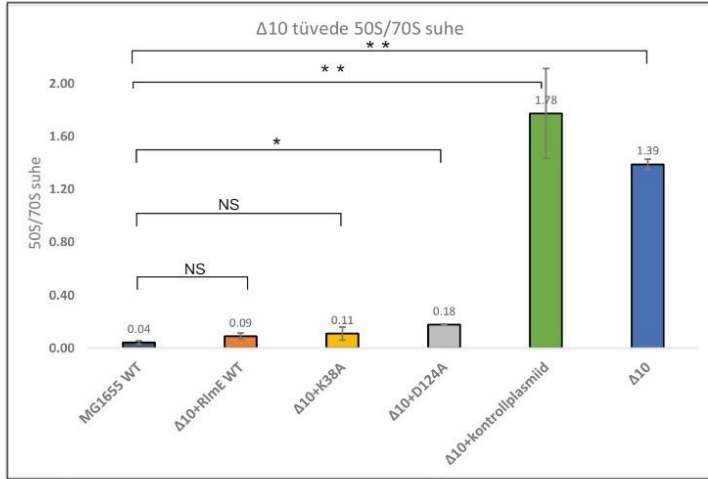
**Joonis 11.  $\Delta rlmE$  ribosoomide profiilid 15%-30% sahharoosgradiendis, optiline tihedus (OD) mõõdetud 260nm-l.** x-teljel on noolega näidatud sedimentatsiooni suund. y-teljel on optiline tihedus 260 nm juures. Rakud kasvatati 2xYT söötmes 37°C juures optilise tiheduseni ( $A_{600nm}$ ) 1-1,5. Rakud lüüsi, viidi 1xOV-10 puhvriga ruumalani 500 $\mu$ l, kanti 30U lüsaati 15-30% sahharoosgradiendile ja ultratsentrifuugiti üleöö (16,5h, 21 500 rpm, temperatuuril 4°C,  $\omega^2t = 3 \times 10^{11}$  rad $\cdot$ s $^{-1}$ ). Ultratsentrifuugimiseks kasutati *Beckman Coulter* rootoreid SW28 ja SW32. Katset korrati vähemalt kolm korda, esitatud on ühe korduse profiilid.

$\Delta 10$ +RlmE WT,  $\Delta 10$ +K38A ja  $\Delta 10$ +D124A tüvede ribosoomide profiililt on näha, et nii RlmE *wild type* valk kui metüleerimisvõimeta RlmE mutandid taastavad metsiktüve fenotüübi (Joonis 12).  $\Delta 10$ +RlmE WT,  $\Delta 10$ +K38A tüvede ja metsiktüve 50S/70S suhte vahel puudub statistiline erinevus (Joonis 13).  $\Delta 10$ +D124A tüve 50S/70S suhe on statistiliselt erinev MG1655 WT-st. Sellest võib järeldada, et katalüütiliselt inaktiivne K38A mutant suudab kompenseerida RlmE WT valgu puudumist, D124A mutant kompenseerib aga osaliselt. Joonisel 12 on näha, et  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvedes on vabade 50S ja 30S subühikute osakaal suurenenud ning 70S ribosoomide osakaal vähenenud võrreldes metsiktüvega. Seda kinnitab 50S/70S suhete analüüs, kus  $\Delta 10$  ja  $\Delta 10$ +kontrollplasmiid tüvede 50S/70S suhted on statistiliselt erinevad MG1655 WT suhtest (Joonis 13).

