

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

Angelina Kulikovitš

***Escherichia coli* RNA helikaasi CsdA eraldamine ning selle  
ATPaasse aktiivsuse iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Ph.D Aivar Liiv

TARTU 2014

## SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Prokarüootse ribosoomi struktuur .....</b>	<b>7</b>
1.1 Ribosoomi 30S subühik.....	7
1.2 Ribosoomi 50S subühik.....	8
<b>2. Ribosoomide biogenees.....</b>	<b>10</b>
2.1 rRNA transkriptsioon .....	11
2.2 rRNA küpsemine .....	11
2.3 rRNA modifikatsioonid .....	13
2.4 Ribosoomide biogenees <i>in vivo versus</i> rekonstitutsioon <i>in vitro</i> .....	13
<b>3. Ekstraribosomaalsed faktorid.....</b>	<b>16</b>
3.1 RNA šaperonid .....	16
3.2 Ribosoomi-sõltuvad GTPaasid.....	17
<b>4. RNA helikaasid .....</b>	<b>19</b>
4.1 RNA helikaaside üldiseloomustus.....	19
4.2 DEAD-box valgud prokarüootides.....	19
4.2.1 DEAD-box valkude struktuur.....	20
4.2.2. <i>E. coli</i> DEAD-box valgud .....	21
4.3 CsdA (DeaD) helikaas .....	21
4.3.1 CsdA roll ribosoomide assambleerumises.....	22
4.3.2 CsdA valgu ensümaatiline aktiivsus.....	23
4.3.3 Teised CsdA valgu funktsioonid .....	24
<b>EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Töö eesmärk .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Materjal ja meetodika.....</b>	<b>26</b>
2.1 Bakteritüved, plasmiidid.....	26
2.2 Söötmed .....	26
2.3 Puhvrid .....	26
2.4 Ensüümid ja kemikaalid .....	27
2.5 Aparatuur .....	27
2.6 Rakulüsaadi valmistamine ja ribosoomide funktsioneerimine.....	28
2.7 Ribosoomide töötlus NH <sub>4</sub> Cl-ga.....	28

2.8 Ribosoomide „koorimine“ .....	29
2.9 Ribosomaalse RNA eraldamine fenool-kloroform meetodil.....	29
2.10 CsdAvalgu eraldamine .....	29
2.10.1 Rakumassi kasvatamine.....	29
2.10.2 Valgu eraldamine afiinsuskromatograafia meetodi abil.....	30
2.11 CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse test.....	31
<b>3. Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>33</b>
3.1 Eksperimentaalne strateegia.....	33
3.2 CsdA valgu eraldamine ja puhastamine .....	35
3.3 Valgu ATPaasse aktiivsuse analüüs .....	38
3.3.1 mRNA ja tRNA .....	39
3.3.2 16S rRNA ja 23S rRNA .....	40
3.3.3 Ribosoomid (70S, 50S ja 30S) .....	42
3.3.4 Soolaga “pestud” ribosoomid .....	46
3.3.5 Soolaga “kooritud” ribosoomid .....	48
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>54</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>56</b>
<b>TÄNUSÕNAD.....</b>	<b>57</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>58</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....</b>	<b>66</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>67</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsiliin

ATP - adenosiin-5'-trifosfaat

dpm – lagunemine minutis (*decay per minute*)

DTT – ditiotreitol

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

His - histidiin

IPTG – isopropüül- $\beta$ -D-tiogalaktopüranosiid

Km – kanamütsiin

MDa – megadalton

*neo* – neomütsiin

Ni-NTA – nikkel-nitriloatsetaat

PAAG – poliakrüülamiid geelelektroforees

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid

PTC –peptidüültransferaasne tsender

RI – rekonstitutsiooni vaheühend (*reconstitution intermediate*)

RNA - ribonukleiinhape

*rrn* – ribosomaalse RNA operon

r-valk – ribosoomi valk

S – Svedbergi ühik, sedimentatsioonikoefitsient

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SF – superperekond (*superfamily*)

U – ühik (*Unit*)

wt – metsiktüüp (*wild type*)

$\beta$ -ME –  $\beta$ -merkaptotoetanool

## SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribonukleiinhape ja valgu kompleks, mille ülesandeks rakus on valgu biosüntees. Bakteri ribosoom koosneb suuremast (50S) ja väiksemast (30S) subühikust. Suurema subühiku koostises on kaks rRNA molekuli (23S rRNA ja 5S rRNA) ja 33 ribosomaalset valku. 30S subühiku moodustab üks rRNA molekul (16S rRNA) ja 21 ribosomaalset valku (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

Ribosoomide biogenees on kõrgelt koordineeritud protsess, mis sisaldab RNA küpsemist, modifitseerimist ja valkudega kokku pakkimist. *Escherichia coli* rakus on ribosoomide biogenees seotud ekstraribosomaalsete faktoritega, mis aitavad kaasa subühikute assambleerumisele. Ühe grupi nendest faktoritest moodustavad kaksikahelaliste RNA lahtiharutavad RNA helikaasid. Nende hulka kuulub ka külmašokivalk CsdA. Kuigi CsdA helikaasi on uuritud paljude aastate jooksul, on CsdA valgu funktsionaalne iseloomustus endiselt puudulik (Iost and Dreyfus, 2006).

Käesoleva töö kirjanduse ülevaade koosneb neljast peatükist. Kahes esimeses käsitletakse ribosoomi struktuuri ja selle biogeneesi *Escherichia coli* rakus. Kolmandas peatükis antakse ülevaade ekstraribosomaalsetest faktoritest, mis osalevad ribosoomide assambleerumises. Viimane osa kirjeldab lähemalt DEAD-box perekonda kuuluvat ekstraribosomaalset valku CsdA ning annab ülevaade helikaasi funktsioonidest.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on iseloomustada CsdA valgu rolli ribosoomide biogeneesil. Hüpoteesi (CsdA valk on 50S subühiku biogeneesis osalev RNA helikaas) kontrollimiseks ja töö eesmärgi saavutamiseks analüüsitakse RNA helikaasi ATPaasset aktiivsust erinevate RNA ja RNA-valk substraatide stimuleerimisel.

## KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1. Prokariootse ribosoomi struktuur

Ribosoomi struktuuri on uuritud juba paljude aastakümnete jooksul. 1950-ndate aastate teisel poolel tõestati, et ribosoom on suur makromolekulaarne kompleks, mis kodeerib päriliku informatsiooni valgulisse olemusse (Shajani *et al.*, 2011, Spirin, 2011).

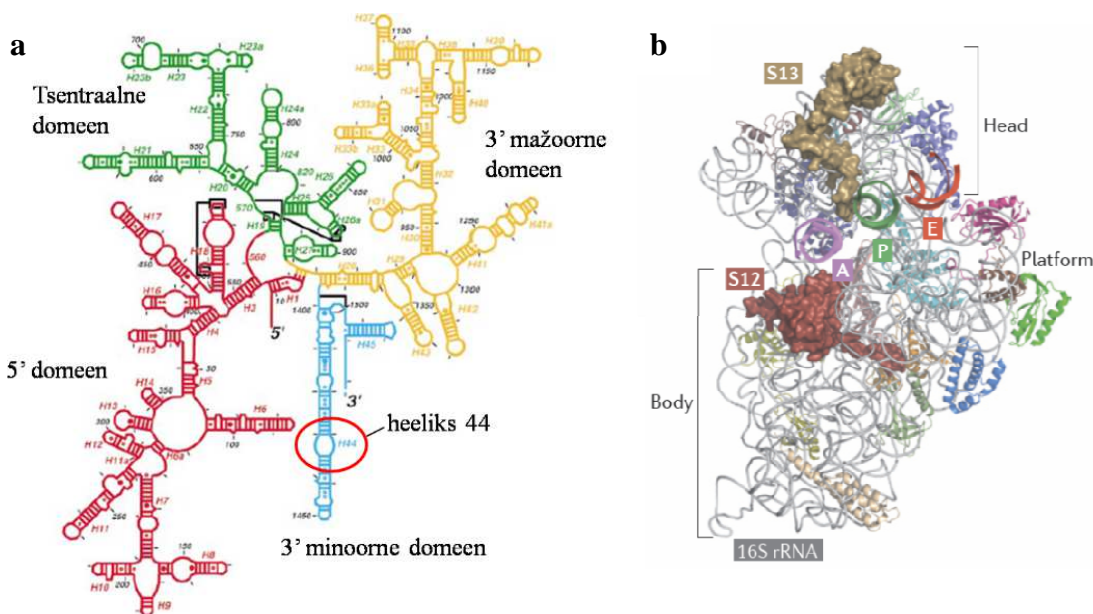
*Escherichia coli* (*E. coli*) ribosoom on suur ribonukleiinhappe-valgu kompleks, mille läbimõõt on 21 nm ning molaarmass on ligikaudu 2,4 MDa. Prokariootse ribosoomi sedimentatsioonikoefitsient on 70S (Svedbergi ühikuid), mis iseloomustab alaüksuste liikumist tsentrifugaaljõu toimel ning see koosneb kahest subühikust: 30S ja 50S (Melnikov *et al.*, 2012; Ramakrishnan ja Moore, 2001; Schuwirth *et al.*, 2005). Bakterialse ribosoomi moodustab  $\frac{2}{3}$  osas ribosomaalne RNA (rRNA) ja  $\frac{1}{3}$  osas ribosomaalsed valgud (r-valgud) (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Ribosoomi kahte subühikut hoiavad koos ~30 erinevat ühendust, mis on jagatud 12 silla (B1a-B8) vahel (Yusupov *et al.*, 2001).

*E. coli* ribosoomi väike 30S subühik sisaldab 16S rRNA (1542 nukleotiidi) ja 21 r-alku (S1 – S21). Suur, 50S subühik koosneb kahest rRNA molekulist: 23S rRNA (2904 nukleotiidi), 5S rRNA (120 nukleotiidi) ja 33 r-alku (L1-L36) (Wilson *et al.*, 2009).

#### 1.1 Ribosoomi 30S subühik

Ribosoomi 30S subühiku 16S rRNA sekundaarstruktuur jaguneb neljaks domeeniks: 5', 3' minoorne, 3' mažoorne domeen ja tsentraalne domeen (joonis 1a; Wimberly *et al.*, 2000). 16S rRNA domeenid moodustavad tertsaarstruktuuri, millel on kolm selgesti eristatavat morfoloogilist osa: „keha“, „pea“, „platvorm“ (joonis 1b). Väikse subühiku keha moodustavad 5' domeen koos r-alkudega (S4, S5, S12, S16, S17, S20) ja 3' minoorne domeen (Wilson *et al.*, 2009). Interakteerudes S1, S6, S8, S11, S15, S18 r-alkudega, kujundab tsentraalne domeen 30S subühiku „platvormi“ (Wilson *et al.*, 2009). Valgurikka „pea“ piirkonna moodustab 3' mažoorne domeen koos S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14, S19 r-alkudega. 30S subühiku 16S rRNA 3' otsas, „pea“ ja „keha“ morfoloogiliste struktuuride vahel paikneb anti-Shine-Dalgarno järjestus, mille abil seondub mRNA ribosoomile (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Kapp ja Lorsch, 2004). mRNA ja tRNA koodon-antikoodon paardumine toimub dekodeerivas tsentris, mille moodustavad 16S rRNA heeliks

44 ja r-valgud (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Melnikov *et al.*, 2012). Ribosoomis on kolm tRNA sidumiskiirkonda. Nendeks on A-, P- ja E-saidid, mis seovad mitut erinevat tRNA liiki (joonis 1b).

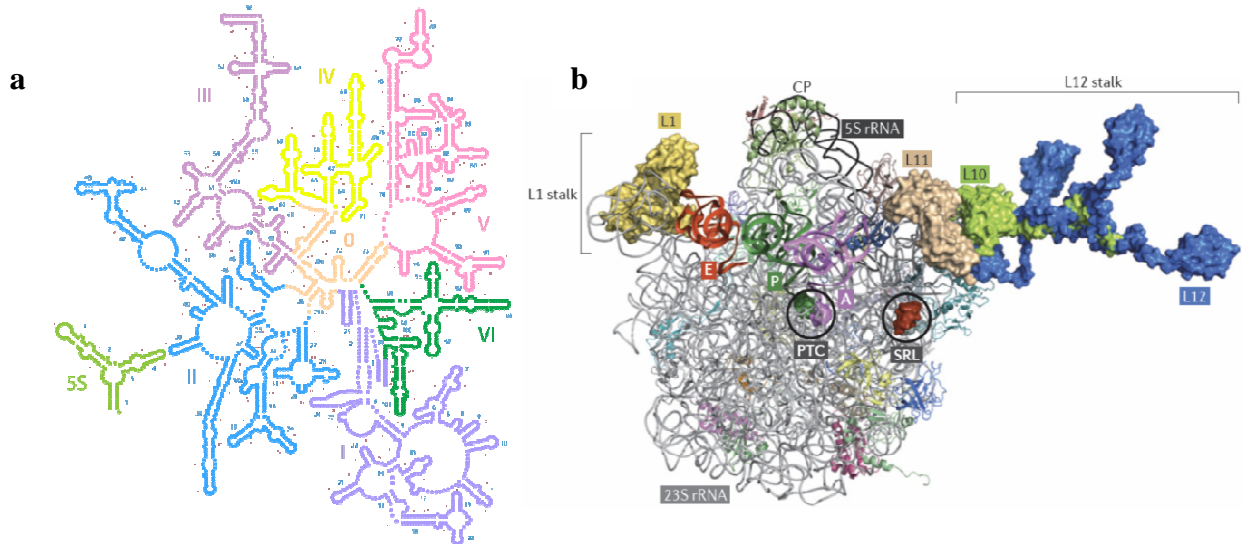


**Joonis 1.** 30S subühiku struktuur. (a) 16S rRNA sekundaarne struktuur. Punasega on joonisel näidatud 5' domeen, rohelisega tsentraalne domeen. 3' mažoorne domeen on toodud välja kollasena ning 3' minoorne domeen sinisena (kohandatud artiklist Wimberly *et al.*, 2000). (b) 30S subühiku tertsiarne struktuur suurema alaühiku poolt vaadatuna. 16S rRNA on näidatud hallina ja r-valgud on värvilistena. Lisaks struktuursetele elementidele on näidatud mRNA, dekodeeriva tsentri ja tRNA sidumis-saitide asukohad (kohandatud artiklist Yamamoto *et al.*, 2014).

## 1.2 Ribosoomi 50S subühik

Ribosoomi 50S subühiku 23S rRNA sekundaarstruktuur jaotub seitsmeks domeeniks (sh 5S rRNA) (joonis 2a). Omavahel põimudes moodustavad rRNA domeenid poolkera kujulise ruumilise struktuuri, millel eristuvad kolm väljaulatuvat jätket: tsentraalne kühm, L1-haru ja L12-haru (joonis 2b) (Petrov *et al.*, 2013; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Tsentraalne kühm koosneb 5S rRNAst ja r- Valkudest (L5, L18, L25); L12 haru läheduses asub sartsiiin-riitsiinling (SRL), mis osaleb elongatsioonifaktorite sidumissaidi moodustamises (joonis 2) (Wilson ja Nierhaus, 2003).

50S subühiku keskel asuvad tRNA sidumissaidid A, P ja E ning peptidüültransferaasne tsenter (PTC), kus toimub polüpeptiidsideme moodustamine (Melnikov *et al.*, 2012; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Ribosoomi poolt sünteesitud polüpeptiidid väljuvad ribosoomist PTC all asuva tunneli kaudu, mille seinad on moodustunud konserveerunud 23S rRNA osadest ja sisaldavad L4, L22, L23 r-valke (Melnikov *et al.*, 2012).



**Joonis 2.** 50S subühiku struktuur. (a) 23S ja 5S rRNA sekundaarstruktuur. On toodud välja kuus domeeni (I – VI) ja 5S kui domeen VII. Kohandatud veebilehelt [www.apollo.chemistry.gatech.edu](http://www.apollo.chemistry.gatech.edu) (b) 50S subühiku tertsiaarne struktuur väiksema alaühiku poolt vaadatuna. Joonisel on näidatud 23S rRNA ja 5S rRNA. Värvilisena on näidatud r-valgud, tsentraalne kühm (CP), L1-haru ja L12-haru. Lisaks alaühikust ulatuvale osadele tertsiarstruktuuril, on näidatud PTC ja SRL asukohad. Kohandatud artiklist Yamamoto *et al.*, (2014).

## 2. Ribosoomide biogenees

*E. coli* ribosoomide biogenees hõlmab kolme ribosomaalse RNA ja üle viiekümne valgu kokkupakkimist (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Williamson, 2008). Kiiresti kasvavas bakterirakus peab biogenees olema väga efektiivne selleks, et tagada õiges koguses funktsioneerivaid ribosome (Williamson, 2008). Ribosoomi biogenees koosneb paljudest etappidest, mis on omavahel koordineeritud (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Williamson, 2008). Ribosoomide biogenees on kotranskriptsiooniline protsess, mis lahtiseletatult tähendab seda, et RNA voltumise ja valkude seondumise protsess algab juba RNA sünteesi käigus (Wilson ja Nierhaus, 2007). Ribosoomi biogeneesi peamised protsessid on esitatud tabelis 1.

**Tabel 1.** Prokariootse ribosoomi biogeneesi protsessid ja selles osalevad komponendid

1. rRNA transkriptsioon	16S, 23S, 5S rRNA
2. r-valkude süntees	S-, L- valgud
3. rRNA keemiline modifitseerimine	Metüleerimine, pseudouridüleerimine
4. r-valkude keemiline modifitseerimine	Metüleerimine, atsetüleerimine
5. rRNA küpsemine	RNAseIII, RNAseE, RNAseG, RNAseP
6. rRNA voltimine	
7. r-valkude seondumine	
8. assambleerumiskomponentide seondumine ja vabastamine	GTPaasid, RNA helikaasid

(Williamson, 2008)

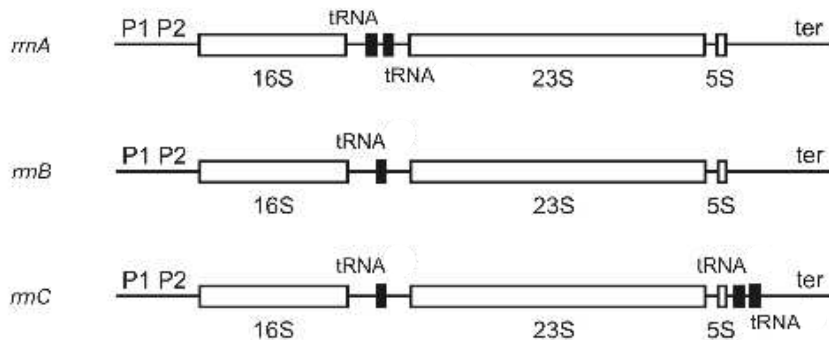
*E. coli* rakus on 19 r-valgu operooni ning suur osa R-valkude geenidest on koondunud operoonidesse. Sageli on r-valkude geenid klasterdunud translatsioonifaktorite geenidega (EF-G, EF-Tu, EF-T). R-valkude süntees toimub paralleelset rRNA transkriptsiooniga (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Williamson, 2008).