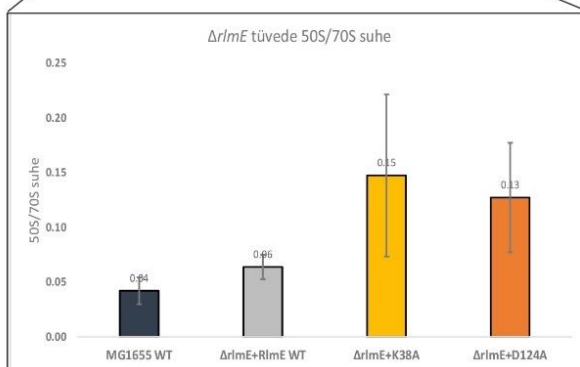
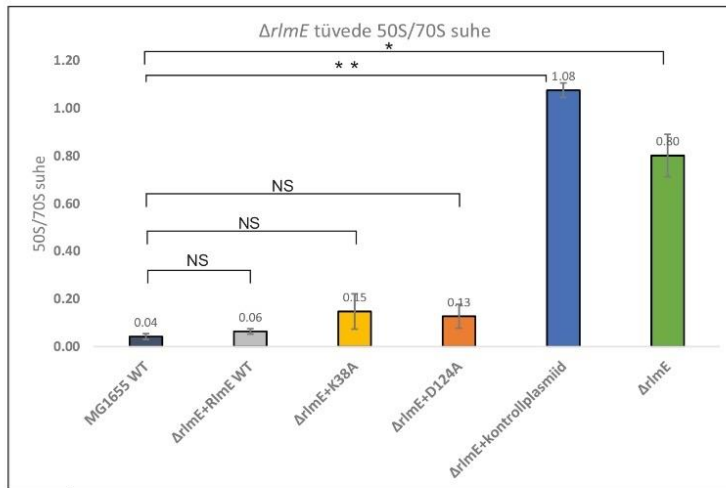


**Joonis 12.  $\Delta 10$  tüvede ribosoomide profiilid 15%-30% sahharoosgradiendis, optiline tihedus (OD) mõõdetud 260nm-l.** x-teljel on noolega näidatud sedimentatsiooni suund. y-teljel on optiline tihedus 260 nm juures. Rakud kasvatati 2xYT söötmes 37°C juures optilise tiheduseni ( $A_{600\text{nm}}$ ) 1-1,5. Rakud lüüsi, viidi 1xOV-10 puhvriga ruumalani 500 $\mu$ l, kanti 30U lüsaati 15-30% sahharoosgradiendile ja ultratsentrifuugiti üleöö (16,5h, 21 500 rpm, temperatuuril 4°C,  $\omega^2t = 3 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ultratsentrifuugimiseks kasutati *Beckman Coulter* roitoreid SW28 ja SW32. Katset korrati vähemalt kolm korda, esitatud on ühe korduse profiilid.

A



B



**Joonis 13. Ribosoomide kvantifitseeritud subühikute piigialuste pindalade (50S/70S) suhe.** y-teljel on kvantifitseeritud pindalade suhe. (A)  $\Delta 10$  tüvede ribosoomide 50S/70S subühikute suhe ja (B)  $\Delta rlmE$  tüvede ribosoomide 50S/70S subühikute suhe. Suhe on saadud ribosoomi profiili piikide aluse pindala kvantifitseerimise põhjal Image J tarkvaraga. Esitatud on kolme bioloogilise katse tulemuste keskmine  $\pm$  standardhälve. \* näitab statistilist erinevust ( $P < 0,05$ ), NS näitab, et statistiline erinevus puudub (kontrollitud t-testiga, 95% usalduspiirid).

Bakalaureusetöö tulemuste põhjal saab järeldada, et RlmE mutandid K38A ja D124A kompenseerivad antud töös kasutatud tüvede kasvu- ja ribosoomide biogeneesi fenotüüpi metsiktüvega võrrelduna. Tulemused on intrigeerivad, kuna on otseses vastuolus Hager *et al.* (2002) töös avaldatuga. Kuna kirjeldatud RlmE mutante on eelnevalt uuritud vaid korra, pole selge, millest on tingitud kardinaalselt erinevad katsetulemused. Eelmainitud artikli põhjal ei peaks RlmE mutandid K38A ja D124A metüleerima rRNA-d. Käesoleva töö tulemusi analüüsidis tekkis kahtlus, kas nimetatud mutandid on siiski katalüütiliselt inaktiivsed. Selleks otsustati kontrollida modifikatsiooni olemasolu rRNA-s kõrgsurvevedelikkromatograafiaga (HPLC). HPLC analüüsi viis läbi PhD Margus Leppik. Analüüsist selgus, et K38A mutant siiski metüleeris rRNA-d, kuid D124A mitte (*Lisa 1*). Kuna metülatsioon oli rRNA-s olemas, ei saa K38A mutandi põhjal teha järeldusi RlmE sekundaarse funktsiooni kohta. Seetõttu pole ka üllatav, et K38A käitus sarnaselt RlmE *wild type* valguga ja kompenseeris efektiivselt  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defekte. Samas toetavad käesoleva töö hüpoteesi RlmE sekundaarse funktsiooni kohta D124A mutandi tulemused. Bakalaureusetöö raames saab väita, et RlmE-l on sekundaarne funktsioon, mis on sõltumatu valgu metüleerimisvõimest. Tõenäoliselt on funktsioonil seos ribosoomide biogeneesiga. Väidet toetab gradiendiprofiilide analüüs, kus D124A mutant suutis edukalt taastada metsiktüvele omase ribosoomide profiili.

## KOKKUVÕTE

*Escherichia coli* 23S rRNA modifikatsiooniensüümi RlmE puudumisest tingitud kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defektid rakus on teada. Siiski pole üheselt selge, kas mainitud probleeme tekitab Um2552 modifikatsiooni puudumine või on selle sünteesi eest vastutaval ensüümil sekundaarne funktsioon. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli välja selgitada, kas 23S rRNA modifikatsiooniensüümil RlmE on metüleerimisest sõltumatu roll ribosoomis. Selle välja selgitamiseks konstrueeriti katalüütiliselt inaktiivset ensüümi ekspresseeriva plasmiidiga  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüved ning analüüsiti tüvede kasvufenotüüpi ja ribosoomide biogeneesi. Mõlema tüve genomist oli *rlmE* geen deleteeritud.

Bakalaureusetöö tulemused saab kokku võtta järgmiselt:

1. Optimaaltemperatuuri juures suutsid RlmE mutandid K38A ja D124A kompenseerida  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvudefektid ja taastada MG1655 WT-le omase kasvufenotüübi.
2. Sub-optimaalsel temperatuuril suutis K38A mutant kompenseerida nii  $\Delta rlmE$  kui  $\Delta 10$  tüvede kasvudefektid sarnaselt RlmE *wild type* valgule. Ka D124A mutant suutis kompenseerida  $\Delta rlmE$  tüve kasvudefektid, aga  $\Delta 10$  tüvel vaid osaliselt.
3. Ribosoomide profiili analüüsi põhjal suutsid katalüütiliselt inaktiivsed valgud taastada MG1655 WT-le omase ribosoomide profiili nii  $\Delta rlmE$  kui  $\Delta 10$  tüves.
4. Ribosoomi subühikute suhete (50S/70S) analüüs näitas, et K38A mutanti ekspresseeriva plasmiidiga  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvedes vähenes vabade 50S subühikute hulk võrreldes 70S ribosoomide fraktsiooniga.  $\Delta rlmE$ +D124A tüves vähenes samuti vabade 50S subühikute hulk ning nimetatud tüvede 50S/70S suhe ei erinenud statistiliselt metsiktüve 50S/70S suhtest,  $\Delta 10$ +D124A tüve 50S/70S suhe aga erines.

Um2552 modifikatsiooni olemasolu rRNA-s kontrolliti kõrgsurvevedelikkromatograafiaga (HPLC), mille põhjal selgus, et K38A mutant siiski metüleerib rRNA-d, aga D124A mitte. See on otseses vastuolus Hager *et al* (2002) andmetega, kus mõlemat mutanti kirjeldati kui katalüütiliselt inaktiivset.