Biogeneesi käigus sünteesitakse võrdne kogus kõiki ribosoomi valke, mis on tagatud peamiselt kahe mehhanismi poolt. Esimene neist on translatsiooniline liitmise mehhanism (*translational coupling*) ehk ribosomaalsete valkude translatsiooni sõltuvus teiste samas operonis kodeeritud r-valkude transleerimisest. Näiteks r-valku S11 transleeritakse ainult juhul, kui eelnevalt on toimunud r-valgu S13 translatsioon  $\alpha$  operonilt (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Nomura, 1999; Jinks-Robertson ja Nomura, 1982). Teiseks

mehhanismiks on r-valkude translatsiooni reguleerimine repressor r-valkudega tagasiside mehhanismi kaudu (*feedback regulation*). Antud mehhanismi võtmeks on r-valgud, mis võivad seonduda nii rRNA, kui ka enda mRNA või siis operoni operaatorjärjestusega, takistades seega operoni edasise translatsiooni (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

## 2.1 rRNA transkriptsioon

*E. coli* ribosoomi biogeneesi esimeseks etapiks on rRNA süntees. Kiiresti kasvavas bakterirakus moodustab see ligikaudu poole raku metaboolsest aktiivsusest (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Williamson, 2008). *E. coli* genoomis on seitse rRNA operoni (*rrn A*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* ja *rrnH*), millelt sünteesitakse 16S rRNA, 23S rRNA ja 5S rRNA ühe esmase transkriptina (pre-rRNA) (joonis 3) (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Srivastava ja Schlessinger, 1990). Operoni alguses on kaks promootorit, millele järgneb 16S rRNA geen. 16S ja 23S rRNA geenide vahel on üldjuhul üks tRNA geen. *rrnC*, *rrnD* ja *rrnH* operonides on 3' otsas lisaks 5S rRNA geenile veel kaks tRNA geeni (Srivastava ja Schlessinger, 1990; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

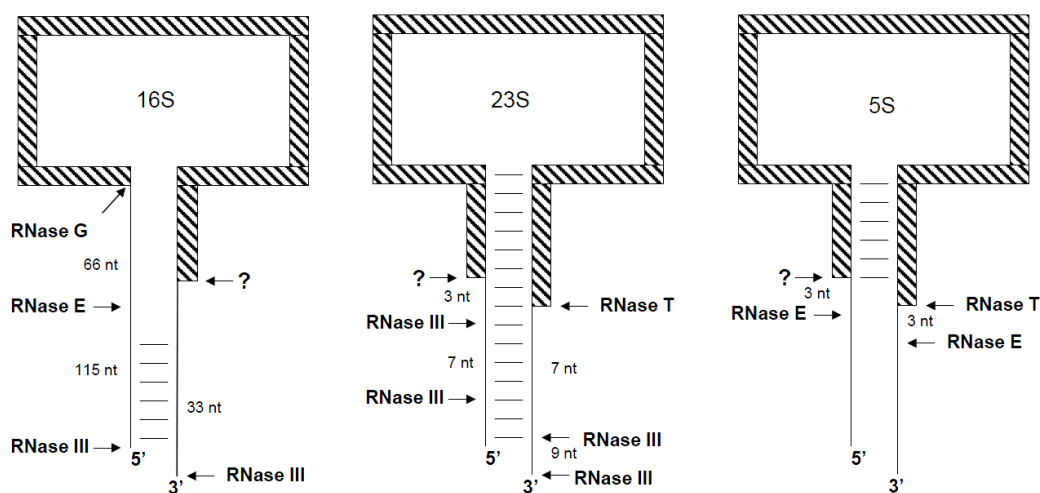


**Joonis 3.** *E. coli* rRNA operoonide struktuur. Ristkülikutena on näidatud 16SrRNA, 23S rRNA, 5S rRNA ja tRNA geenid. Geenide alguses on kaks promootorit (P1, P2), lõpus asub terminaator (ter). Kohandatud artiklist Srivastava ja Schlessinger, 1990.

## 2.2 rRNA küpsemine

Ribosomaalse RNA küpsemine on funktsionaalse rRNA moodustamise protsess, mis algab enne transkriptsiooni lõpetamist. rRNA küpsemisel osalevad mitmed nukleasid: RNase III, RnaseE, RnaseG, RNase T (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Gegenheimer ja Apirion, 1981; Williamson, 2003). RNase III on endoribonukleas, mis osaleb protsessingu esimeses

etapis. RNase III tunneb ära mittespetsiifilise järjestuse pikas RNA kaksikahelas ja lõhub moodustunud fosfodiestersidemed (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Selle tulemusel moodustub kolm rRNA liiki: pre-23S, pre-16S ja pre-5S rRNA (King *et al.*, 1984). RNase T on peamine ensüüm, mis viib läbi 23S rRNA 3' otsa küpsemise (Srivastava ja Schlessinger, 1988; Li *et al.*, 1999b). 23S rRNA 3' ja 5' otsade lõplik küpsemine toimub üksteisest sõltumatult (Li *et al.*, 1999b).



**Joonis 4.** 23S rRNA, 16S rRNA ja 5S rRNA küpsemine. Nooledega on näidatud, millised kohad tunnevad ära ensüümid RNase G, RNase E, RNase III ja RNase T. Kohandatud artiklist Sulthana ja Deutscher, 2013.

16S rRNA küpsemises osalevad RNase E ja RNase G ensüümid on vajalikud 5' otsa küpsemiseks (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Li *et al.*, 1999a). RNase E inaktiveerumisel aeglustub 16S rRNA küpsemine 17S prekursorist. RNase E ja RNase G inaktiveerumisel peatub 16S rRNA 5' otsa küpsemine täielikult (Li *et al.*, 1999a). RNase E ensüümi toimel moodustub 9S rRNA prekursorist 5S rRNA (Roy *et al.*, 1983). 5S rRNA 3' otsa küpsemise viib läbi peamiselt RNase T. Lisaks sellele 5S rRNA küpsemises osalevad ka teised ensüümid: PNPase, RNase II, PH, D või BN (Li ja Deutscher, 1995). Samuti nagu 23S rRNA molekulidel, on 5S rRNA 3' ja 5' otsade lõplik küpsemine üksteisest sõltumatu (Li ja Deutscher, 1995).

## 2.3 rRNA modifikatsioonid

Samaaegselt transkriptsiooniga läbib rRNA keemilisi modifikatsioone, mille viivad läbi erinevad ensüümid. Nendeks on RlmE, RluD, RsmG, RsuA jt. (Siibak ja Remme, 2010; Williamson, 2003). Funktsionaalne 16S rRNA sisaldab 11 modifitseeritud positsiooni, millest kümme on metülatsioonid ja üks on pseudouridiin (Siibak ja Remme, 2010). Neli 16S rRNA modifiatsiooni viiakse läbi enne rRNA ja valkude assotsieerumist ehk assambleerumise varasemas etapis. Ülejäänud seitse modifikatsioone leiavad aset 30S subühiku küpsemise hilises etapis (Siibak ja Remme, 2010; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

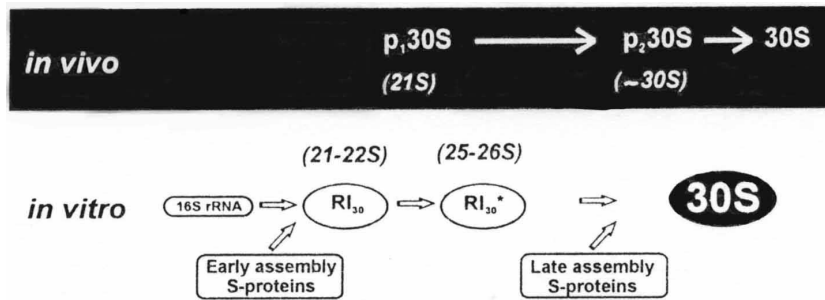
23S rRNAs on 26 modifikatsiooni, millest 14 on metülatsioonid, üheksa pseudouridiinid, üks on metüleeritud pseudouridiin ning üks mutatsioon on teadmata (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 23S rRNA viiendas domeenis, peptidüül-transferaase tsentri (PTC) lähedal, paiknevad seitse obligatoorset modifitseeritud nukleotiidi, mis on hädavajalikud funktsionaalse 50S ribosomaalse partikli moodustamiseks *in vitro* rekonstitutsioonis (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

## 2.4 Ribosoomide biogenees *in vivo* versus rekonstitutsioon *in vitro*

Ribosoomide biogenees *in vivo* on koordineeritud subühikute kokkupakkimise protsess, mis hõlmab endas rRNA-de ja r-valkude sünteesi, rRNA küpsemist ja modifitseerimist ning rRNA ja r-valkude assotsieerumist funktsionaalseks subühikuks. Normaalses tingimustes *in vivo* kulgeb ribosoomide assambleerumine ühe – kahe minuti jooksul (Shajani *et al.*, 2011). 30S subühiku *in vivo* assambleerumise protsessis on kirjeldatud kaks eellaspartiklit: p<sub>1</sub>30S ja p<sub>2</sub>30S. *In vivo* 50S subühiku biogeneesil on teada kolm eellaspartiklit: p<sub>1</sub>50S, p<sub>2</sub>50S ja p<sub>3</sub>50S (Nierhaus ja Wilson, 2004).

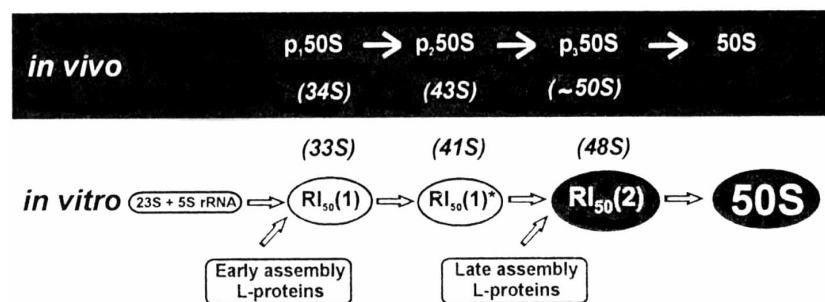
*In vitro* rekonstitutsioon on põhiline meetod ribosoomide assambleerumise uurimisel. Rekonstitutsioonil on sobivatel tingimustel võimalik konstrueerida funktsionaalseid ribosome, kasutades selleks puhastatud ribosoomi komponente. Erinevalt rakukeskkonnast aitavad energiabarjääre ületada kõrged *in vitro* temperatuur ja soola kontsentratsioon (Shajani *et al.*, 2011). *In vitro* 30S ja 50S subühikute rekonstitutsioon toimub mitmeetapiliselt. 30S subühiku rekonstitutsiooni saab jagada kolmeks etapiks. Esimeses etapis seonduvad 16S rRNA ja pre-RI valgud. Tulemuseks on vaheühend RI (inlg k *reconstitution intermediate*), mille sedimentatsioonimäär on 21S. Moodustunud partiklis toimuvad kõrgema temperatuuri

tingimuses ümberkorraldused ning tekib 26S intermediaat. Viimaseks etapiks on hiliste r-  
 valkude seondumine, mille tulemusena moodustub funktsionaalne 30S subühik (joonis 4)  
 (Nierhaus ja Wilson, 2004; Shajani *et al.*, 2011; Maki *et al.*, 2002).



**Joonis 5.** 30S subühiku *in vivo* assambleerumine ja *in vitro* rekonstitutsioon. Mustas foonis on näidatud subühiku assambleerumine *in vivo*, mis toimub läbi kahe vaheühendi ( $p_1,30S$  ja  $p_2,30S$ ). *In vitro* rekonstitutsioon on kolmeetapiline protsess, kus tekivad 21-22S ja 25-26S vaheolekud. Rekonstitutsiooni esimeses etapis ühendatakse varasemad S-valgud ja 16S rRNA ning viimases etapis lisatakse hilised S-valgud. Kohandatud doktoritööst Liiv, 1998.

50S subühiku rekonstitutsioon on kaheetapiline reaktsioon, millel on kolm vaheolekut. Esimeses etapis seonduvad 23S rRNA-ga 5S rRNA ja 21 r-valgud. Selle etapi produktiks on intermediaat sedimentatsioonimääraga 33S. Seejärel tõstetakse temperatuur 42°C-ni ja tekib tekib 41S partikkel, millele lisatakse hilised r-valgud ning tekib vaheühend sedimentatsioonimääraga 48S. Funktsioonalse suure subühiku saamiseks kuumutakse 48S vahepartiklit 50°C juures (joonis 5) (Nierhaus ja Wilson, 2004; Shajani *et al.*, 2011).



**Joonis 6.** 50S subühiku *in vivo* assambleerumine ja *in vitro* rekonstitutsioon. Mustas foonis on näidatud subühiku assambleerumine *in vivo*. Elusrakus toimub assambleerumine läbi kolme vaheühendi ( $p_1,50S$ ,  $p_2,50S$  ja  $p_3,50S$ ). *In vitro* rekonstitutsiooni esimeses etapis seonduvad 23S rRNA, 5S rRNA ja varased L-valgud, misjärel tõstetakse reaktsiooni

temperatuuri kuni 42°C-ni ja moodustub 41S vahepartikkel. Lisades hilise assambleerumise valgud, tekib 48S vaheühend, millest 50°C temperatuuril moodustub funktsionaalne 50S subühik. Kohandatud doktoritööst Liiv, (1998).

Vaatamata *in vitro* ja *in vivo* ribsoomi subühikute biogeneesi vahepartiklite suurele sarnasusele erinevad *in vivo* assambleerumine ja *in vitro* rekonstitutsioon mitmeti. Esiteks on *in vitro* ribosoomi rekonstitutsioon palju aeganõudvam protsess kui *in vivo* ribosoomi assambleerumine (Wilson ja Nierhaus, 2007). *In vivo* assambleerumine kestab mõned minutid ja toimub 37°C juures, samal ajal kui *in vitro* assambleerumise inkubatsiooniperiood kestab kuni poolteist tundi kõrgematel temperatuuridel kui 37°C (Nishi *et al.*, 1988). *In vitro* assambleerumiseks kasutatakse ainult puhastatud ribosoomide komponente, mis kodeerivad kogu ribosoomi moodustumiseks vajaliku info. *In vivo* on protsessi lisaks kaasatud veel ekstraribosomaalsed valgud, mis aitavad kaasa ribosoomide kokkupakkimisele. Nendeks ekstraribosomaalseteks faktoriteks on SrmB, DbpA, DnaK, Der jt. (Nishi *et al.*, 1988; Williamson, 2003; Shajani *et al.*, 2011).

### 3. Ekstraribosomaalsed faktorid

Ribosoomide biogeneesi on kaasatud erinevad ekstraribosomaalsed faktorid, mis on jaotud erinevatesse rühmadesse oma funktsiooni alusel (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Shajani *et al.*, 2011). Ribosoomi biogeneesi ekstraribosomaalsed faktorid on välja toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Ekstraribosomaalsed faktorid.

1. RNA šaperonid	RimM, RbfA
2. kuumašokivalgud	DnaK, GroEL
3. ribosoomi sõltuvad GTPaasid	Era, RsgA, ObgE, Der
4. RNA helikaasid	CsdA, SrmB, DbpA, RhlE

(Iost *et al.*, 2013; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007)

#### 3.1 RNA šaperonid

RNA šaperonid on ekstraribosomaalsed lisavalgud, mis hõlbustavad valkude voltumist ribosoomide biogeneesil (Alberts *et al.*, 2008). Arvatakse, et RNA šaperoonidest osalevad ribosoomide assambleerumises RbfA (*ribosome binding factor A*), RimM (*ribosome maturation factor M*) ja kuumašokivalgud DnaK ja GroEL (Bylund *et al.*, 1998; El Hage *et al.*, 2001). RbfA on külmašokivalk, mis on assotsieerunud 30S subühiku „pea“ regiooniga ning interakteerub 16S rRNA 5' heeliks regiooniga 30S subühiku assambleerumise hilises etapis. RbfA valgu ekspressioon surub alla külmatundliku mutatsiooni 16S rRNAs (C23U) (Dammel ja Noller, 1995). *rbfA* geeni deleteerimisel täheldatakse 70S ribosoomide vähenemist, samal ajal suureneb vabade 30S ja 50S subühikute osakaal. RimM assotsieerub spetsiifiliselt vabade 30S subühikutega (Wilson ja Nierhaus, 2007). Selle valgu puudumisel rakkudes akumulerevad 17S rRNA prekursorid. RimM šaperoni defitsiit põhjustab translatsiooni aeglustumist, mille tagajärjel aeglustub ka rakkude kasv (Bylund *et al.*, 1997).

Maki *et al* hüpoteesi kohaselt on DnaK kuumašokivalk seotud 30S prekursoritega ning aitab kaasa 30S subühiku rekonstitutsiooni madalatel temperatuuridel (Maki *et al.*, 2002). Lisaks sellele arvatakse, et DnaK osaleb 50S ja 30S subühikute *in vivo* assambleerumises 42°C ja kõrgematel temperatuuridel (El Hage *et al.*, 2001). Peale DnaK šaperoni aitab ribosoomide biogeneesile kaasa ka kuumašokivalk GroEL. Arvatakse, et see aitab kaasa 50S assambleerumisele hilises etapis 45°C ja kõrgematel temperatuuridel. Valgu üleekspressioon

on osaliselt võimeline kompenseerima DnaK valgu puudust 50S kokku pakkimises 44°C juures (El Hage *et al.*, 2001). Nii DnaK kui ka GroEL on assotsieerunud pre-30S partiklitega ning võivad kompenseerida kõrgema temperatuuri puudumist 30S *in vitro* rekonstitutsiooni puhul (Wilson ja Nierhaus, 2007).

### 3.2 Ribosoomi-sõltuvad GTPaasid

Ribosoomide biogeneesi on kaasatud neli väikest GTPaasi: Era, Der, ObgE. Era ja RsgA osalevad 30S subühiku assambleerumises, ObgE ja Der mängivad tähtsat rolli 50S subühiku assambleerumises. Era, Der ja ObgE valgud on hädavajalikud raku elujõulisuseks ning paljudeks raku funktsioonideks (Caldon ja March, 2003; Verstraeten *et al.*, 2011; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

**Era** (*E. coli Ras-like protein*) on kõrgelt konserveerunud valk, mille molaarmass on 34 kDa. Era osaleb ribosoomi biogeneesis seondudes väiksema subühikuga. Era valgu defitsiidi korral akumulereeruvad 16S rRNA prekursorid ning suureneb vabade 30S ja 50S subühikute osakaal (Meier *et al.*, 2000). Valgu puudumisel 42°C juures surub Era valk alla mõnede kuumašokivalkude ekspressiooni (Johnstone *et al.*, 1999). Era valgu funktsioonid on otseselt seotud raku kasvamisega: GTPaas osaleb rakutsükli reguleerimises, määrates raku jagunemiseks kuluva aja erinevates kasvutingimustes. On näidatud, et Era puudumine põhjustab bakterirakkude filamentatsiooni 27°C juures (Verstraeten *et al.*, 2011; Johnstone *et al.*, 1999).

**Der** (*double-Era-like domain* GTPaas). Der valk, osaledes ribosoomide biogeneesis, interakteerub 70S ribosoomidega ja vabade 30S ja 50S subühikutega *in vitro*. Der valgu puudumine raku põhjustab pre-23S ja pre-16S ning 30S ja 50S subühikute akumulereerumist, mis viib polüsoomide ja 70S ribosoomide osakaalu vähenemisele raku (Verstraeten *et al.*, 2011). On võimalik, et Der osaleb biogeneesis seondudes rRNA ja rRNA-valgu kompleksitega ja tagades 50S subühiku stabiilsuse (Hwang ja Inouye, 2006). Der valk mõjutab hiliste 50S r-valkude (L9, L2, L6 ja L18) lülitumist 50S subühikusse. Der valgu puudumisel akumulereeruvad 50S subühikud, millel on puudu L16, L27 ja L36 r-valgud (Verstraeten *et al.*, 2011).

**ObgE** (CgtA; *Caulobacter GTP-binding protein A*). ObgE osaleb ribosoomide biogeneesis interakteerudes spetsiifiliselt L3 valguga. ObgE moodustub GTP-sõltuva interaktsiooni 16S ja

23S rRNA-ga ja mõnede r- Valkudega (S3, S4, S5, S13, L2, L4, L17) (Verstraeten *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2005). ObgE valgu defitsiit põhjustab vabade subühikute ning 50S vahepartiklite akumulereerimist. Väheneb ka 70S ribosoomide osakaal. Samuti akumulereeruvad 16S ja 23S rRNA prekursorid ja tekivad defektid rRNA 5' ja 3' otsade küpsemises (Verstraeten *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006). Peale ribosoomide biogeneesi osaleb ObgE valk *E. coli* bakteri raku kasvu reguleerimises (Verstraeten *et al.*, 2011), olles kaasatud järgmistesse *E. coli* rakutsükli etapidesse: DNA replikatsiooni initsieerimisse ja kromosoomide segregatsiooni (Verstraeten *et al.*, 2011).