Käesolevas töös püstitatud hüpoteesi toetavad otseselt RlmE D124A mutandi tulemused, millest selgus, et D124A suudab kompenseerida  $\Delta rlmE$  ja  $\Delta 10$  tüvede kasvu- ja ribosoomide biogeneesi defekte. Käesoleva töö tulemuste raames võib väita, et püstitatud hüpotees on tõene ning metüültransferaas RlmE-l on metüleerimisvõimest sõltumatu funktsioon.

# **The role of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA modification enzyme RlmE in ribosome biogenesis**

Tiina Kaljuste

## **SUMMARY**

Ribosomes are a fundamental part of the cell as they are responsible for protein synthesis. *Escherichia coli*'s ribosome is made of ribosomal proteins and three ribosomal RNAs. The 50S subunit is made of 23S and 5S rRNAs and ribosomal proteins. The 30S subunit is made of 16S rRNA and ribosomal proteins. In all domains of life, the rRNA is modified. Most of the modifications are known but the role of them is still uncertain. The 23S rRNA domain V contains 13 modifications. None of those modifications are necessary for the survival of the cell. However, it is known that the absence of the modification enzyme RlmE causes slower cell growth and the accumulation of the free subunits (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000).

Focusing on the methyltransferase RlmE, this thesis aimed to determine if RlmE has another role besides the methylation of rRNA. For this, the experimenter constructed two *Escherichia coli* strains consisting of a plasmid that expressed a mutant of RlmE. In both of those strains, the gene of RlmE was deleted from the genome. There were two mutants – K38A and D124A – and these mutants were thought to be catalytically inactive (Hager *et al.*, 2002).

The results showed that both of these mutants were able to restore the growth similar to the wild type strain at 37°C in  $\Delta rlmE$  and  $\Delta 10$  strains. At 30°C, the K38A mutant was able to compensate for the growth defect of both  $\Delta rlmE$  and  $\Delta 10$  strains, similar to the RlmE wild type protein. The D124A mutant was able to compensate only for the growth defect of the  $\Delta rlmE$  strain. In  $\Delta 10$  strain, the compensation of growth was partial. The ribosome profile analysis revealed that both catalytically inactive proteins were able to restore the wild type strain ribosome profile. Based on analysis of the ratio of ribosome subunits (50S/70S), the K38A or D124A mutants could almost restore the 70S ribosome formation characteristic of MG1655 WT. Finally, the presence of modification in the rRNA was determined by high-performance liquid chromatography (performed by PhD Margus Leppik) and the results showed that the K38A mutant still methylated the RNA but D124A didn't. The hypothesis proposed in this work is directly supported by the results of the RlmE D124A mutant, which revealed that D124A can compensate for the growth and ribosome biogenesis defects of  $\Delta rlmE$  and  $\Delta 10$  strains. Within the framework of the results of this work, it can be stated that the proposed hypothesis is true and that the methyltransferase RlmE has a function independent of the methylation of rRNA.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada oma juhendajat Aivar Liivi, kes nõu ja kannatlikkusega juhendas mind minu bakalareusetöö vältel. Samuti soovin tänada Margus Leppikut, Rya Erot ja Ermo Leuskat, kes alati abivalmilt aitasid mind iga tekkinud küsimusega. Lisaks tänan kõiki molekulaarbioloogia õppetooli liikmeid, kes aitasid mind minu bakalareusetöö valmimisel.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(34), E4707–E4716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506749112>
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*, *289*(5481), 905–920. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *62*(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Blanchard, S. C., & Puglisi, J. D. (2001). Solution structure of the A loop of 23S ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(7), 3720–3725. <https://doi.org/10.1073/pnas.051608498>
- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Bardwell, J. C., & Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Molecular cell*, *6*(2), 349–360. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00035-6)
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., & Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16414–16419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001854200>
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., & Richarme, G. (2000). Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um2552 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochemical and biophysical research communications*, *271*(3), 714–718. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2702>
- Clemons Jr, W. M., May, J. L., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., & Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, *400*(6747), 833–840. <https://doi.org/10.1038/23631>
- Conrad, J., Sun, D., Englund, N., & Ofengand, J. (1998). The rluC Gene of *Escherichia coli* Codes for a Pseudouridine Synthase That Is Solely Responsible for Synthesis of Pseudouridine at Positions 955, 2504, and 2580 in 23 S Ribosomal RNA\*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(29), 18562–18566. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18562>
- Correll, C. C., Munishkin, A., Chan, Y.-L., Ren, Z., Wool, I. G., & Steitz, T. A. (1998). Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13436–13441.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13436>
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). RRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- DEL CAMPO, M., KAYA, Y., & OFENGAND, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *Rna*, 7(11), 1603–1615.
- Ero, R., Peil, L., Liiv, A., & Remme, J. (2008). Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*. *Rna*, 14(10), 2223–2233.  
<https://doi.org/10.1261/rna.1186608>
- Frank, J. (2000). The ribosome – a macromolecular machine par excellence. *Chemistry & Biology*, 7(6), R133–R141. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00127-7)
- Frank, J., Zhu, J., Radermacher, M., Verschoor, A., Lata, R. K., Penczek, P., Grassucci, R., Agrawal, R. K., Srivastava, S., & Li, Y. (1995). A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry and cell biology*, 73(11–12), 757–765. <https://doi.org/10.1139/o95-084>
- Golovina, A. Y., Dzama, M. M., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2012). The last rRNA methyltransferase of *E. coli* revealed: The yhiR gene encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A2030 of 23S ribosomal RNA. *Rna*, 18(9), 1725–1734.  
<https://doi.org/10.1261/rna.034207.112>
- Green, R., & Noller, H. F. (1996). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *Rna*, 2(10), 1011–1021.
- Gulen, B., Petrov, A. S., Okafor, C. D., Vander Wood, D., O'Neill, E. B., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2016). Ribosomal small subunit domains radiate from a central core. *Scientific reports*, 6(1), 20885. <https://doi.org/10.1038/srep20885>
- Gustafsson, C., & Persson, B. C. (1998). Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m1G745-deficient mutant. *Journal of bacteriology*, 180(2), 359–365.
- Hager, J., Staker, B. L., Bügl, H., & Jakob, U. (2002). Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41978–41986.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205423200>

- Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2011). Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Research*, *40*(9), 4071–4085. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1287>
- Kimura, S., Sakai, Y., Ishiguro, K., & Suzuki, T. (2017). Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic Acids Research*, *45*(22), 12974–12986. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx969>
- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO journal*, *20*(14), 3617–3622. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>
- Krzyzosiak, W., Denman, R., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Gehrke, C., Agris, P., & Ofengand, J. (1987). In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome. *Biochemistry*, *26*(8), 2353–2364.
- Lesnyak, D. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2006). Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. The *ycbY* Gene Encodes a Methyltransferase Specific for G2445 of the 23 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, *364*(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.009>
- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, Ü., & Remme, J. (2005). Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC molecular biology*, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-18>
- Lövgren, J. M., & Wikström, P. M. (2001). The *rlmB* Gene Is Essential for Formation of Gm2251 in 23S rRNA but Not for Ribosome Maturation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *183*(23), 6957–6960. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6957-6960.2001>
- Maden, B. E. H. (1990). *The Numerous Modified Nucleotides in Eukaryotic Ribosomal RNA* (W. E. Cohn & K. Moldave, Toim; Kd 39, lk 241–303). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60629-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60629-7)
- Madsen, C. T., Mengel-Jørgensen, J., Kirpekar, F., & Douthwaite, S. (2003). Identifying the methyltransferases for m5U747 and m5U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, *31*(16), 4738–4746. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg657>
- MAIVÄLI, Ü., & Remme, J. (2004). Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *Rna*, *10*(4), 600–604. <https://doi.org/10.1261/rna.5220504>
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, *57*(4), 585–597. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90128-1](https://doi.org/doi.org/10.1016/0092-8674(89)90128-1)