**RsgA** (YjeQ; *ribosome small subunit dependent GTPase A*). Sobivatel tingimustel *in vitro* on RsgA assotsieerunud 30S subühikuga, millega stimuleeritakse tema GTPaasne aktiivsust (Daigle ja Brown, 2004; Guo *et al.*, 2011; Wilson ja Nierhaus, 2007). RsgA valgu puudumisel aeglustub raku kasv ning *rsgA* geeni deletsioon põhjustab vabade subühikute akumulereerumist. Lisaks sellele on RsgA kirjeldatud külmašokivalguna ning on madalatel temperatuuridel vajalik eelkõige 16S rRNA 5' otsa küpsemiseks (Guo *et al.*, 2011).

## 4. RNA helikaasid

### 4.1 RNA helikaaside üldisloomustus

RNA helikaasid on suur ensüümide grupp, mis osaleb RNA metabolismis ja ribosoomide biogeneesis (Rocak ja Linder, 2004; Jankowsky ja Fairman, 2007). RNA helikaasid katalüüsivad ribonukleiinhape kaksikahelate lahtiharutamist, mille toimumiseks kasutatakse ATP hüdrolüüsil vabanevat energiat (Cordin *et al.*, 2006).

Primaarse järjestuse ja konserveerunud motiivide alusel on RNA helikaasid jagatud kolme suurte superperekonda ja kahte perekonda (SF1 – SF5) (Cordin *et al.*, 2006). Valdav osa RNA helikaasidest kuulub helikaaside superperekonda 2 (SF2) ning on omakorda rühmitatud alamperekondadesse: DEAD-box, DEAH ja DexH, mis kuuluvad DExD/H perekonda, millest suurim on DEAD-box (Cordin *et al.*, 2006; Rocak ja Linder, 2004; Jankowsky ja Fairman, 2007).

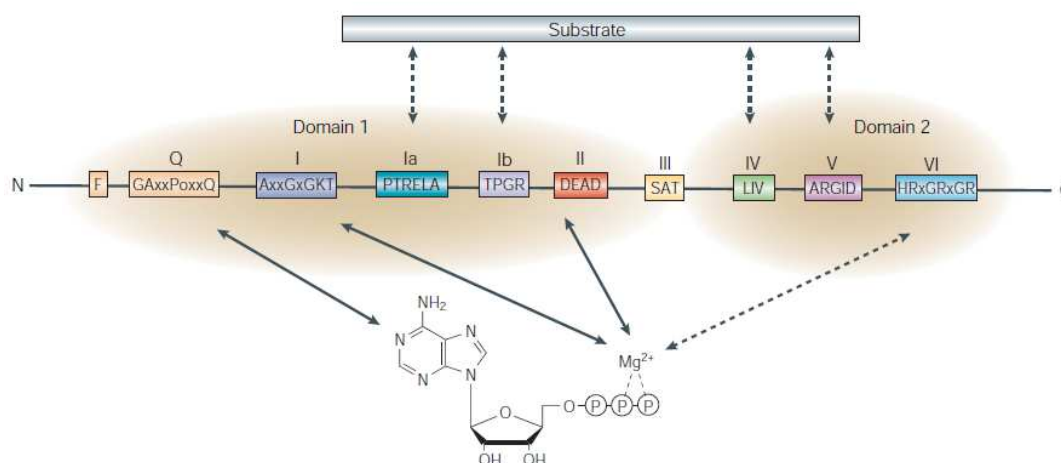
SF1 (*superfamily 1*) ja SF2 (*superfamily 2*) helikaaside struktuure iseloomustab kõrgelt konserveerunud tuumik, mis koosneb kahest omavahel kovalentselt seotud valgudomeenist (Rocak ja Linder, 2004; Jankowsky ja Fairman, 2007; Fairman-Williams *et al.*, 2010; Cordin *et al.*, 2006). N-terminaalne domeen sisaldab ATP-seonduvat motiivi Q, I, II, ATP-hüdrolüüsivat motiivi III ning RNA-seonduvaid motiive Ia ja Ib. C-terminaalses domeenis asuvad RNA-seonduvad motiivid IV ja V, VI, mis võivad koordineerida ATPaasset ja helikaasset aktiivsust (Cordin *et al.*, 2006). SF1 ja SF2 valkudele on iseloomulikud mittekonserveerunud N-terminaalsed ja C-terminaalsed otsad (*extensions*), mis vahendavad interaktsioone RNA substraatide vahel (Iost ja Dreyfus, 2006).

### 4.2 DEAD-box valgud prokariootides

DEAD-box on kõige suurem alamperekond superperekonnas 2 ja kuulub DexD/H helikaaside perekonda (Cordin *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2007; Jankowsky ja Fairman, 2007). DEAD-box valkude struktuuris on üheksa konserveerunud motiivi, mis reguleerivad ATPaasset ja helikaasset aktiivsust (Cordin *et al.*, 2006). *E. coli* rakus on viis DEAD-box-i valku: DeaD/CsdA, SrmB, RhlB, RhlE (Iost ja Dreyfus, 2006).

#### 4.2.1 DEAD-box valkude struktuur

*E. coli* DEAD-box valgud koosnevad üheksast konserveerunud aminohappelistest motiivist (Q-motiiv, motiiv I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI), mis on jaotatud kaheks domeeniks. Motiivid Q, I, II ja VI seonduvad ATP molekuliga. Arvatakse, et valgud seonduvad substraatidega Ia, Ib, IV ja V motiivide kaudu. N-terminaalses otsas Q-motiivi kõrval paikneb fenüülalaniini jääk. Arvatakse, et see reguleerib ATP seondumist ja hüdrolyüüsi (Rocak ja Linder, 2004). Üheks DEAD-box valkude iseloomulikuks motiiviks on Walker B motiiv ehk D-E-A-D motiiv (motiiv II), millest sai nimetuse kogu valgu perekond (Cordin *et al.*, 2006; Iost *et al.*, 2013; Bizebard *et al.*, 2004). DEAD-motiiv koosneb kahest aspartaadist (Asp), glutamiinist (Gln) jaalaniinist (Ala) ning on kaasatud ATP-aasesse ja helikaasesse aktiivsusesse (Cordin *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2007). Glutamiin koordineerib magneesium ionide liikumist ja see omakorda vastutab ATP  $\beta$ - ja  $\gamma$ - fosfoanhüdriidsidemete hüdrolyüüsi eest. Esimese aspartaadi ning magneesiumi ionide abil seondatakse ATP molekulid. Teise aspartaadi abil seondatakse DEAD-motiiv III motiivi seriiniga ja treoniiniga (joonis 4) (Cordin *et al.*, 2006).



**Joonis 7.** DEAD-box valgu järjestuse motiivid. Joonisel on näha N-terminaalne ja C-terminaalne ots. N-terminaalses otsas paikneb fenüülalaniini jääk (F). Domeenis 1 ja 2 paiknevad motiivid, mille seas on ka DEAD-box helikaasidele iseloomulik DEAD-motiiv (II). Motiivid Q, I, II ja VI seonduvad ATP molekuliga. Valgud seonduvad substraatidega Ia, Ib, IV ja V motiivide kaudu. Kohandatud artiklist Rocak ja Linder (2004).

#### 4.2.2. *E. coli* DEAD-box valgud

*E. coli* rakus on kirjeldatud viis DEAD-box valkude geeni. Nendeks on: *csdA*, *dbpA*, *rhlB*, *rhlE* ja *srnB*, mis omakorda kodeerivad järgmiseid valke: DbpA, DeaD (või CsdA), RhlB, RhlE ja SrmB (Iost ja Dreyfus, 2006).

**SrmB** valk on esimene DEAD-box helikaas, mis tuvastati *E. coli* rakus (Nishi *et al.*, 1988; Trubetskoy *et al.*, 2009). SrmB osaleb 50S subühiku assambleerumise varasemas etapis ning selle valgu defitsiit põhjustab vabade 50S subühikute defitsiiti, millega kaasneb 40S partiklite ja 23S rRNA prekursorite akumulatsioon (Charallais *et al.*, 2004; Zhao ja Jain, 2011; Trubetskoy *et al.*, 2009). *In vivo* ja *in vitro* interakteerub SrmB valk spetsiifiliselt ribosoomi struktuuriga, mis paikneb 23S rRNA 5' otsa lähedal. SrmB valgu helikaas aktiveerib RNA substraate (23S rRNA ja 16S rRNA) (Trubetskoy *et al.*, 2009). Madalal temperatuuril seondub SrmB valk 50S prekursoritega (Iost ja Dreyfus, 2006).

**DbpA** (*DEAD-box protein A*) on järjestusspetsiifiline helikaas, mille aktiveerumiseks on vajalik ATP. DbpA koosneb kolmest domeenist: C-terminaalne ja kaks N-terminaalset domeeni (Sharpe Elles *et al.*, 2009). DbpA seondub C-terminaalse domeeni abil 23S rRNA lingiga 92 (*stem-loop 92*), mis on osa peptidüültransferaasest tsentrist (Sharpe Elles *et al.*, 2009). Seandumine lingile 92 stimuleerib DbpA ATPaasist aktiveerumist (Trubetskoy *et al.*, 2009; Zhao ja Jain, 2011). Kaks N-terminaalset domeeni seonduvad rRNA substraatile nõrgalt ja mittespetsiifiliselt, moodustades ATP seandumise tasku (*ATP binding pocket*) (Iost ja Dreyfus, 2006; Sharpe Elles *et al.*, 2009). DbpA valk osaleb 50S subühiku assambleerumisel (Trubetskoy *et al.*, 2009). Vaatamata valgu kõrgele spetsiifilisusele, ei põhjusta *dbpA* geeni deleteerimine kasvudefekte (Peil *et al.*, 2008).

**RhlB** ja **RhlE** valke on uuritud väga vähe. On teada, et RhlB interakteerub kahe ribonulkeaasiga: RNaseE ja polünukleotiidi fosforülaasiga, mis koos glükolüütilise ensüümi enolaasiga moodustavad degradosoomi (Zhao ja Jain, 2011). RhlE moduleerib DeaD ja SrmB-valkude funktsioone (Zhao ja Jain, 2011; Jain, 2008).

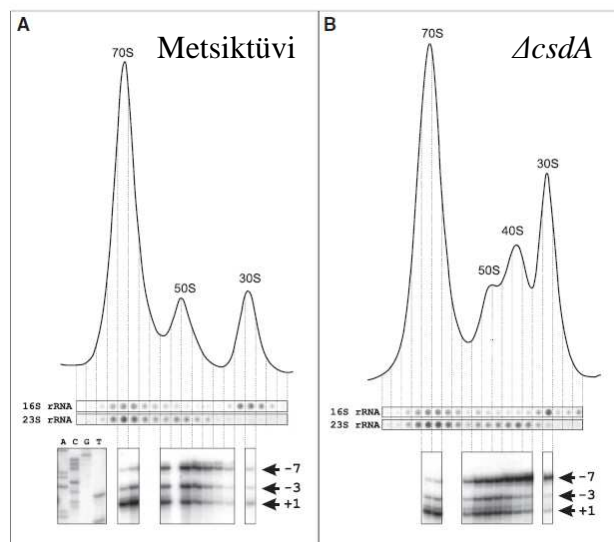
#### 4.3 CsdA (DeaD) helikaas

DeaD valk on DEAD-box-i perekonda kuuluv valk, mida esimest korda kirjeldati aastal 1991 ATP-sõltuva RNA helikaasina. Hiljem ta sai endale uue nime: CsdA (*cold-shock DEAD-box*

*protein A*), kuna seda ekspresseeritakse madalatel temperatuuridel (Jones *et al.*, 1996). CsdA on kaheaheelalist RNA-d lahtiharutav ensüüm, mis on kodeeritud *csdA* geeni poolt. CsdA helikaas osaleb ribosoomide assambleerumises - stimuleerib RNA voltimist ja stabiilsete RNA komplekside moodustumist (Iost *et al.*, 2013). Lisaks sellele osaleb DEAD-box perekonda kuuluv CsdA helikaas kõrgelt struktureeritud mRNA translatsioonil madalatel temperatuuridel. CsdA harutab lahti madalal temperatuuril tekkinud mRNA kaksikahelalised struktuurid, hõlbustades sellega mRNA translatsiooni (Lu *et al.*, 1999).

#### 4.3.1 CsdA roll ribosoomide assambleerumises

CsdA täpne roll ribosoomide biogeneesis on endiselt suures osas ebaselge. On näidatud, et helikaas osaleb nii 30S kui ka 50S subühiku biogeneesis, kuid eelkõige seostatakse teda 50S subühiku assambleerumisega (Charallais *et al.*, 2004). CsdA on külmašokivalk, mis ekspresseeritakse madalatel temperatuuridel ning *csdA* geeni deleteerimisel tekib rakkudel külmatundlik fenotüüp ja nende metabolism aeglustub (Iost *et al.*, 2013). *csdA* geeni puudumine *Escherichia coli* rakus põhjustab 50S subühikute osakaalu vähenemist ja 40S ribosomaalsete partiklite akumulereerimist (Charallais *et al.*, 2004; Peil *et al.*, 2008). Peil *et al.* (2008) poolt viidi läbi rida eksperimente, millega püüti vastata küsimusele, kas valgu puudumisel akumulereuvad 40S partiklid on 50S subühiku prekursorid või degradeerimisprodukt. Ribosomaalse RNA identiteeti 40S partiklites analüüsiti RNA dot-blot meetodi abil. Leiti, et  $\Delta csdA$  tüves 40S vahepartiklites sisaldub eelkõige 23S rRNA (joonis 8) (Peil *et al.*, 2008).



**Joonis 8.** RNA ribosoomide profiilid metsiktüvest MG1655 ja *E. coli*  $\Delta csdA$  tüvest. On näidatud rRNA sisaldis 70S ribosoomides, 50S ja 30S subühikutes. Nooledega on näidatud,

mitu nukleotiidi on 23S rRNA 5' otsas ('-7', '-3' või '+1'). Kohandatud artiklist Peil *et al.*, 2008.

Peil *et al.* (2008) uurisid praimer ekstensiooni meetodi abil, kuidas on toodetud rRNA. Eesmärgiks oli välja selgitada, kas nendes fraktsioonides on küps 23S rRNA või sisaldasid *ΔcsdA* tüvest pärit 50S subühikud ja 40S partiklid mittetäielikult toodetud 23S rRNA molekule. Tulemused näitasid, et *ΔcsdA* tüvest pärit 50S subühikud ja 40S partiklid sisaldasid 23S rRNA, mille 5' otstes on kolm või seitse lisanukleotiidi, samal ajal kui valmis 70S ribosoomis on täielikult toodetud 23S rRNA (joonis 8) (Charallais *et al.* 2004; Peil *et al.*, 2008). On huvitav, et mõlemast tüvest isoleeritud 70S ribosoomidest on 50S subühikute funktsionaalsed aktiivsused sarnased. Vabade 50S subühikute aktiivsus *ΔcsdA* tüves on kaks korda kõrgem kui metsiktüves. *ΔcsdA* tüves akumulunud 40S vahepartiklites funktsionaalset aktiivsust ei täheldatud (Peil *et al.*, 2008).

40S vahepartiklite iseloomu uurides püüti leida, kas tegemist on funktsionaalse 50S subühiku prekursori või degradeerimisproduktiga. Analüüsis uuriti ribosoomide assambleerumist ajas, milleks kasutati plussmärgimise meetodikat. Selleks märgistati rRNA radioaktiivse uridiiniga raku eksponentsiaalses kasvufaasis viie minuti jooksul (Rovera *et al.*, 1970). Transkriptsioon peatati rifampitsiliiniga. Ribosoomide populatsioon fraktsioneeriti sahharoos gradiendis tsentrifuugimise teel. Leiti, et 40S sisalduv radioaktiivne märgis liikus ajas 70S subühikute suunas. Selle tulemuse põhjal võib väita, et 40S vaheühendid on 50S subühiku eellaspartiklid, mis on akumulunud eelkõige 50S subühiku biogeneesi aeglustumise tõttu (Peil *et al.*, 2008).

#### **4.3.2 CsdA valgu ensümaatiline aktiivsus**

CsdA valk omab *E. coli* rakus kahte ensümaatilist aktiivsust: ATPaasset ja helikaasset (Cordin *et al.*, 2006). Vastavalt Bizebard *et al.* (2004) hüpoteesile on CsdA valgu ATPaasne aktiivsus stimuleeritav erinevate RNA molekulide poolt. Samal ajal on Rocak ja Linder (2004) näidanud, et ATP hüdrolüüs ei vaja spetsiifiliste RNA stimulaatorsubstraatide olemasolu.

CsdA valgu helikaasset aktiivsust on uuritud väga vähe. On teada, et CsdA helikaas on võimeline harutama lahti RNA ja RNA-valgu struktuure (Turner *et al.*, 2007; Bizebard *et al.*, 2004). Nagu ka teised DEAD-box-i helikaasid, on CsdA valk võimeline dissotsieer lühikesi

RNA duplekse, kasutades selleks ATP energiat (Turner *et al.*, 2007). Arvatakse, et DEAD-box valkude helikaasne aktiivsus on vajalik selleks, et aidata kaasa ribosoomide assambleerumisele (Iost ja Dreyfus, 2006). Kas ja millised ribosoomi struktuursed elemendid on võimelised stimuleerima CsdA ATPaasset aktiivsust, ei ole teada. Samuti ei ole hetkel teada, kas CsdA roll ribosoomide biogeneesis on seotud ainult 50S subühikuga, või on valk vajalik ka väikese subühiku biogeneesiks (Iost *et al.*, 2013)

#### **4.3.3 Teised CsdA valgu funktsioonid**

Lisaks CsdA eelpool nimetatud funktsioonidele, saab ta funktsionaalselt asendada ka RhlB helikaasi RNA degrasoomis, mis moodustub madalatel temperatuuridel (Peil *et al.*, 2008). Samuti surub CsdA helikaas alla temperatuuritundliku mutatsiooni ribosomaalses valgus S2, mis on kodeeritud *rpsB* geeni poolt. S2-valk on üks r-valkudest, mis assambleerub väikse ribosomaalse subühikuga ja on vajalik S1 valgu seondumiseks 30S subühikuga (Jones *et al.*, 1996; Peil *et al.*, 2008).

## **EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **1. Töö eesmärk**

Käesoleva töö laiemaks eesmärgiks on iseloomustada CsdA valgu rolli ribosoomide biogeneesis. Püstitatud tööhüpoteesi kohaselt on CsdA RNA helikaas, mis osaleb 50S subühiku biogeneesis. Samuti ei ole teada, millistes protsessides see valk osaleb. Antud töö kitsamaks eesmärgiks oli funktsionaalse CsdA valgu puhastamine ja tema ATPaasse aktiivsuse iseloomustamine.

Eksperimentaalne töö jagunes järgmisteks etappideks:

1. CsdA valgu eraldamine
2. CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse analüüs
3. Erinevate RNA substraatide ATPaasset aktiivsust stimuleeriva toime analüüs
4. RNA-valk substraatide (ribosoomid, pre-ribosoomid) ATPaasset aktiivsust stimuleeriva toime analüüs

## 2. Materjal ja metoodika

### 2.1 Bakteritüved, plasmiidid

Eksperementide läbiviimiseks kasutati järgnevaid *Escherichia coli* tüvesid ja plasmide:

1. *Escherichia coli* M15[pREP4] (*F*<sup>-</sup>, *lacZ* M15, *thi*-1, *lac*<sup>-</sup>, *mtl*<sup>-</sup>, *recA*<sup>+</sup>, *Km*<sup>R</sup>)
2. *Escherichia coli* JW2781 (*F*<sup>-</sup>,  $\Delta$ (*araD-araB*)567,  $\Delta$ *lacZ*4787(::*rrnB*-3),  $\lambda$ ,  $\Delta$ *csdA*738::*kan*, *rph*-1,  $\Delta$ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514)
3. pQE60-CsdA: CsdA valgu üleekspressiooni plasmiid (pQE60; QIAGEN), millesse on sisse viidud *csdA* geen.

### 2.2 Söötmed

*Escherichia coli* bakterite üleskasvatamiseks säilituskultuurist kasutati Luria-Bertani (LB) agarsöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar) (Bertani, 1951) ja 2xYT vedelsöödet (1,6% trüpton; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl) (Sambrook ja Russell, 2001). Söötmele lisati vastavalt bakteritüve resistentsusele antibiootikumi kanamütsiin (Km) ja ampitsilliin lõppkontsentratsioonides vastavalt 50 ja 100 mikrogrammi.

### 2.3 Puhvid

„Padi“ (20 mM Tris (pH=7,5); 1 M NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM MgOAc; 20% (w/v) suhkur; 6 mM  $\beta$ -merkaptotoetanool)

Adsorptsioonilahus ehk STOP puhver (0,01 M aktiivsüsi NORITA; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,036% (w/v) HCl)

ATPaasse katse puhver AP-2 (30 mM Tris (pH=7,5); 100 mM KCl; 1 mM DTT; 5 mM MgOAc)

CsdA säilituspuhver C (1 M KCl; 20 mM Tris (pH=7,5); 0,1 mM EDTA; 1mM DTT)

Elueerimispuhver B (500 mM NaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8,0); 500mM imidasool)

Koorimispuhver (50 mM; 10 mM MgOAc; 60 mM NH<sub>4</sub>Cl; 6 mM  $\beta$ -merkaptotoetanool)

Lüüsipuhver (20 mM Tris (pH=7,5); 100 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM MgOAc, 16% (w/v) sahharoos; 6 mM β-merkaptotoetanool)

OV-10 puhver (20 mM Tris (pH=7,5); 100 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotoetanool)

OV-10/1000 (20 mM Tris (pH=7,5); 1 M NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotoetanool)

Puhver A (500 mM NaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8,0); 20 mM imidasool)

Tris-SDS puhver (10 mM Tris (pH=7,5); 1,1% SDS; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl)

## 2.4 Ensüümid ja kemikaalid

Kõik kasutatud kemikaalid olid firmadelt „Sigma-Aldrich“, „AppliChem“, „Amresco“. Ensüümid Dnase I ja lüotsüüm olid firmalt „Amresco“; [γ-<sup>32</sup>P]-ATP oli firmalt „Perkin-Elmer“.

## 2.5 Aparatuur

Vedelkultuure inkubeeriti HT INFORS loksutis (loksuti kiirus 180 rpm). Kultuuride ja lahuste optilised tihedused mõõdeti Eppendorf Bio Photometer-iga. Lauatsentrifuugidest kasutati Biofuge Heraeus fresco ja Hettich Rotina 420R tsentrifuugi. Lüsaat segati BIO-SAN „end-over-end“ segajal ning rakkude lüüsiks kasutati Precellys<sup>TM</sup> Control Device homogenisaatorit. Ribosoomide fraktsioneerimiseks kasutati Beckman Coulter L-90K ultratsentrifuugi (rootor SW-28 ja Ti45) ning Beckman OPTIMA-XP lauaultratsentrifuugi. Proovides sisalduva nukleiinhappe fraktsiooneerimisel ja visualiseerimisel kasutati läbivoolu-spektromeetrit UV900, peristaatilist pumpa P1 ja isekirjutajat Recorder 112 abil (kõik GE Healthcare). Valkude eraldamiseks kasutati ÄKTA-PRIME/Primeview plus kromatograafiasüsteemi (GE Healthcare). ATPasse katse viimiseks kasutati Biosan CH-100 termostaati, proovide segamiseks FisherVortexGenie 2 ja EppendorfMixer 5432 segajad. Radioaktiivsuse loendamiseks kasutati Perkin Elmer Tri-Carb 2800 TR radioaktiivsuse loendajat.

## 2.6 Rakulüsaadi valmistamine ja ribosoomide farktsioneerimine

LB tardsöötmetelt inokuleeriti *Escherichia coli* JW2781 (BW25113  $\Delta$ csdA) koloonia 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (kuhu lisati kanamütsiin lõppkontsentratsiooniga 25  $\mu$ g/ml), mida kasvatati üleöö loksutis 37°C juures. Üleöö kultuuridest tehti kahesaja kordsed lahjendused ning kultuurid (koguses umbes 4 litrit) kasvatati 15°C ja 18°C juures kuni optilise tiheduseni vastavalt 1,5 ( $A_{600}$ ) ja 1,2 ( $A_{600}$ ).

Rakud koguti tsentrifuugides 6000 rpm, 15 min, 4°C ja resuspendeeriti 10 ml lüüsipuhvris. Rakukestade lõhkumiseks lisati lütsotsüüm (lõppkontsentratsioon 1mg/ml) ja DNA lagundamiseks DNase I (lõppkontsentratsioon 40 U/ml). Lüsaati segati BIO-SAN „end-over-end“ segajal 30 min, 4°C juures, lisati 500 ml klaasliiva 2ml lüüsisegu kohta ning homogeniseeriti PRECELL homogenisaatoris (6000 rpm, 3x60 s tsükkel). Membraankromosomaalse kompleksi sadestamiseks tsentrifuugiti proove lauatsentrifuugis 13 krpm, 20 min, 4°C. Supernatanti optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 260 nm.

Ribosoomi partiklite eraldamiseks laeti 15% - 30% sahharoosi gradiendile kuni 120 ekvivalentühikut ( $A_{260}$ ) rakulüsaati ja ultratsentrifuugiti SW28 rootoris  $\omega^2t=3,02 \times 10^{11}$  rad<sup>2</sup>·s, 4°C juures. Ribosoomide fraktsioonid visualiseeriti läbivoolu-spekrofotomeetri ( $A_{260nm}$ ), peristaatilise pumba ja isekirjutaja abil. Sahharoosi gradiendist koguti 70S, 50S, 30S subühikute ja 40S partiklite fraktsioonid. Ribosoomide puhvri vahetamiseks ja kontsentreerimiseks kasutati ultrafiltratsioonifiltri (Pierce Concentrator 20 ml/150K MWCO poori suurusega). Kontsentreerimiseks kasutati lauatsentrifuugiti ROTINA ja tsentrifuugiti vastavalt tootja poolt ettenähtud tingimustele 4°C juures 4500 rpm. Ribosoomide optilised tihedused mõõdeti lainepikkusel 260 nm, proovid külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

## 2.7 Ribosoomide töötlus NH<sub>4</sub>Cl-ga

Kolmkümmend ekvivalentset ühikut ( $A_{260}$ ) ribosoomide (70S, 50S ja 30S) lahustati 5 ml-s OV-10/1000 puhvris (20 mM Tris (pH=7,5); 1M NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM MgOAc; 6 mM  $\beta$ -merkaptopetaanol), laeti 5 ml „padjale“ (20 mM Tris (pH=7,5), 1M NH<sub>4</sub>Cl, 20 mM MgOAc, 20% (w/v) suhkur, 6 mM  $\beta$ -merkaptopetaanol) ning ultratsentrifuugiti SW41 rootoris  $\omega^2t=8,5 \times 10^{11}$  rad·s<sup>-1</sup>, 4°C juures. Soolaga „pestud“ ribosoomide sade lahustati 2 ml-s overlay-10 puhvris. Ribosoomid kontsentreeriti ultrafiltratsiooni meetodil vastavalt tootja poolsetele

soovitustele (Pierce Concentrators 20 ml/150K MWCO), Ribosoomide kontsentratsioon mõõdeti lainepikkusel 260 nm ning külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C juures.

## **2.8 Ribosoomide „koorimine“**

Kuni 50 ekvivalentsete ribosoomide ühikutele ( $A_{260}$ ) (50S, 30S) lisati koorimispuhvit ja inkubeeriti 10 min 40°C juures (ribosoomide kogused ja kontsentratsioonid on toodud tabelis 3). 50S subühiku R-alkude „koorimiseks“ lisati 2 M LiCl ja 30S subühikutele 1M LiCl ning segati „end-over-end“ segajal, üleöö, 4°C juures. Ribosoomid koguti tsentrifuugimisega 200000 g, 2 h (Beckman OPTIMA-XP lauaultratsentrifuugis). Supernatandist sadestati valgud atsetoonisga (1:4) ning säilitati -80°C juures. Kooritud ribosoomide sadet pesti 500 µl OV-puhvriga ja lahustati 50 µl-s OV-10 puhvis. Lahustamatute partiklite sadestamiseks tsentrifuugiti proove lauatsentrifuugis 13 prn, 30 min, 4°C juures. Ribosoomi subühikute optilised tihedused mõõdeti lainepikkusel 260 nm, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

## **2.9 Ribosomaalse RNA eraldamine fenool-kloroform meetodil**

Viiekümnele ( $A_{260}$ ) ekvivalentsele ühikule ribosoomidele lisati Tris-SDS puhvit (10 mMTris (pH=7,5); 1,1% SDS; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl) lõppruumalani 700 mikrolitrit. Proovidele lisati fenool (mahulises vahekorras 1: 1), segati intensiivselt vääristajal 5 min toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 13 krpm toatemperatuuril. Vesifaas tõsteti uude tuubi ning protsessi korrati kolm korda, mille järel lisati vesifaasile kloroformi (vahekorras 1:1). Lahust segati 5 min vääristajal toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 13 krpm, 5 min. Eraldati vesifaas ning rRNA sadestamiseks lisati 2,5 mahtu 96% etanooli. RNA sadestati -20°C, 20 min ja tsentrifuugiti 13 krpm, 15 min. RNA sadet pesti 1 ml 70% etanooliga ning tsentrifuugiti 13 krpm, 15 min. Etanool aspireeriti ning RNA sade lahustati 50 µl destilleeritud vees.

## **2.10 CsdAvalgu eraldamine**

### **2.10.1 Rakumassi kasvatamine**

*E. coli* tüve M15[pREP4] kompetentsetesse rakkudesse viidi sisse transformatsiooni teel plasmiid *pQE60-csdA* ning rakke inkubeeriti 30 min, 0°C juures, millele järgnes kuumaehmatus (1 min, 42°C juures) ning inkubatsioon 5 min, 0°C juures. Rakud külvati LB-

agar tardsöötmele ning kasvatati üleöö 37°C. Rakkumassi kasvatamiseks innokuleeriti 2 ml 2xYT söödet, kuhu lisati ampitsiliini (lõppkontsentratsiooniga 100µg/ml) ning kasvatati loksutis üleöö, 37°C juures. Üleöö kultuurist tehti 200 kordne lahjendus 2xYT söötmesse (lõppruumala 2000 ml) ning kultuuri kasvatati tiheduseni 0,4 ( $A_{600}$ ). Valgu ekspressioon indutseeriti IPTG-ga (lõppkontsentratsiooniga 1mM) ning jätkati kultuuri kasvatamist kuni optilise tiheduseni 1,9 ( $A_{600}$ ). Rakumass koguti tsentrifuugimise teel 20 min 4500 rpm ROTINA lauatsentrifuugis.

### **2.10.2 Valgu eraldamine afiinsuskromatograafia meetodi abil**

CsdAvalgu eraldamiseks suspendeeriti rakumass 10 ml puhvris A (500 mMNaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8,0); 20 mM imidasool), kuhu oli lisatud 1 mM PMSF. Rakukestade lõhkumiseks lisati lüsootsüüm (lõppkontsentratsiooniga 1mg/ml) ja DNA lagundamiseks DNase I (lõppkontsentratsiooniga 40U/ml). Lüsaati segati „end-over-end“ segajal 4°C juures. Rakkude lüüsimiseks lisati 500 mikrolitrit klaasliiva 1,5 ml lüsaadi kohta ja rakud homogeniseeriti PRECELYS homogenisaatori abil (6000 rpm, 3x60 s tsükkel; 4°C juures). Membraankromosomaalse kompleksi sadestamiseks tsentrifuugiti 13 krpm, 15 min, 4°C juures. Supernatant viidi uude tuubi ning filtreeriti läbi nitrotselluloosfiltrit (pööriläbimõõt 0,45 µm). CsdAvalk puhastati afiinsuskromatograafia meetodil, kasutades Ni-Sepharose<sup>TM</sup> 6 FastFlow (GE Healthcare) kolonni ja ÄKTA-PRIME/PRIMEVIEW kromatograafiasüsteemi (kolonn: läbimõõt 1,6 cm, kõrgus 7 cm, voolutuskiirus 1 ml/min). Lüsaat voolutati kolonnile ning millele järgnes pesutsükkel 100 ml puhvriga A (kuhu oli lisatud 1 mM PMSF). Kolonnile seondunud valk elueeriti puhvriga B (500 mMNaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8,0); 500 mM imidasool; fraktsiooni ruumala – 0,7 ml), kuhu oli lisatud 1mM PMSF. Valku sisaldavad fraktsioonid ühendati, millele järgnes valgulahuse puhvri vahetus ensüümi puhvriga vastu (1M KCl; 20 mMTris (pH=7,5); 0,2 mM EDTA, 2 mM DTT; 50% glütserool) kasutades ultrafiltratsiooni meetodit (MILLIPORE 30kD tsentrifugaalfilter). Filtrit tsentrifuugiti ROTINA lauatsentrifuugis 3500 g, 2h. Kontsentreeritud valgulahus külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C juures.

Afiinsuskromatograafia fraktsioone kontrolliti 10% SDS-PAAG geelelektroforeesiga. Igast piigi fraktsioonist võeti 5µl proov lisati 1:1 suhtes SDS proovi puhvrit, kuumutati 5 min 95°C juures ning kanti 10% SDS-PAAG geelile.

## 2.11 CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse test

CsdA valgu ATPaase analüüsi test viidi läbi puhvris AP-2 (30 mM TrispH=7,5; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 5 mM MgOAc). CsdA valgu eelinkubeeriti stimuleeriva substraadiga 5 min, 25°C juures. Seejärel lisati lahusesse radioaktiivse ATP (lõppkontsentratsioon 2 mM) ja [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATPsegu nii, et eriaktiivsus jääks vahemikku 9 – 12 DPM/pmol. Reaktsioon peatati 150  $\mu$ l STOP lahusega (adsorptsioonilahus) ajapunktidel 1 min, 5 min, 10 min ja 30 min. Proove segati vääristajal 10 min ning tsentrifuugiti lauatsentsifuugiga 13 krpm, 4°C juures, 5 min. 100  $\mu$ l supernatanti tõsteti uude tuubi, kuhu lisati 150  $\mu$ l adsorptsiooni lahust korduvaks adsorbeerimiseks ning protseduuri korrati, mille järel loendati 150  $\mu$ l-s supernatandis sisalduv radioaktiivsus kasutades radioaktiivsuse loendajad Tricarb2800.

Kõik katseseriad koosnesid neljast reaktsioonivariandist, mis sisaldasid järgnevaid komponente:

- 1) variant 1 – substraat (vaata tabel 3), AP-2 puhver, 2 mM ATP/[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP
- 2) variant 2 – substraat (vaata tabel 3), CsdA valk (7 pmol), AP-2 puhver, 2 mM ATP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP
- 3) variant 3 – CsdA valk (7 pmol), AP-2 puhver, 2 mM ATP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP
- 4) variant 4 (katse foon) – AP-2 puhver, 2 mM ATP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

CsdA ATPaasse aktiivsuse stimulatsiooni uurimiseks kasutatud substraadid on toodud tabelis 3.

**Tabel 3.** Substraadid ja nende kontsentratsioonid.

Substraat	Kontsentratsioon katsepunkti kohta <sup>1</sup>
mRNApU (150 - 200 nt)	190 pmol/ $\mu$ l
mRNA TOE2 (150 nt)	100 pmol/ $\mu$ l
mRNA A52 (40 nt)	140 pmol/ $\mu$ l
tRNA (73 - 94 nt)	352 pmol/ $\mu$ l
23S rRNA (2904 nt)	30 pmol/ 2 $\mu$ l
16S rRNA (1542 nt)	64 pmol/ 2 $\mu$ l
K – 30S <sup>2</sup>	35 pmol/ 2 $\mu$ l
K – 50S	28 pmol/ 2 $\mu$ l
SW – 30S <sup>3</sup>	15 pmol/ 2 $\mu$ l
SW – 50S	13 pmol/ 2 $\mu$ l
SW – 70S	14 pmol/ 2 $\mu$ l
30S – wt <sup>4</sup>	44 pmol/ 2 $\mu$ l

50S – <i>wt</i>	16 pmol/ 2µl
70S – <i>wt</i>	26 pmol/ 2µl
40S - $\Delta$ <i>csdA</i> <sup>5</sup>	17 pmol/ 2µl
50S - $\Delta$ <i>csdA</i>	14 pmol/ 3µl

---

<sup>1</sup> substraati kontsentratsioon iga ajapunkti kohta (1 min, 5 min, 10 min ja 30 min)

<sup>2</sup> K – „kooitud“ ribosoomid

<sup>3</sup> SW – soolaga pestud ribosoomid (*salt wash*)

<sup>4</sup> *wt* – ribosoomid metsiktüvest (*wild type*)

<sup>5</sup>  $\Delta$ *csdA* – ribosoomid tüvest *E. coli* JW2781 ( $\Delta$ *csdA*)

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1 Eksperimenditaalne strateegia

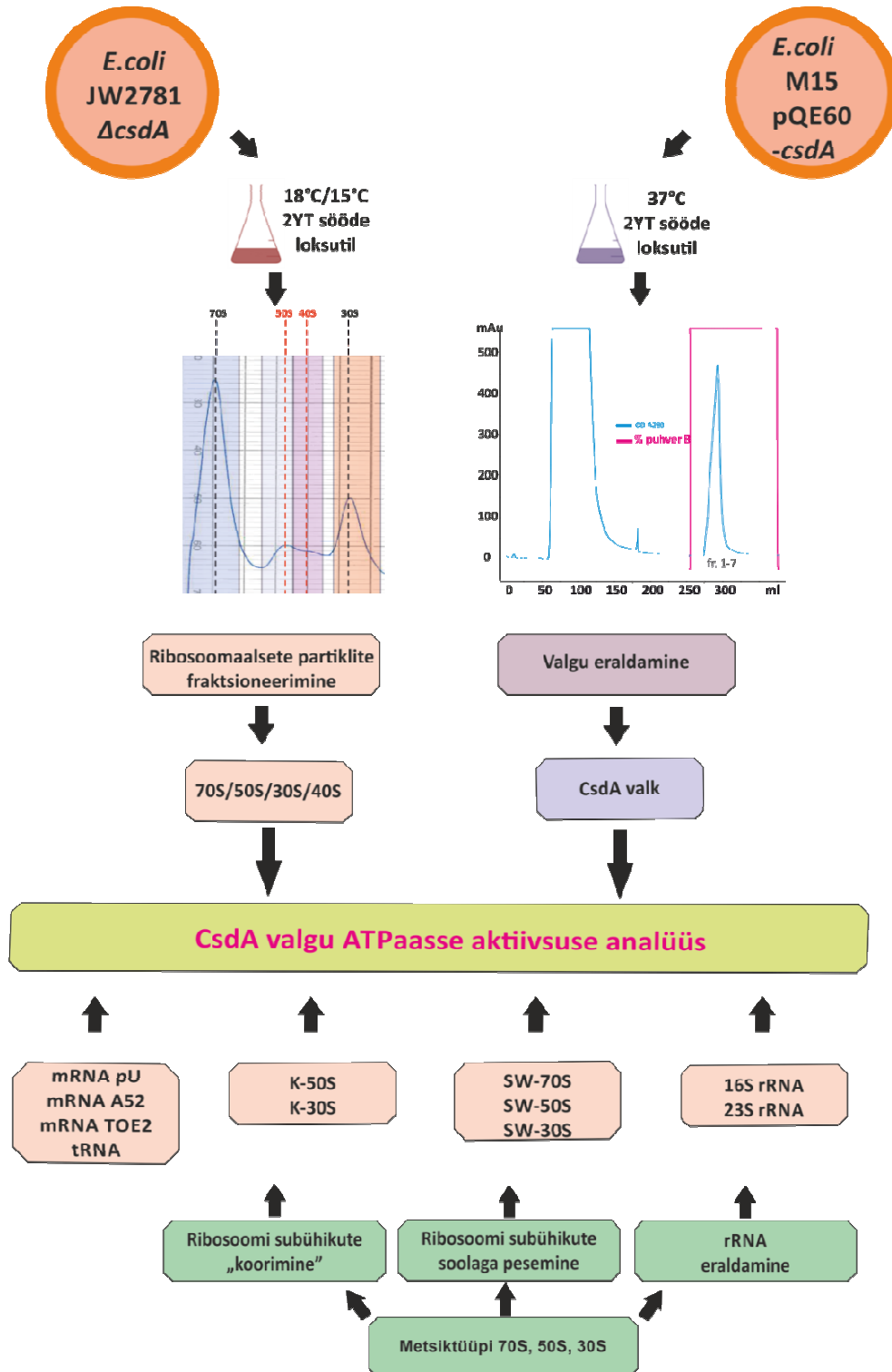
Käesoleva töö eesmärgiks oli *Escherichia coli* DEAD-box RNA helikaasi CsdA eraldamine ning valgu ATPaasse aktiivsuse analüüs. Töö peaesmärgiks oli analüüsida erinevate RNA ja RNA-valk substraatide võimet stimuleerida CsdA ATPaasset aktiivsust, mis võiks viia lähemale CsdA bioloogilise funktsiooni mõistmisele. Töö eksperimenditaalne strateegia on toodud joonisel 9. Töö koosnes kolmest põhietapist: (1) CsdA valgu puhastamine; (2) erinevate RNA ja RNA-valk (ribosoomid ja pre-ribosoomid) substraatide eraldamine ning (3) erinevate substraatide stimulaatorse võime analüüs *in vitro*.