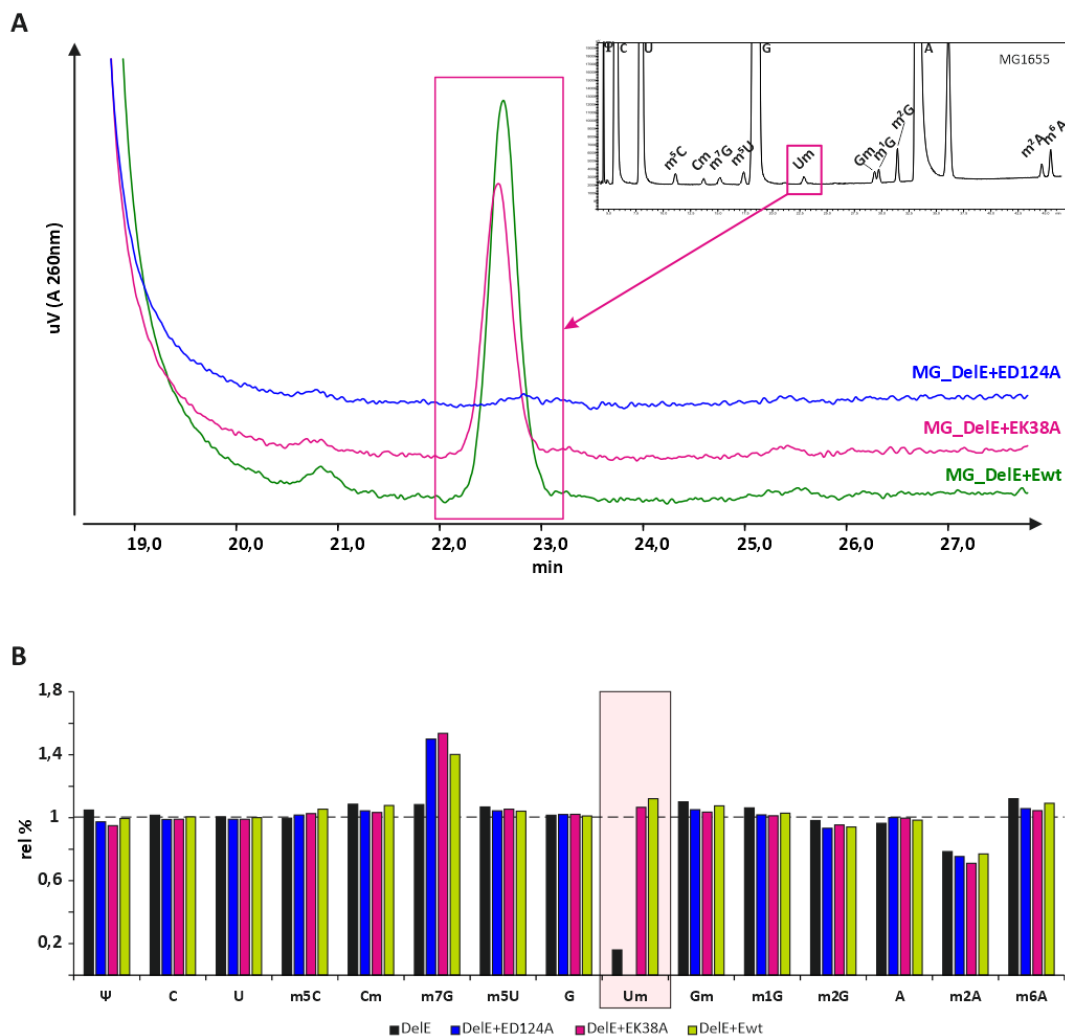
- Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 813–850. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.110601.135450>
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*, 289(5481), 920–930. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>
- Ofengand, J., Bakin, A., Wrzesinski, J., Nurse, K., & Lane, B. G. (1995). The pseudouridine residues of ribosomal RNA. *Biochemistry and cell biology*, 73(11–12), 915–924. <https://doi.org/10.1139/o95-099>
- Ofengand, J., & Campo, M. D. (2004). Modified Nucleosides of *Escherichia coli* Ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.4.6.1>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., Stepanov, V. G., Gaucher, E. A., Grover, M. A., Harvey, S. C., Hud, N. V., Wartell, R. M., Fox, G. E., & Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 41(15), 7522–7535. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt513>
- Purta, E., Kaminska, K. H., Kasprzak, J. M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2008). YbeA is the m<sup>3</sup>Ψ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *Rna*, 14(10), 2234–2244. <https://doi.org/10.1261/rna.1198108>
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2008). YccW is the m<sup>5</sup>C Methyltransferase Specific for 23S rRNA Nucleotide 1962. *Journal of Molecular Biology*, 383(3), 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.061>
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2009). YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Molecular microbiology*, 72(5), 1147–1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06709.x>
- Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B. G., & 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*, 4(11), 1407–1417. <https://doi.org/10.1017/S1355838298981146>
- Raychaudhuri, S., Niu, L., Conrad, J., Lane, B. G., & Ofengand, J. (1999). Functional Effect of Deletion and Mutation of the *Escherichia coli* Ribosomal RNA and tRNA Pseudouridine Synthase RluA\*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 18880–18886. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.18880>