CsdA valgu eraldamiseks kasutati pQE60 plasmiidis põhinevat ekspressioonisüsteemi (N-terminaalne His-märgis) ning valk puhastati standartsel Ni-afiinsuskromatograafia meetodil. Iseloomustamiseks helikaasi funktsionaalset aktiivsust valiti välja rida mudelsubstraate, millest osade kohta on katselisi andmeid, et need stimuleerivad CsdA helikaaset aktiivsust. Substraatide valikul lähtuti põhimõttest, et kaetud oleks võimalikult lai spekter erinevaid RNA ja RNA-valk substraate. Kasutati nii kommertsiaalselt saadavaid RNA substraate (tRNA, pU) kui ka sünteetilisi mRNA molekule. Eraldi substraatide klassi moodustasid ribosomaalne RNA ning bakteriaalsed ribosoomid nii natiivsel kui ka keemiliselt töödeldud kujul („LiCl kooritud“ ribosoomid; soolaga pestud ribosoomid; pre-ribosoomid).

Ribosoomide eelapartiklite eraldamiseks kasutati CsdA deletsioonitüve (Keio kollektsioon), mille puhul on näidatud, et madalatel temperatuuridel eksponentsealse faasi varases faasis akumulerevad 50S ja 40S, mis ei ole veel funktsionaalset aktiivsust saavutanud. Ribosoomid eraldati sahharoosi gradiendis tsentrifuugimise teel. Lisaks kasutati katsetes kõrge soolaga (LiCl) pestud ribosoomide, kuna on teada, et LiCl põhjustab kindla komplekti ribosoomi valkude lahtitulemise. Seega võiksid sellised ribosoomid imiteerida ribosoomi assambleerumise vaheprodukte ja seega olla CsdA helikaasi võimalikuks märklaudmolekuliks. Eraldi substraatide klassi moodustasid soolaga (1M NH<sub>4</sub>Cl) pestud ribosoomid.

Eksperimenditaalselt on näidatud, et sellised ribosoomid on funktsionaalselt aktiivsed. Samas eemaldab mõõdukalt kange soolalahusega ribosoomide töötlemine ribosoomidega seotud translatsioonifaktorid, mis võiksid muidu segada ATPaasse aktiivsuse analüüsi. Analüüsiks

kasutati aktiivsöe adsorptsioonil põhinevat katsemeetodikat, mis võimaldab mõõta ATP hüdrolüüsil vabaneva radioaktiivse gamma fosfaadi hulka lahuses.

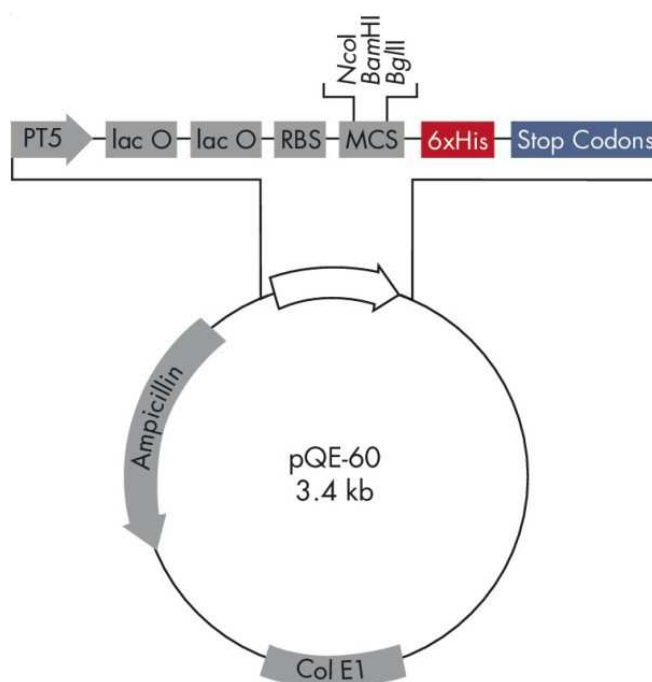


**Joonis 9.** Eksperimentaalse strateegia üldskeem. Töö käigus transformeerunud *E. coli* M15 [pQE60-csdA] tüvest eraldati CsdA valk, mis oli puhastatud afiinsuskromatograafia meetodi

abil. *E. coli* JW2781 ( $\Delta csdA$ ) tüvest eraldati erinevad ribosomaalsed partiklid. Metsiktüüpi ribosoomidest eraldati rRNA ja ribosoomid töödeldi kõrge kontsentratsiooniga soolalahusega. Puhastatud CsdA valk ja eraldatud RNA ja RNA-valk kompleksid kasutati substraatidena stimulaatorse võime analüüsimiseks *in vitro*.

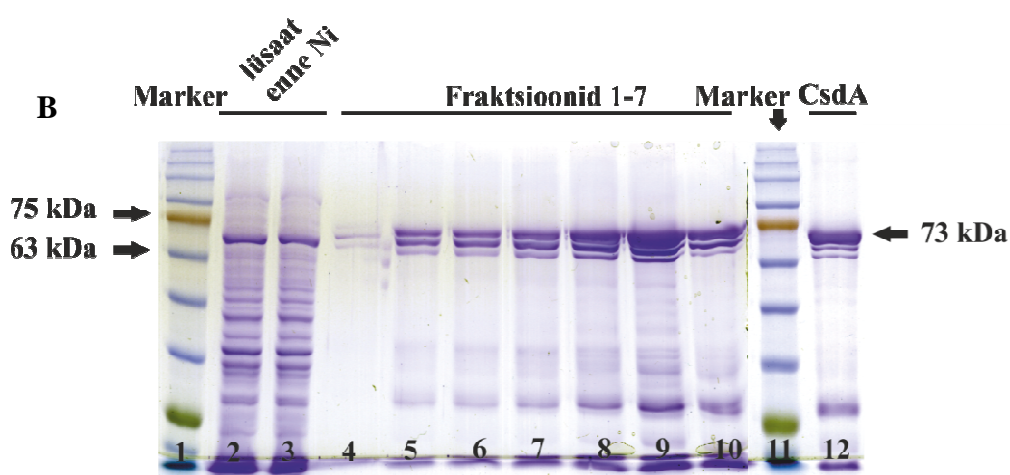
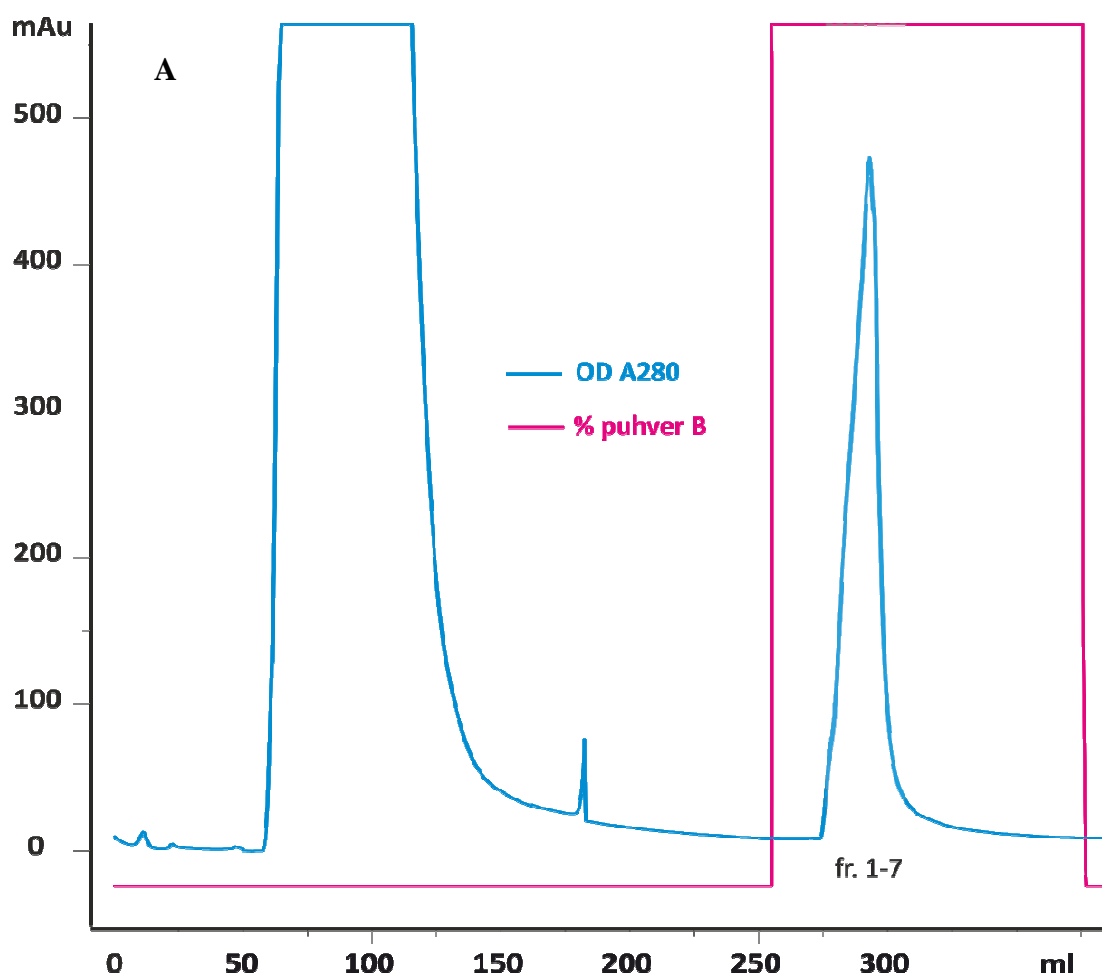
### 3.2 CsdA valgu eraldamine ja puhastamine

CsdA valgu eraldamiseks kasutati *E. coli* tüve M15 [pREP4], mis sisaldab kahte LacI repressori geeni ja kanamütsiini resistentsust ( $Km^R$ ) tagavat plasmidi *pREP4* (joonis 10) (Rapley, 2000). *E. coli* M15 [pREP4] transformeeriti plasmiidiga *pQE60-csdA*, mis kodeerib valku CsdA. Bakterikultuuri indutseeriti 1 mM IPTG-ga optilises tiheduses 0,4 ( $A_{600}$ ) nelja tunni jooksul temperatuuril 37°C. Indutseerimise käigus seondub induktor repressoriga, käivitades *csdA* geeni transkriptsiooni (Alberts *et al.*, 2008). Neis rakkudes ekspresseeritakse vajalik valk CsdA, mille C-terminaalses osas paikneb His<sub>6</sub> järjestus. pQE60 plasmiidis on kuus *his* koodonite järjestust, mis asuvad enne stoppkoodonit (Qiagen, 2001).



**Joonis 10.** Plasmiid pQE60. Plasmiid sisaldab optimiseeritud promotori: operonis on T5 promootor (PT5), mida tunneb ära RNA polümeraas ja kaks *lac* operaatori järjestust, mis suurendavad repressiooni. *RBS* – ribosoomide seondumise sait (*ribosome binding site*). *MCS* – multikloneerimisjärjestus (*multiple cloning site*). *6xHis* – histidiin valkude järjestus. *Col E1* – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*), ampitsiliin resistentsuse kodeerib *bla* geen.

Afiinsuskromatograafia põhineb valgu spetsiifilistel biokeemilisel interaktsioonidel: valgu ja ligandi vastastikmõjul (Bryan *et al.*, 1975). Statsionaarse faasina ehk maatriksina kasutati Ni-Sepharose<sup>TM</sup> 6 FastFlow (GE Healthcare), millele on seondunud ligand nikkel-nitriloatsetaat (Ni-NTA). Statsionaarse faasiga seotud nikkel-ligand omab spetsiifilist afiinsust valgu C-terminaalses otsas olevate histidiini jääkide suhtes. Kolonnile laeti rakulüsaat ning CsdA valk seondus Ni-agaroos kolonnile histidiin jääkide kaudu. Kolonni pesti A puhvriga (20 mM imidasool) vabanemaks mitteseondunud valkudest. Valgu elueerimiseks voolutati kolonni elueerimispuhvriga B (500 mM imidasool). Madalama imidasooli kontsentratsiooni (20 mM) puhul jääb histidiini jääki sisaldav valk kolonniga seotuks. Imidasooli kontsentratsiooni tõustes (500 mM) elueeruvad kolonnilt His<sub>6</sub>-märgistatud valgud. Joonisel 8A on näidatud C-terminaalse His<sub>6</sub>-märgisega valku. CsdA valgu puhastamise kromatogramm. Kõikides valgu puhastamise etappidest võeti proovid ning neid analüüsiti 10% SDS-PAAG geelelektroforeesil (fraktsioonid 1 – 7) (joonis 11).



**Joonis 11.** CsdA valgu puhastamise kromatogramm (A). Valk puhastati Ni-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow kolonnis (GE Healthcare) kasutades ÄKTA-PRIME/Primeview süsteemi. Punase joonega on tähistatud B puhvri (500 mM NaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8,0); 500 mM imidasool) kolonnile kandmine (100% puhver B). Sinise joonega näitab mõõdetud optilist tihedust (mAu, A<sub>280</sub>). Sinises foonis on näidatud eraldatud valgu fraktsioonid (1 – 7), mida

analüüsiti geelelektroforeesil. **(B)** CsdA valgu analüüs 10% SDS-PAAG geelelektroforeesil. Geelile kanti 5 µl proovi afiinsuskromatograafia fraktsioonidest 1 – 7. Eraldi rajal on rakulüsaat enne kolonnile kandmist (rajad 2 ja 3) ning CsdA valk peale puhvri vahetust ja kontsentreerimist ultrafiltratsiooniga (rada 12).

Elektroforees analüüsil on selgel detekteeritav üks mažoorne valk suurusega ligikaudu 73 kD, mis vastab CsdA valgu molekulmassile (73 kD). Geelipildil on näha ka lühema pikkusega valguprodukte, mis moodustavad ligikaudu 10% totaalsest valgu hulgast. Kas tegemist on CsdA puhastamise käigus tekkinud laguproduktidega või pigem mittespetsiifiliselt seondud valkudega ei saa antud meetodi põhjal otsustada. Kuna valgu preparatsioon sisaldas ligikaudu 10% madalama molekulmassiga valku, viidi läbi lisapuhastuse etapp, milleks valiti geelfiltratsiooni. Geelfiltratsiooni tulemusena saadi 99% puhtusega valgupreparatsioon, mis osutus inaktiivseks (tulemusi ei ole näidatud). Seega kasutati edaspidises töös üheetapiliselt puhastatud CsdA valku, mis oli funktsionaalselt aktiivne. Võimalik, et CsdA valk on oma olemuselt mittestabiilne ning kahekordse puhastamise käigus valk inaktiveerus. Elektroforeesanalüüsi põhjal võib väita, et CsdA valgu eraldamisega puhastuvad välja lisaks veel kaks tundmatut valku, mis moodustavad ligikaudu 5% totaalsest valgupreparatsioonist.

### **3.3 Valgu ATPasse aktiivsuse analüüs**

CsdA on RNA helikaas, mis harutab lahti RNA kaksikahelalisi struktuure, milleks kasutatakse ATP hüdrolüüsil vabanevat energiat. Kuna CsdA valgu substraat ei ole teada, siis ei ole ka otseselt võimalik analüüsida valgu helikaasset aktiivsust. Samas võib valgu aktiivsuse hidamiseks kasutada kaudset meetodit, mis seisneb CsdA valgu ATPasse aktiivsuse testimises. On teada, et CsdA omab mittespetsiifilist ATPaasset aktiivsust ka ilma spetsiifilise substraadiga seondumata (Rocak ja Linder, 2004). Teisest küljest on näidatud, et erinevad RNA substraadid on võimelised valgu ATPaasset aktiivsust olulisel määral stimuleerima (Bizebard *et al.*, 2004). Selleks, et analüüsida eraldatud valgu funktsionaalsust, viidi läbi seeria katseid, kus kasutati erinevaid valgu helikaasset aktiivsust stimuleerivaid substraate ja mõõdeti nende stimuleerivat mõju ATPassele aktiivsusele.

ATP hüdrolüüsi analüüsi meetodina kasutati aktiivsöe adsorptsiooni meetodit. Reaktsiooni esimeses etapis eelinkubeeriti valku uuritava substraadiga. Reaktsioon alustati ATP lisamisega ning peatati erinevatel ajapunktidel STOP lahuse (aktiivsöe adsorptsioonilahus)

lisamisega, mis seob reaktsioonisegus sisalduvad komponendid välja arvatud vabanenud anorgaanilise fosfori. Hüdrolüüsitud ATP hulk mõõdeti radioaktiivsuse loendajaga ning eriaktiivsuse põhjal arvutati hüdrolüüsitud ATP molekulide hulk pikomoolides. Katsetes analüüsiti kahte tüüpi RNA substraatide CsdA-d stimuleerivat toimet: (1) RNA molekulid ja (2) RNA-valk kompleksid.

### 3.3.1 mRNA ja tRNA

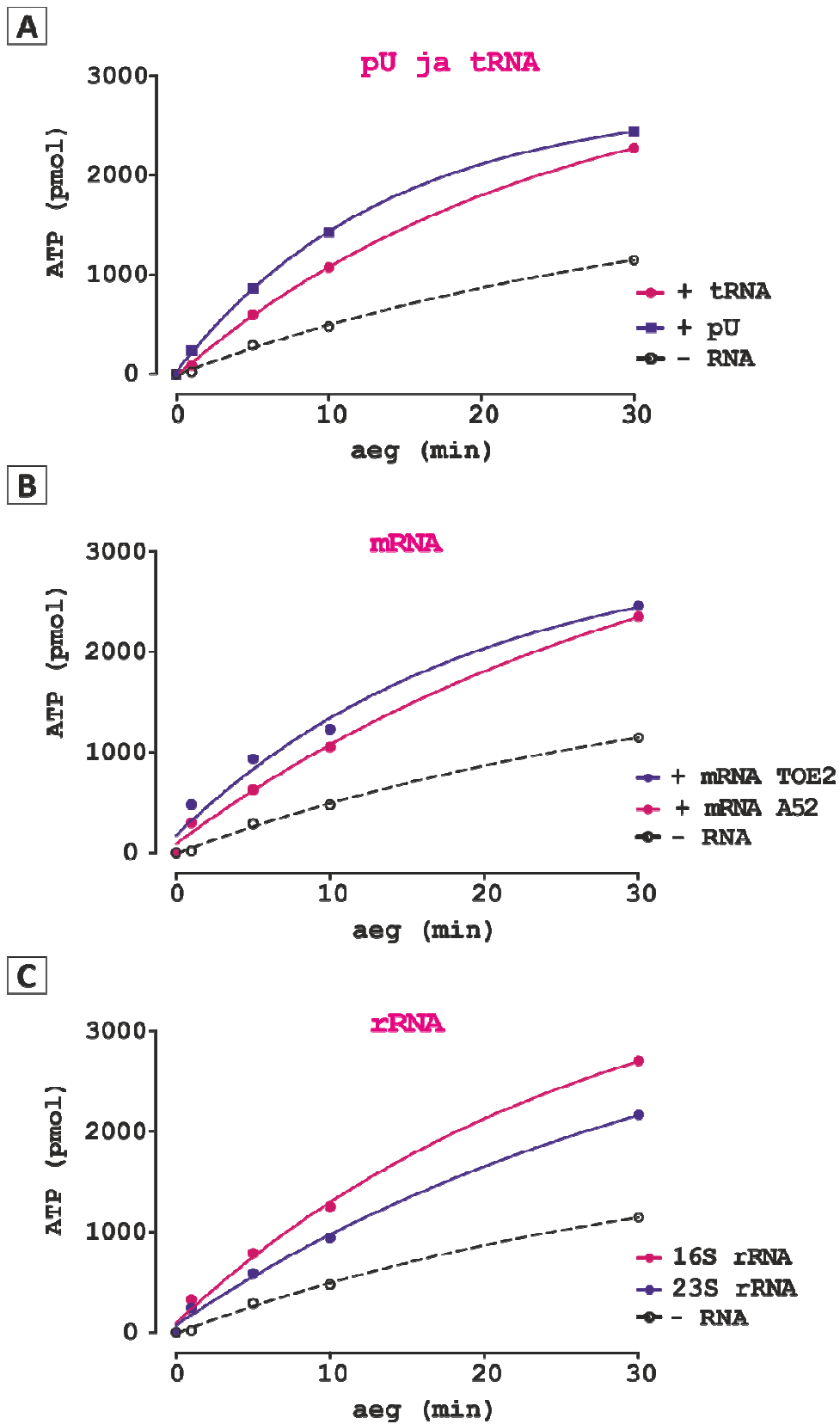
Pilootkatses vaadeldi juba varasematest uuringutest teadaolevat stimulaatorset mõju omavaid substraate, milleks valiti *E. coli* totaalne tRNA ja polü(U) RNA homopolümeer. Bizebard ja kolleegide (2004) poolt on näidatud, et CsdA valk on võimeline iseseisvalt hüdrolüüsima ATP-d, samas oli valgu ATPaasne aktiivsus oluliselt kõrgem kui reaktsiooni lisati erinevaid RNA substraate. Niisiis on CsdA valgu ATPaasne aktiivsus stimuleeritav mitmete RNA molekulide poolt: polü(U) ja tRNA (Bizebard *et al.*, 2004). Teises etapis kasutati sünteetilist mRNA substraate, mille stimuleeritav mõju pole varem kirjeldatud. Igas katses on tehtud kontroll-seeria, mis sisaldab ainult CsdA valku (joonis 12).

Polü(U) on uridiinidest koosnev RNA homopolümeer, mille pikkus on sõltuvalt tootjast vahemikus 150 – 200 nukleotiidi (kuna homopolümeeri pikkus varieerub, siis on selle puhul tegemist seguga, kus on erineva pikkusega RNA molekulid). tRNA on väike struktureeritud ribonukleiinhape (73 – 94 nt), millel sekundaarstruktuuris on kolm juuksenõelastruktuuri (Moore ja Steitz, 2011).

Polü(U) mRNA ja tRNA ATPaasest aktiivsust stimuleeriv toime on näidatud joonisel 11. Selgus, et polü(U) ja tRNA lisamine reaktsiooni suurendab hüdrolüüsitud ATP hulka ligikaudu kaks korda võrreldes kontrolliga, kuhu substraate ei lisatud (joonis 12A). Seega võib pilootkatse alusel väita, et eraldatud CsdA valk on funktsionaalselt aktiivne. Lähtudes sellest viidi läbi katseseeriad, kus stimuleeriva molekulina kasutati kahte sünteetilist mRNA molekuli: mRNA A52 ja TOE2, mis on natiivse mRNA analoogid. A52 ja TOE2 mRNA-d olid sünteesitud T7 polümeraasiga ja puhastatud afiinsuskromatograafia teel (oligo dT tselluloos kromatograafia teel A. Liiv'i poolt). A52 mRNA pikkus on 40 nukleotiidi ning selle 3' otsas on polü-A-saba. TOE2 mRNA on struktureerimata mRNA, mille pikkus on 150 nukleotiidi. Graafiku kohaselt on mRNA ja tRNA substraatide puhul hüdrolüüsitud ATP hulk sarnane. Kolmekümeminutilise punktis hüdrolüüsitakse 2340 pmol ja 2460 pmol ATP substraatidega vastavalt A52 mRNA ja TOE2 mRNA (joonis 12B).

### 3.3.2 16S rRNA ja 23S rRNA

Katseliselt on näidatud, et CsdA valgu puudumine põhjustab ribosoomide biogeneesis vahepartiklite teket, mis on tingitud assambleerumise aeglustumisest (Peil *et al.*, 2008). Samas ei ole teada, mis on CsdA substraadiks *in vivo*: kas ribonukleiinhape-valgu kompleks ehk pre-ribosomaalne partikkel või puhas rRNA. Seega puuduvad katseandmed selle kohta, millises assambleerumise etapis võiks CsdA valk oluline olla. Lähtuvalt sellest võeti järgnevalt analüüsi alla ribosomaalse RNA stimulaatorse võime analüüs. Eemärgiks oli analüüsida 23S ja 16S rRNA võimet stimuleerida CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Selleks puhastati funktsionaalsetest 50S ja 30S subühikutest 16S rRNA ja 23S rRNA kasutades fenool-kloroform ekstraheerimise meetodit. Katsetulemused on esitatud joonisel 12, mille põhjal võib väita, et nii 23S kui 16S rRNA on võimelised stimuleerima CsdA ATPaasset aktiivsust ligikaudu kaks korda kui valk ilma rRNA stimulatsioonita.



**Joonis 12.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus RNA substraatidega. ATPaasse aktiivsuse mõõtmiseks kasutati Perkin Elmer Tri-Carb 2800 TR radioaktiivsuse loendajat. Reaktsiooni

aeg 30 minutit. Proovid mõõdeti ajapunktidel 1 min, 5 min, 10 min ja 30 min. Kontrollseeria ei sisaldanud CsdA valku ( - RNA ). (A) 30-minutilises ajapunktis polü(U) (kontsentratsioon 190 pmol/μl) ja tRNA (kontsentratsioon 352 pmol/μl) substraatidega hüdrolüüsitakse 2340 pmol ja 2460 pmol ATP vastavalt. (B) 30. minutil substraatiga A52 mRNA (kontsentratsioon 140 pmol/μl) hüdrolüüsitakse 2340 pmol ATP, TOE2 mRNA (kontsentratsioon 100 pmol/μl) substraatiga 2460 pmol. (C) 30-minutilises ajapunktis 16S rRNA (kontsentratsioon 64 pmol/ 2 μl) ja 23S rRNA (kontsentratsioon 30 pmol/ 2 μl) substraatidega hüdrolüüsitakse 2703 pmol ATP ja 2164 pmol ATP vastavalt.

Saadud tulemustest RNA substraatidega järeldub, et puhastatud valgu preparatsioon on funktsionaalselt aktiivne. Võrreldes omavahel erinevate RNA substraatide võimet stimuleerida ATPaasset aktiivsust võib väita, et kõik katsetes kasutatud substraadid omavad positiivset efekti ATP hüdrolüüsilie. Jooniselt 12 on näha, et CsdA valgu ATP hüdrolüüsi kineetika on erinevate RNA substraatide puhul suhteliselt sarnane. ATP hüdrolüüsi platooväärtus jäi üldjuhul vahemikku 2000 – 2500 pmol (30 minuti ajapunkti järgi). Samas ei ole antud substraatide puhul võimalik väita, et CsdA stimulatsioon sõltuks olulisel määral RNA substraadi identiteedist. Ribosomaalne RNA käitus antud katseseerias sarnaselt teiste RNA substraatidega, misstõttu ei saa väita, et CsdA on eelkõige ribosoomi-spetsiifiline helikaas. Võrreldes DbpA helikaasiga, mis on DEAD-box perekonna kuuluv valk, ei ole CsdA kohta seniajani andmeid spetsiifilisest interakeerumisest RNA substraatidega.

Erinevalt DbpA helikaasist, mille kohta on teada, et ta spetsiifiliselt seondub 23S rRNA lingule 92 (*stem-loop* 92) ning stimuleerib valgu ATPaasset aktiivsust, ei saa seda väita CsdA helikaasi kohta (Sharpe Elles *et al.*, 2009).

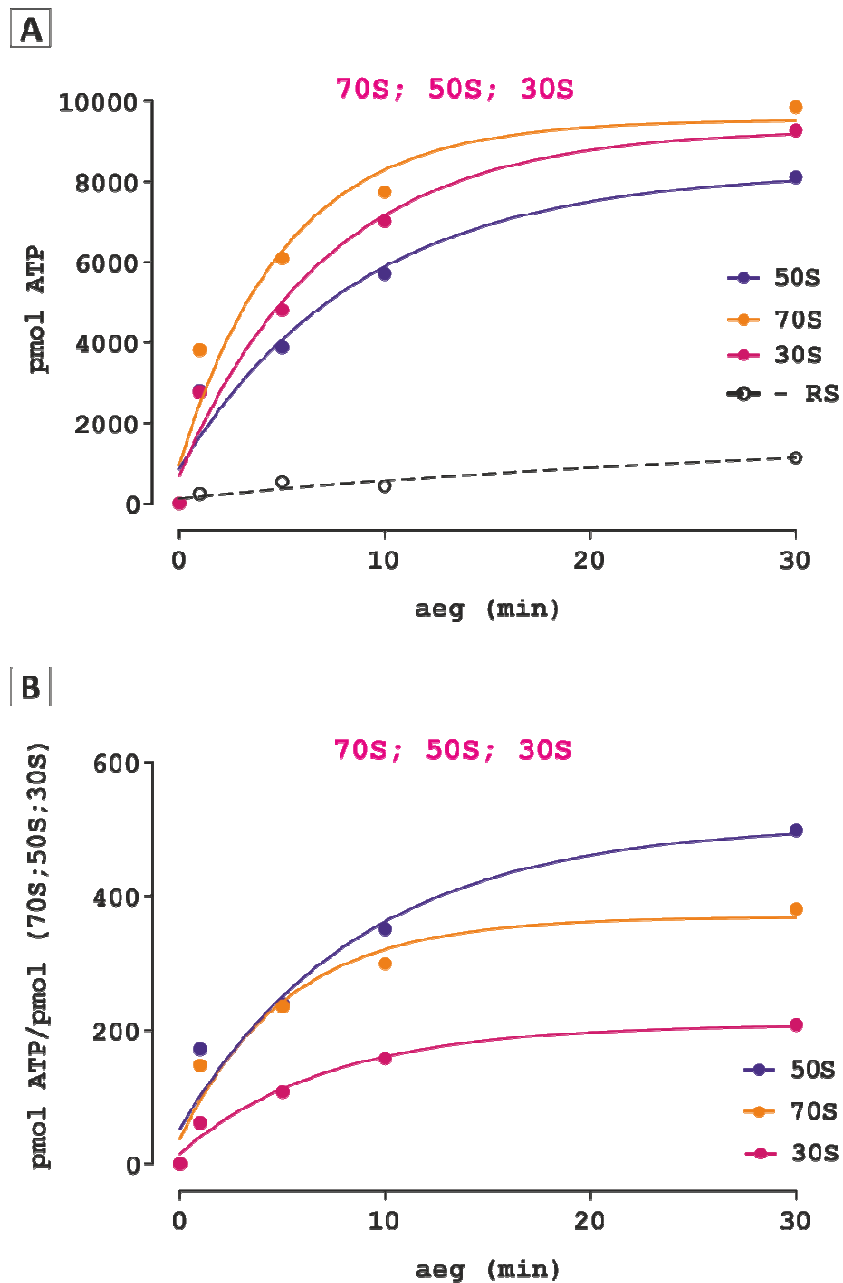
### **3.3.3 Ribosoomid (70S, 50S ja 30S)**

Kehtiva hüpoteesi kohaselt on CsdA valk seotud ribosomide assambleerumisega *in vivo*. Samas ei ole teada, millise subühikuga CsdA interakteerub. Kuigi üldlevinud arusaama kohaselt on CsdA vajalik eelkõige 50S subühiku biogeneesil, ei saa välistada selle osalemist ka 30S subühiku biogeneesil.

Tulenevalt sellest analüüsiti CsdA valgu ensümaatilist aktiivsust makromolekulaarse kompleksitega – ribosoomiga (70S, 50S ja 30S). Esimese lähendusena kasutati metsiktüve ribosoomi (joonis 13). Graafikutel on ATP hüdrolüüs väljendatud totaalse hüdrolüüsitud

hulgana pikomoolides (joonis 13A) kui ka ATP/ribosoomide pikomoolide suhtes (joonis 13B).

Selgus, et kõige suuremat stimuleerivat toimet omasid antud katseseerias 50S subühikud. 70S ribosoomi stimulatsioon moodustas ligikaudu 75% vastavast 50S näitajast. 30S subühiku puhul oli vastavate näitajate vahe ligikaudu kahekordne.

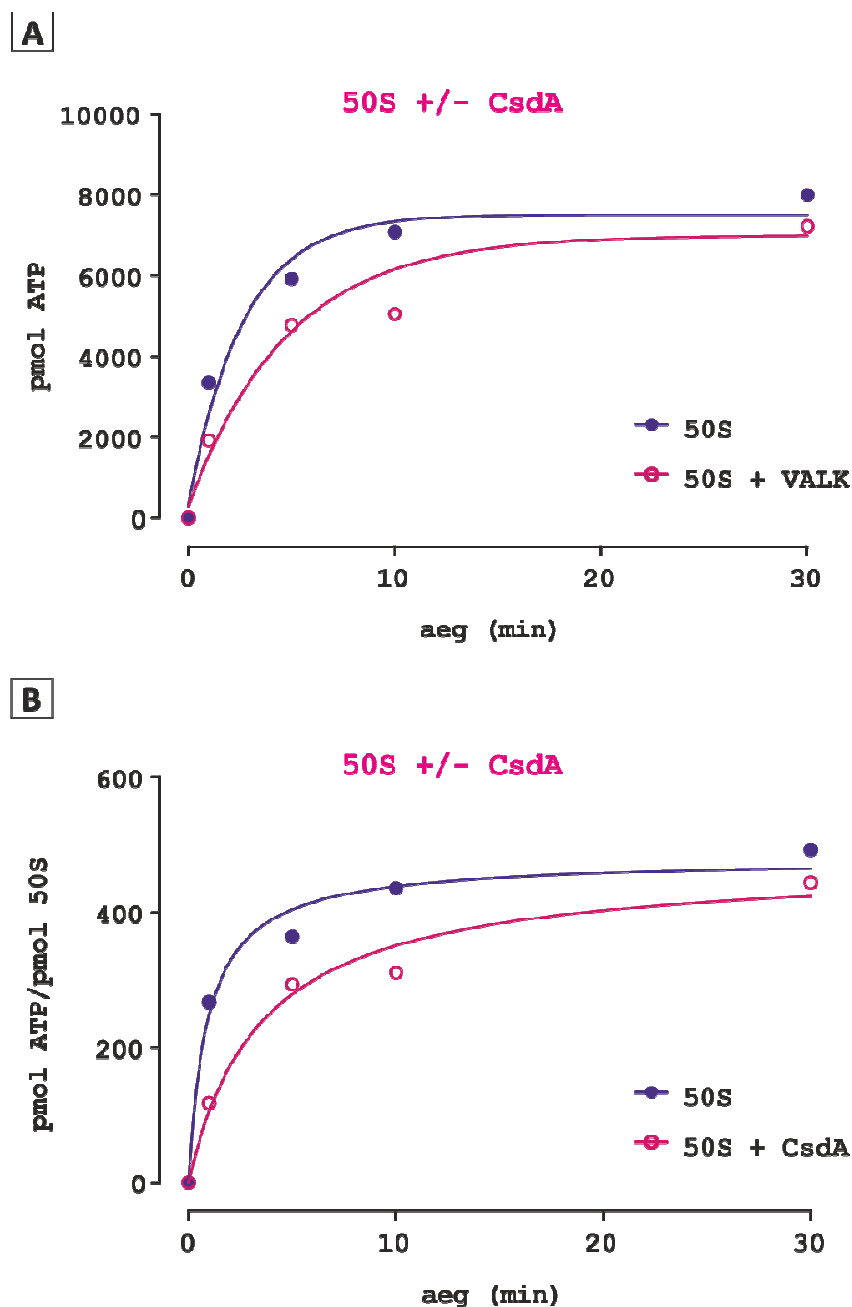


**Joonis 13.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus metsiktüüpi 70S, 50S ja 30S ribosoomidega stimuleerimisel. Reaktsiooni aeg 30 minutit. (A) Totaalne hüdrolüüsitud ATP hulk

pikomoolides. 30-minutilises ajapunktis 70S (26 pmol/ 2 $\mu$ l), 50S (16 pmol/ 2 $\mu$ l) ja 30S (44 pmol/ 2 $\mu$ l) subühikutega hüdrolüüsi 9800 pmol, 8100 pmol ja 9277 pmol ATP vastavalt. Kontrollseeria (- RS) sisaldas CsdA valku ning selle ATP hüdrolüüsi hulk vastab 1139 pmol-le. **(B)** ATP hüdrolüüs ATP/ribosoomide pikomoolide suhtes. 30-minutilises ajapunktis hüdrolüüsitud ATP ja 70S, 50S ja 30S pikomoolide ja suhe on 380, 497 ja 207 ühikut vastavalt.

Graafikujärgselt on kõikide ribosoomide puhul märgata väga efektiivne ATP hüdrolüüs. Samas selgus katseandmete analüüsil, et proovid ilma valguta ehk fooni proovid näitasid väga kõrget hüdrolüüsitud ATP hulka (andmeid ei ole näidatud).

Mittespetsiifilise fooni määramiseks tehti kontrollkatse, mis sisaldas ainult ribosoomi ja ATP, aga ei sisaldanud CsdA valku (joonis 14). Nimelt oli kolmekümneminutilises punktis 50S subühiku foon (ilma valguta) 8000 pmol. Samas seeria, kus katse sisaldas ainult ATP, ei täheldatud ATP hüdrolüüsi suurenemist ajas. Seega võib järeldada, et ATP hüdrolüüsi katsetes, kus kasutati ribosoomi ja selle subühikuid (joonis 13), ei sõltunud ATP hüdrolüüsi aktiivsus detekteeritaval määral valgu lisamisest reaktsiooni. Järelikult on ribosoomidega stabiilselt assotseerunud tundmatu valguline faktor, mille ATP hüdrolüüsi võime on väga suur.



**Joonis 14.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus 50S subühikuga (26 pmol/ 2 $\mu$ l). **(A)** 50S subühikute totaalne hüdrolüüsitud ATP hulk on 8000 pmol. CsdA valgu juuresolekul hüdrolüüsitakse pikomoolides on 7220 pmol. **(B)** Hüdrolüüsitud ATP ja 50S subühiku pikomoolide suhe on 490 ühikut ja CsdA valgu juuresolekul on 440 ühikut.