- Rheinberger, H.-J., Sternbach, H., & Nierhaus, K. H. (1981). Three tRNA binding sites on Escherichia coli ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5310–5314. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5310>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., & others. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., & Yonath, A. (2000). Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell*, 102(5), 615–623. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00084-2)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., & Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 313(5795), 1935–1942. <https://doi.org/10.1126/science.1131127>
- Sergiev, P. V., Lesnyak, D. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2006). Identification of Escherichia coli m2G methyltransferases: II. The ygjO Gene Encodes a Methyltransferase Specific for G1835 of the 23 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 364(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.008>
- Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2008). The ybiN Gene of Escherichia coli Encodes Adenine-N6 Methyltransferase Specific for Modification of A1618 of 23 S Ribosomal RNA, a Methylated Residue Located Close to the Ribosomal Exit Tunnel. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.051>
- Siibak, T., & Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *Rna*, 16(10), 2023–2032. <https://doi.org/10.1261/rna.2160010>
- Tan, J., Jakob, U., & Bardwell, J. C. (2002). Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *Journal of bacteriology*, 184(10), 2692–2698.
- Toh, S.-M., & Mankin, A. S. (2008). An Indigenous Posttranscriptional Modification in the Ribosomal Peptidyl Transferase Center Confers Resistance to an Array of Protein Synthesis Inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 380(4), 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.027>

- Toh, S.-M., Xiong, L., Bae, T., & Mankin, A. S. (2008). The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *Rna*, *14*(1), 98–106. <https://doi.org/10.1261/rna.814408>
- Wang, W., Li, W., Ge, X., Yan, K., Mandava, C. S., Sanyal, S., & Gao, N. (2020). Loss of a single methylation in 23S rRNA delays 50S assembly at multiple late stages and impairs translation initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(27), 15609–15619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914323117>
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, *407*(6802), 327–339. <https://doi.org/10.1038/35030006>
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, *292*(5518), 883–896. <https://doi.org/10.1126/science.1060089>

## LISAD

### LISA 1. Modifitseeritud nukleosiidide HPLC analüüs.



**Joonis 14. Modifitseeritud nukleosiidide HPLC analüüs.** Sahharoosi gradiendis puhastatud 70S ribosoomid dissotseeriti, 50S fraktsioon koguti ja eraldati rRNA kasutades fenooltöötlust. (A) Väljavõtte HPLC kromatogrammist; punase kastiga on näidatud 50S ribosoomi modifitseerud nukleosiid Um. (B) HPLC tulemuste kvantifitseerimiste andmed (rel %); mõõtmistulemused on normaliseeritud wt 50S subühikute suhtes.

## LIHTLITSENTS

### **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Tiina Kaljuste,

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

*Escherichia coli* 23S ribosomaalset RNA-d modifitseeriva ensüümi RImE roll ribosoomide biogeneesil,

mille juhendaja on PhD Aivar Liiv,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Tiina Kaljuste*

**29.05.2023**