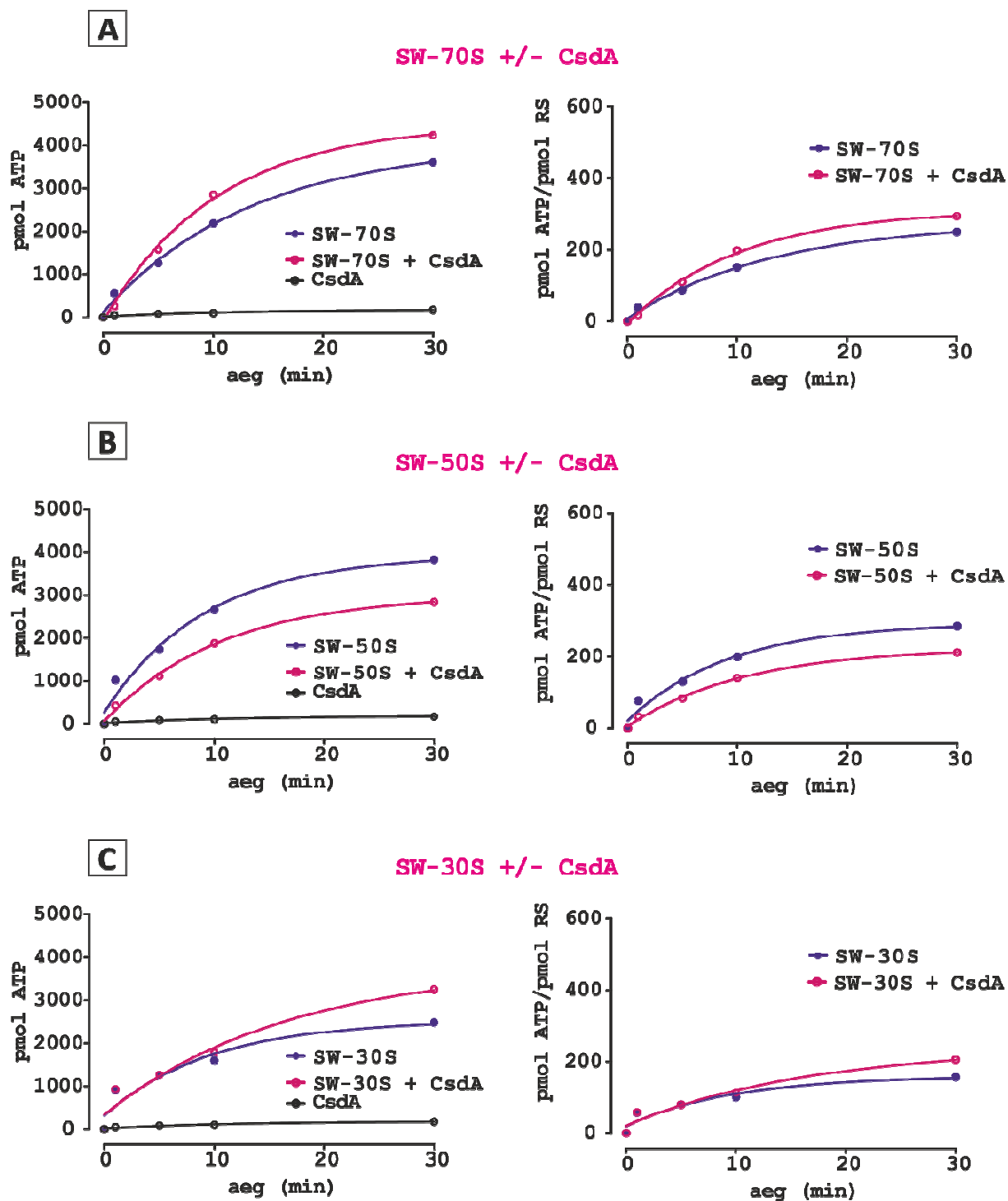
Joonis 14 näitab, et 50S subühik ilma valguta hüdrolüüsib ATP-d paremini kui CsdA helikaasiga. Sellest järeldub, et ribosoom käitub ise nagu ATPaas ning sellest on tingitud ka kõrge mittespetsiifiline foon (ilma valguta katse). Vabanemaks mittespetsiifilisest ATP

hüdrolüüsist tingitud foonist, otsustati järgnevas katseseerias kasutada ribosoomi, mida oli eelnevalt töödeldud  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ja  $\text{LiCl}$ -ga.

### **3.3.4 Soolaga „pestud” ribosoomid**

Esmalt otsustati kasutada ribosoomi puhastamise klassikalist meetodit, mis seisneb ribosoomide „pesemises“ kõrge kontsentratsiooniga soolas. Esimese lähendusena pesti 70S, 50S ja 30S üks kord 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -ga. Ammooniumkloriidi kõrge kontsentratsioon võimaldab vabaneda ekstraribosomaalsetest faktoritest ja valkudest, mis sahharoos gradiendis tsentrifuugides jäävad ribosoomiga stabiilselt seotuks (Spirin ja Gavrilova, 1971).

Vaatamata sellele, et ribosoomide „pesemine“ vähendas mittespetsiifilist hüdrolüüsi kuni kaks korda (katse ilma valguta), omasid „pestud“ ribosoomid endiselt mittespetsiifilist ATP hüdrolüüsi võimet (võrdle joonis 13 (70S/50S/30S) ja joonis 15 (SW-ribosoomid) parempoolsed graafikud). Probleemi lahenduseks võiks olla ribosoomide korduv ammooniumkloriidiga „pesemine“, kuigi sellel juhul on olemas oht, et lisaks ekstraribosomaalsetele valkudele dissotseeruvad ribosoomist ka nõrgemalt seostunud r-valgud.



**Joonis 15.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus soolaga „pestud“ ribosoomidega. (A) SW-70S ribosoomid (14 pmol/ 2 $\mu$ l). (B) SW-50S subühikud (13 pmol/ 2 $\mu$ l). (C) SW-30S subühikud (15 pmol/ 2 $\mu$ l). Vasakpoolsetel graafikutel on totaalne hüdrolüüsitud ATP hulk pikomoolides. SW-70S, SW-50S ja SW-30S ribosoomidega hüdrolüüsitakse 3600 pmol, 3800 pmol ja 2400 pmol vastavalt. Valgu juuresolekul SW-70, SW-50 ja SW-30 ribosoomidega ATP hulk on

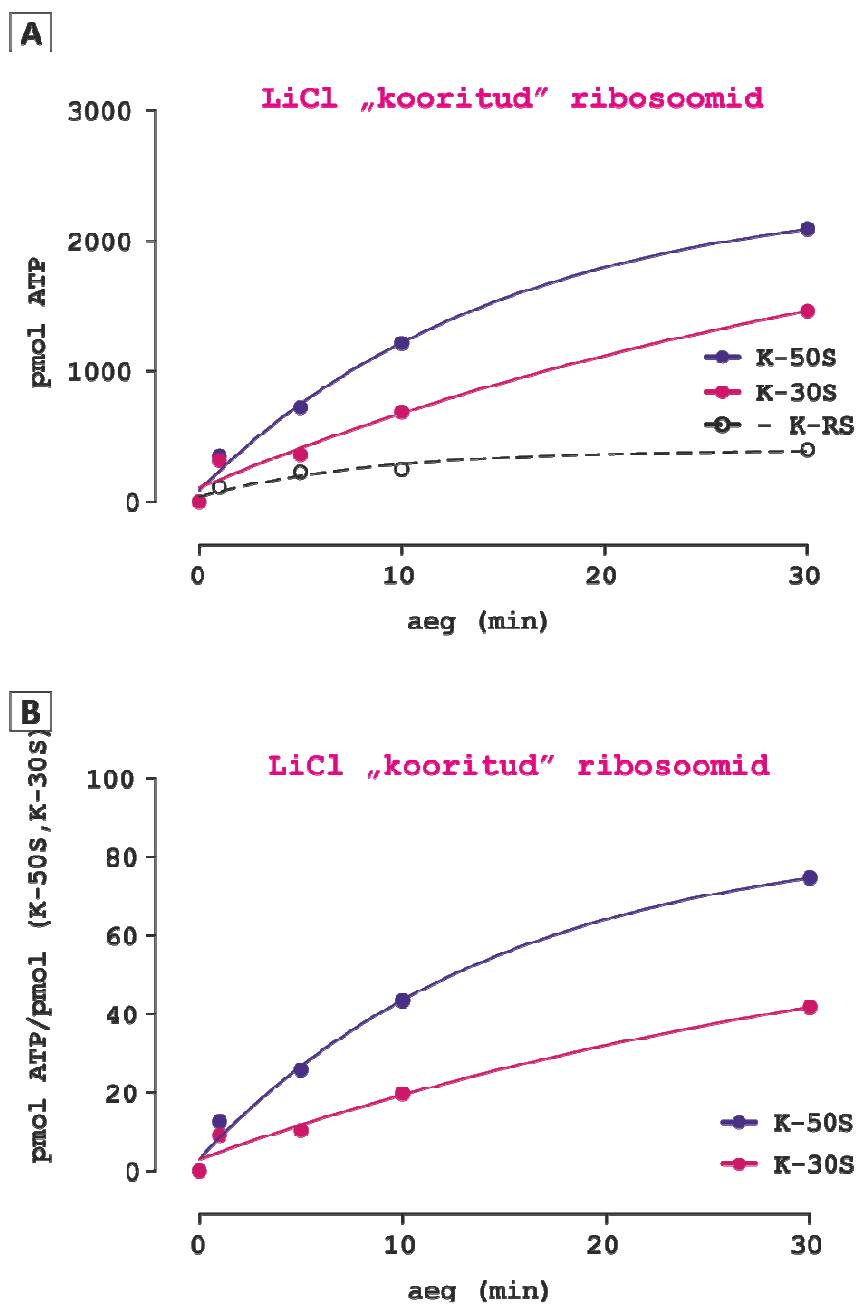
4200 pmol, 2835 pmol ja 3200 pmol vastavalt. Kontrollseerias (sisaldab CsdA valku) ATP hüdrolüüs 30-minutilises ajapunktis on 200 pmol. Parempoolsetel graafikutel on ATP/SW-ribosoomide pikomoolide suhe. Hüdrolüüsitud ATP ja SW-70S, SW-50S ja SW-30S pikomoolide suhe on 250, 280 ja 150 ühikut vastavalt. Valgu juuresolekul moodustab hüdrolüüsitud ATP ja SW-70S, SW-50S ja SW-30S pikomoolide suhe vastavalt 290, 211 ja 200 ühikut.

Tulemustest järeldub, et soolaga „pestud“ 70S ribosoomid ja 50S subühikud (SW-70 ja SW-50 vastavalt) stimuleerivad valgu ATP hüdrolüüsi sarnasel määral (200 – 300 pmol/pmol vahel ribosoomi kohta). Soolaga puhastatud 30S subühiku (SW-30) puhul on ATP hüdrolüüs natuke nõrgem ehk 150 – 200 pikomooli vahel. Graafikujärgselt on SW-70 ja SW-30 proovide ATP hüdrolüüsi signaal tugevam CsdA valgu juuresolekul (joonis 15A, 1C). SW-50S puhul on näha vastupidist efekti: SW-50 iseeneselt stimuleerib ATP hüdrolüüsi paremini, kui CsdA valguga. Pole teada, mis võiks põhjustada sellist tendentsi. Seega võib väita, et juhul kui soolaga “pestud” 70S ribosoomidele ja 30S subühikutele on lisatud valk, siis nendega ATP hüdrolüüs on efektiivsem kui ilma valgu lisamiseta seerias (joonis 15A ja C, parempoolsed graafikud). Hüdrolüüsitud ATP hulga suurenemine nendes proovides viitab sellele, et nii 70S ribosoomide kui ka 30S subühikud on võimelised teatud määral stimuleerima CsdA ensümaatilist aktiivsust.

### 3.3.5 Soolaga “kooritud” ribosoomid

Otsides vastust küsimusele, millises biogeneesi etapis CsdA valk võiks osaleda, analüüsiti helikaasi ATPaasset aktiivsust ribosoomidega, mis võiksid peegeldada metsiktüüpi ribosoomide eellaste iseloomu (joonis 16). Selleks valmistati LiCl-ga „kooritud“ ribosoomid, millistel on osa valke kange soolaga eemaldatud (umbes 50% ribosomaalsetest valkudest).

Ribosoomide struktuurist moodustavad r-valgud ühe kolmandiku ning selle etapi eesmärgiks oli „koorida“ ehk eemaldada osa r-valkudest (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Katses kasutati kõrge kontsentratsiooniga LiCl soolaga „pesemist“, mis põhjustab nõrgalt seotud ribosoomi valkude dissotseerumist ribosoomidest (Moore *et al.*, 1975). 50S puhul kasutati 2M LiCl ja 30S puhul 1M soola. Peale „koorimist“ 50S subühikuga jäävad seotuks valgud L1, L2, L5, L6, L9, L10, L11, L15, L16, L18 ja L23. Väiksemas subühiku struktuuris jäävad peale „koorimist“ järgmised r-valgud: S2, S3, S5, S9, S10, S13, S14 ja S20 (Pulk *et al.*, 2010).



**Joonis 16.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus „kooritud“ 50S, 30S subühikutega (K-50S, K-30S vastavalt). (A) Totaalne hüdrolüüsitud ATP hulk „kooritud“ 50S (28 pmol/2  $\mu$ l) ja 30S (35 pmol/ 2 $\mu$ l) ribosoomidega on 2090 pmol ja 1460 pmol. Kontrollseerias (sisaldab CsdA valku) oli ATP hüdrolüüsi hulk 200 pmol. (B) Hüdrolüüsitud ATP ja K-50S, K-30S subühikute pikomoolide suhe oli vastavalt 74 ja 40 pmol.

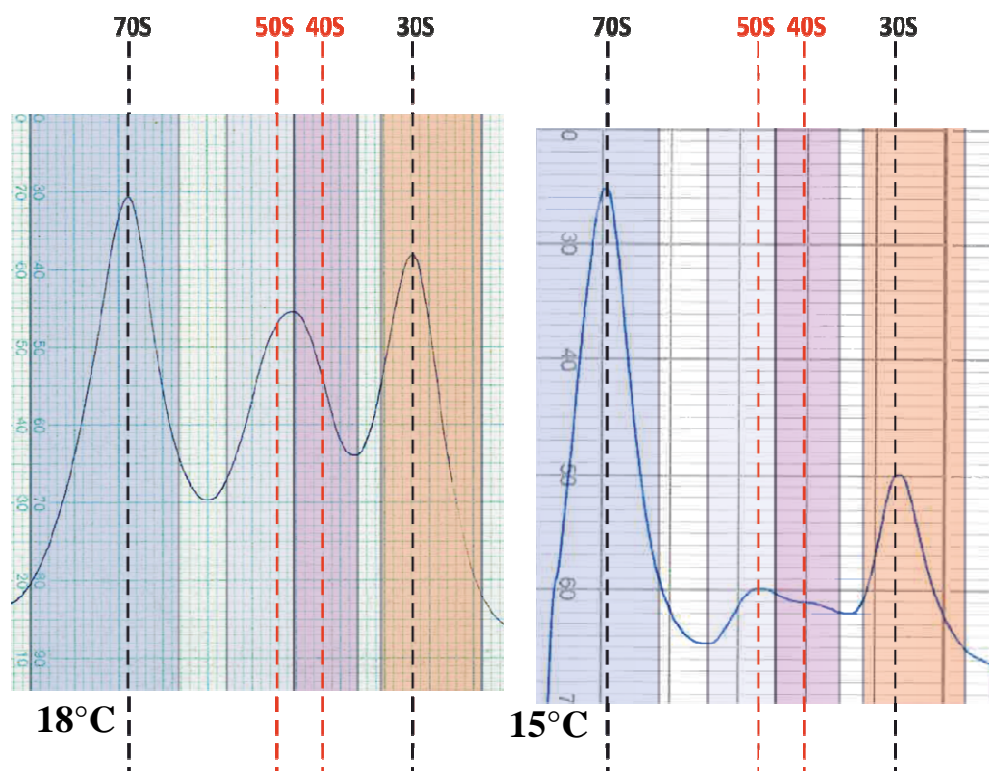
Andmete analüüs näitab, et LiCl-ga „pestud“ ribosoomid (K-50S ja K-30S) ei oma mittespetsiifilist ribosoomilt sõltuvat ATP hüdrolüüsi võimet. LiCl-ga „pestud“ ribosoomi

subühikuid võib antud kontekstis käsitleda kui biogeneesi vaheprodukte, sest ribosoomi valkude lisamisega on võimalik taastada nende funktsionaalne aktiivsus. Võttes arvesse üldlevinud arusaama, mille kohaselt arvatakse, et CsdA on 50S assambleerumise valk, võib oletada, et K-50S saab peegeldada 50S subühiku assambleerumise eellaspartiklit (Peil *et al.*, 2008). Seega võiksid K-50S ja K-30S imiteerida assambleerumise vaheolekuid ning olla CsdA helikaasi märklauaks.

CsdA valgu hüdrolüüs suurenes kaks – neli korda “kooritud” ribosoomide lisamisel (joonis 16). Antud tulemuste põhjal saab järeldada, et CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust stimuleerib kõige efektiivsemalt 50S subühiku eellaspartikkel (K-50S), kuigi katsetes soolaga „pestud“ ribosoomidega (joonis 15) seda ei täheldatud.

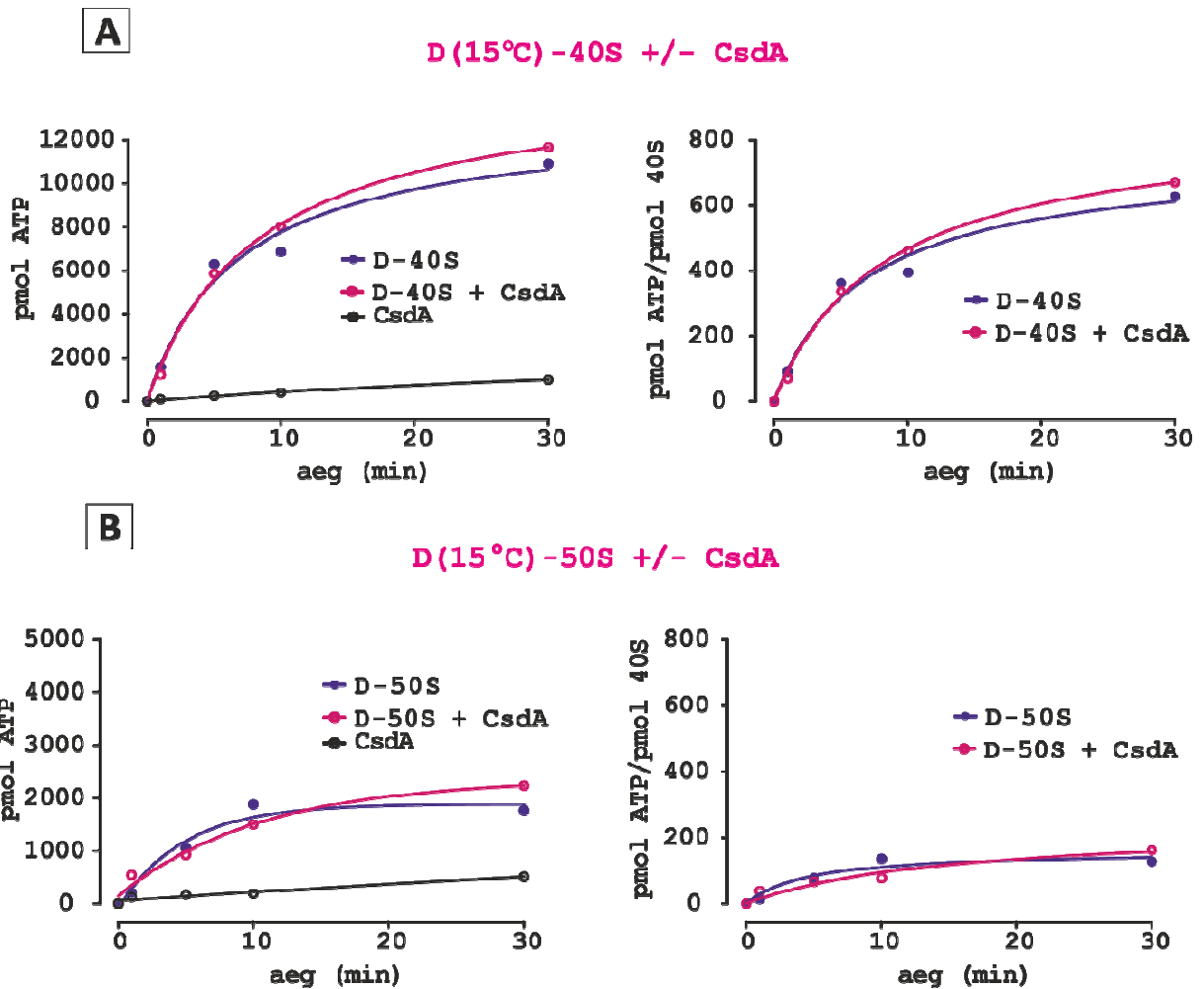
### **3.3.6 Ribosoomide vahepartiklite stimuleeritav toime**

Selle etapi eesmärgiks oli uurida ribosoomide vahepartiklite stimuleeritavat toime CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele. Töö käigus kasutati CsdA valgu substraatidena ribosoomide subühikuid (50S ja 30S) ja akumuldeerunud partikleid (40S), mis eraldati Keio kollektsiooni *Escherichia coli* JW 2781 (*ΔcsdA*) tüvest (Long ja Antoniewicz, 2014; Baba *et al.*, 2006). Antud tüves on deleteeritud geen *csdA*, mis kodeerib CsdA helikaasi. (Baba *et al.*, 2006). *E. coli* tüve JW 2781 kasvatati 2 x YT söötmes 15°C ja 18°C juures tiheduseni 1,0 – 1,5 . Ribosoomid fraktsioneeriti 15% – 30% sahharoos gradiendi abil (joonis 8).



**Joonis 17.** Ribosoomide profiilid erinevatest *E. coli* tüvedest. Ribosoomi partiklid eraldati 15% - 30% sahharoosi gradiendiga ning tseentrifuugiti SW28 rootoris  $\omega^2t=3,02 \times 10^{11} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}$ ,  $4^\circ\text{C}$ . Ribosoomide partiklid visualiseeriti läbivoolu-spekrofotomeetri ( $A_{260\text{nm}}$ ) UV900, peristaatilise pumba P1 ja isekirjutaja Recorder 112 abil **(A)** *E. coli* M15 ( $\Delta\text{csdA}$ ) tüve kasvatati  $18^\circ\text{C}$  juures optilise tiheduseni 1,5 ( $A_{600}$ ). **(B)** *E. coli* M15 ( $\Delta\text{csdA}$ ) tüve kasvatati  $15^\circ\text{C}$  juures optilise tiheduseni 1,2 ( $A_{600}$ ).

*CsdA* geeni puudumisel madalatel temperatuuridel on täheldatud ribosoomide profiilide muutust (Peil *et al.*, 2008). Ribosoomi profiilide joonis osutab, et *E. coli* M15 ( $\Delta\text{csdA}$ ) tüvi, mida kasvatati  $18^\circ\text{C}$  juures, sisaldab palju rohkem 50S subühikuid, mis sisaldavad endas ka 40S partikleid (joonis 17).  $15^\circ\text{C}$  juures kasvatatud *E. coli* M15 ( $\Delta\text{csdA}$ ) tüve ribosoomide profiilides tekkisid selgesti eristatavad 40S vahepartiklid, mis on 50S subühikute eellaspartiklid (Peil *et al.*, 2008). Kuna *CsdA* valk on seotud ribosoomide biogeneesiga, uuriti kas  $\Delta\text{csdA}$  tüvest eraldatud 50S ja 40S partiklid on võimelised stimuleerima valgu ATPaasset aktiivsust (joonis 18).



**Joonis 18.** CsdA valgu ATPaasne aktiivsus 40S ja 50S vahepartiklite stimuleerimisel. Vahepartiklid on eraldatud *E. coli* JW2781 ( $\Delta csdA$ ) tüvest, mis kasvatati 15°C juues. (A) 40S vahepartiklid (17 pmol/ 2 $\mu$ l). (B) 50S subühikud (14 pmol/ 2 $\mu$ l). Vasakpoolsetel graafikutel on totaalne hüdrolüüsitud ATP hulk pikomoolides. 40S ja 50S vahepartiklitega hüdrolüüsitakse 10900 pmol ja 1700 pmol vastavalt. Valgu juuresolekul 40S ja 50S vahepartiklitega hüdrolüüsitud ATP hulk on 11600 pmol ja 2200 pmol vastavalt. Kontrollseerias (sisaldab CsdA valku) ATP hüdrolüüs 30-minutilises ajapunktis on 500 pmol. Parempoolsetel graafikutel on ATP/vahepartiklite pikomoolide suhe. Hüdrolüüsitud ATP ja 40S, 50S pikomoolide suhe on vastavalt 620 ja 120. Valgu juuresolekul moodustab hüdrolüüsitud ATP ja 40S, 50S pikomoolide suhe vastavalt 670 ja 160 ühikut.

Graafikutel on näha, et nii 15°C juures akumulunud 40S ja 50S partiklid on võimelised stimuleerima valgu ATPaasset aktiivsust. Samas ilmnes seaduspäa, et valgu juuresolek või selle puudumine ei muuda hüdrolüüsitud ATP hulka (joonis 18). Seega ei ole antud katsete tulemuste põhjal võimalik väita, et ribosoomide eellaspartiklid (D-40S ja D-50S) stimuleeriks CsdA ATPaasset aktiivsust. Üks selgitus sellele on, et mittespetsiifiline ATPaas, millest tingitud tugev signaal 40S stimuleerimisel, on seotud juba varasemate ribosoomide eellaspartiklitega.

Näited makromolekulaarsetest kompleksidest osutavad, et CsdA valk kasutab oma substraadidena RNA-valk komplekse. Võib oletada, et CsdA osaleb ribosoomide biogeneesi 50S subühiku assambleerumises, aga pole täpselt teada, kas helikaas on kaasatud 30S subühiku assambleerumisse või mitte. Kui vaadelda 40S vahepartiklite stimuleerimist, siis saab järeldada, et CsdA valk on seotud veel varasemate ribosoomi eellastega.

Kokkuvõtteks võib väita, et eraldatud CsdA valk on funktsionaalselt aktiivne, mida kinnitavad ATP hüdrolüüsi mõõtmise katsed. Töö tulemused näitasid, et erinevad RNA ja RNA-valk substraadid on võimelised stimuleerima CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Samas ei saa antud katsete põhjal väita, et mõni nendest substraatidest omaks märkimisväärselt kõrgemat CsdA valgu ATP hüdrolüüsi stimuleerivat toimet.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös püüti tuua selgust CsdA valgu rolli ribosoomide biogeneesis. Eesmärgi saavutamiseks analüüsiti CsdA valgu ATPaasset aktiivsust erinevate RNA ja RNA-valk kompleksite stimuleerimisel. Samuti uuriti CsdA valgu seost ribosoomide biogeneesiga. Töös kasutatud valk eraldati *Escherichia coli* tüvest M15[pREP4], mis sisaldas *pQE60-csdA* plasmidi ja ribosoomid eraldati *E. coli* JW2781 ( $\Delta csdA$ ) tüvest.

Afiinsuskromatograafia abil eraldati CsdA valk, mille olemasolu kontrolliti geelelektroforeesi abil. Valgu suurus oli umbes 73 kDa. Valgu ATPaasse aktiivsuse analüüsimiseks kasutati mitmeid RNA ja RNA-valk substraate ja ATP hüdrolüüsi aktiivsuse adsorptsioonil põhinevat katsetamethodikat. ATPaasi ensümaatilist aktiivsust analüüsiti pilootkatse alusel polü(U) mRNA ja tRNA substraatidega. Järgmiseks kontrolliti, kas sünteetilised mRNA-d, mis on natiivse mRNA analoogid, suudavad stimuleerida CsdA ATPaasset aktiivsust. Kuna CsdA valk osaleb ribosoomide biogeneesis, kuid tema täpne funktsioon pole teada, uuriti ATPaasse aktiivsuse stimuleerimist 16S rRNA ja 23S rRNA-ga. Leiti, et kõik uuritud RNA molekulid omavad positiivset efekti ATP hüdrolüüsile.

Selleks, et analüüsida CsdA valgu rolli ribosoomide biogeneesis, uuriti ATP hüdrolüüsi stimuleerimist metsiktüüpi ribosoomidega. Selle katse tulemused viisid järelduseni, et ribosoomid on võimelised hüdrolüüsima ATP CsdA valgust sõltumatult, mille põhjuseks võib olla ekstraribosomaalste faktorite seondumine ribosoomidega. Antud tulemusest lähtuvalt uuriti järgmise etapina soolaga „pestud“ ribosoomide, mille tulemusena vabanes ribosoomidest umbes üks kolmandik valke. Vabanenud valkudest hoolimata jäi CsdA sõltumatu ATP hüdrolüüs kõrgeks.

Järgnevalt tehti kontrollkatse, mille käigus analüüsiti seda, kuidas ribosoomid stimuleerivad ATPaasset aktiivsust sõltumata valgust CsdA. Sellele lisaks analüüsiti CsdA helikaasi võimet hüdrolüüsida ATP 2M LiCl-ga „kooritud“ ribosoomidega. Tulemused näitasid, et LiCl-ga „kooritud“ ribosoomid ei oma mittespetsiifilist ribosoomilt sõltuvat ATP hüdrolüüsi võimet.

Lõpuks uuriti 50S subühikute ja 40S vahepartiklite (*E. coli* M15 ( $\Delta csdA$ ) tüvest) võimet stimuleerida valgu CsdA ATPaasset aktiivsust. Saadud tulemuste põhjal võib oletada, et CsdA helikaas on seotud 50S prekursoritega ning aitab kaasa assambleerumisele.

Uurimuse katselise osa tulemuste analüüs kinnitas tööle püstitatud hüpoteesi, mille kohaselt on CsdA 50S subühiku biogeneesis osalev RNA helikaas. Samuti on erinevad RNA ja RNA-valk kompleksid võimelised stimuleerima valgu ATPaasset aktiivsust.

**Purification of *Escherichia coli* RNA helicase CsdA and  
characterization of its ATPase activity**

Angelina Kulikovič

**SUMMARY**

The ribosome is a nucleoprotein particle, which is responsible for protein biosynthesis in cells. Prokaryotic ribosomes are formed by two subunits: 30S and 50S. The small subunit is made of 16S rRNA and 21 ribosomal proteins. The 50S subunit is composed of two rRNAs: 23S rRNA and 5S rRNA, and 33 proteins (Kaczanowska and Rydén-Aulin, 2007).

The assembly of ribosomes is a complex of processes which are initiated during ribosomal RNA transcription. The ribosome biogenesis involves a number of extra-ribosomal factors that are necessary for the effective and correct assembly of ribosomes. One of those factors is a group of proteins called DEAD-box family (Wilson and Nierhaus, 2007). DEAD-box proteins are RNA helicases, which include several proteins. CsdA is one of the DEAD-box proteins, that participates in ribosome biogenesis (Charallais *et al.*, 2004).

The aim of the present study was to analyze the role of CsdA protein in ribosomal biogenesis. In order to accomplish the aim the ATPase activity of RNA helicase was tested with different RNA substrates. In addition, the function of CsdA protein in 50S subunit was analyzed.

It was found that ATPase activity of CsdA protein is nonspecific and does not depend on the nature of substrate. The analysis showed that CsdA is a RNA helicase that is involved in the biogenesis of the 50S subunit. Different RNA and RNA-protein complexes are able to stimulate the activity of the protein ATPase.

## **TÄNUSÕNAD**

Sooviksin tänada oma juhendajat Aivar Liivi, kes oli mulle oma kannatlikkuse, professionaalsuse ja abivalmidusega suureks eeskujuks ja toeks. Tänan ka professor Jaanus Remmet väärtuslike nõuannete ja tähelepanekute eest. Minu siirad tänusõnad ka kogu kollektiivile, kes oma armsa naeratuse ja läheda olekuga igapäevaselt minusse entusiasmi süstisid ning tahet edasi pürgimiseks ainult suurendasid. Lõpetuseks soovin tänada oma perekonda ja sõpru, kes minusse alati uskunud on.

## KASUTATUD KIRJANDUS

### Artiklid:

Agashe, V.R. and Hartl, F.U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11(1): 15-25.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0008.

Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62(3): 293-300.

Bizebard, T., Ferlenghi, I., Iost, I. and Dreyfus, M. (2004) Studies on three *E. coli* DEAD-box helicases point to an inwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry* 43(24): 7857-7866.

Bylund, G.O., Persson, B.C., Lundberg, L.A. and Wikström, P.M. (1997) A novel ribosome – associated protein is important for efficient translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179(14): 4567-4574.

Bylund, G.O., Wipemo, L.C., Lundberg, L.A. and Wikström, P.M. (1998) RimM and RbfA are essential for efficient processing of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(1): 73-82.

Caldon, C.E. and March, P.E. (2003) Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr Opin Microbiol* 6(2): 135-139.

Carpousis, A. (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNAaseE. *Annu Rev Microbiol* 61:71-87.

Charallais, J., Dreyfus, M and Iost, I. (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* 32(9): 2751-2759.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367: 17-37.

Daigle, D.M. and Brown, E.D. (2004) Studies of the interaction of *Escherichia coli* YjeQ with the ribosome *in vitro*. *J Bacteriol* 186(5): 1381-1387.

Dammel, C.S. and Noller, H.F. (1995) Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* 9(5): 626-637.

Die, I.M., Bergmans, H.E. and Hoekstra, W.P. (1983) Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence. *J Gen Microbiol* 129(3): 663-670.

El Hage, A., Sbaï, M. and Alix, J.H. (2001) The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 264(6): 796-808.

El Hage, A., Sbaï, M. and Alix, J.H. (2001) The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 264(6): 796-808.

Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P. and Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* 20(3): 313-324.

Feunteun, J., Jordan, B.R. and Monier, R. (1972) Study of the maturation of 5S RNA precursors in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 70(3): 465-474.

Gegenheimer, P. and Apirion, D. (1981) Processing of procaryotic ribonucleic acid. *Microbiol Rev* 45(4): 502-541.

Gongadze, G.M. (2011): Гонгадзе, Г. М. (2011) 5S рРНК и рибосома. *Успехи биологической химии* 51: 165–192.

Guo, Q., Yuan, Y., Xu, Y., Feng, B., Liu, L., Chen, K., Sun, M., Yang, Z., Lei, J. and Gao, N. (2011) Structural basis for the function of a small GTPase RsgA on the 30S ribosomal subunit

maturation revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32): 13100-3105.

Himeno, H., Hanawa-Suetsugu, K., Kimura, T., Takagi, K., Sugiyama, W., Shirata, S., Mikami, T., Odagiri, F., Osanai, Y., Watanabe, D., Goto, S., Kalachnyuk, L., Ushida, C. and Muto, A. (2004) A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucleic Acids Res* 32(17): 5303-5309.

Hwang, J. and Inouye, M. (2006) The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61(6): 1660-1672.

Iost, I. and Dreyfus, M. (2006) Survey and summary. DEAD-box RNA-helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 34 (15): 4189-4197.

Iost, I., Bizebard, T. and Dreyfus, M. (2013) Functions of DEAD-box proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. *Biochim Biophys Acta* 1829(8): 866-877.

Jain, C. (2008) The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA* 14(2): 381-389.

Jankowsky, E. and Fairman, M.E. (2007) RNA helicases – one fold for many functions. *Curr Opin Struct Biol* 17(3): 316-24.

Jiang, M., Datta, K., Walker, A., Strahler, J., Bagamasbad, P., Andrews, P.C. and Maddock, J.R. (2006) The *Escherichia coli* GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J Bacteriol* 188(19): 6757-6770.

Jinks-Robertson, S., Nomura, M. (1982) Ribosomal protein S4 acts in trans as a translational repressor to regulate expression of the alpha operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 151(1): 193-202.

Johnstone, B.H., Handler, A.A., Chao, D.K., Nguyen, V., Smith, M., Ryu, S.Y., Simons, E.L., Anderson, P.E. and Simons, R.W. (1999) The widely conserved Era G-protein contains an RNA-binding domain required for Era function *in vivo*. *Mol Microbiol* 33(6): 1118-1131.

- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. and Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1): 76-88.
- Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 71(3): 477-494.
- Kapp, L. D. and Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. Annu Rev Biochem 73: 657-704.
- King, T.C., Sirdeshmukh, R. and Schlessinger, D. (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. Proc Natl Acad Sci U S A 81(1): 185-188.
- Li, Z. and Deutscher, M. (1995) The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 92(15): 6883-6886.
- Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M.P. (1999a) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. EMBO J 18(10): 2878-2885.
- Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M.P. (1999b) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RnaseT. RNA 5(1): 139-146.
- Liiv, A. (1998) Ribosomal large subunit assembly *in vivo*. University of Tartu, Tartu University Press, doktoritöö
- Long, C.P. and Antoniewicz, M.R. (2014) Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* knockouts: lessons from the Keio collection and future outlook. Curr Opin Biotechnol 28C: 127-133.
- Lu, J., Aoki, H., Ganoza, M.C. (1999) Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. Int J Biochem Cell Biol 31(1): 215-229.
- Maki, J.A., Schnobrich, D.J. and Culver, G.M. (2002) The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. Mol Cell 10(1): 129-138.

- March, P. E., C. G. Lerner, J. Ahnn, X. Cui, and M. Inouye. (1988) The *Escherichia coli* Ras-like protein (Era) has GTPase activity and is essential for cell growth. *Oncogene* 2(6): 539–544.
- Meier, T.I., Peery, R.B., McAllister, K.A. and Zhao G. (2000) Era GTPase of *Escherichia coli*: binding to 16S rRNA and modulation of GTPase activity by RNA and carbohydrates. *Microbiology* 146 (5): 1071-83.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova G. and Yusupov M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*19(6): 560-567.
- Moore, V.G., Atchison, R.E., Thomas, G., Moran, M. and Noller, H.F. (1975) Identification of a ribosomal protein essential for peptidyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(3): 844-848.
- Nishi, K., Morel-Deville, F., Hershey, J.W., Leighton, T. and Schnier, J. (1988) An eIF-4A-like protein is a suppressor of an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. *Nature* 336(6198): 496-498.
- Nomura, M. (1999) Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccaromyces cerevisiae*: diversity and common principles. *J Bacteriol* 181(22): 6857-6864.
- Peil, L., Virumäe, K. and Remme, J. (2008) Ribosome assembly in *Escherichia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA. *FEBS J* 275(15): 3772-3782.
- 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. and Williams, L.D. (2013) Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Res* 41(15): 7522-7535.
- Pulk, A., Liiv, A., Peil, L., Maiväli, Ü., Nierhaus, K. and Remme, J. (2010) Ribosome reactivation by replacement of damaged proteins. *Mol Microbiol* 75(4): 801-814.
- Ramakrishnan, V. and Moore, P. B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol* 11(2): 144-154.

- Rocak, S. and Linder, P. (2004) Dead-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(3): 232-41.
- Rovera, G., Berman, S. and Baserga, R. (1970) Pulse labeling of RNA of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(4): 876-83.
- Roy, M.K., Singh, B., Ray, B.K. and Apirion, D. (1983) Maturation of 5S rRNA: ribonuclease E cleavages and their dependence on precursor sequences. *Eur J Biochem* 131(1): 119-127.
- Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K. and Wada, C. (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* 10(5): 393-408.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. and Cate, J. H. D. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310(5749): 827-834.
- Shajani, Z., Sykes, M.T. and Williamson, J.R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem* 80: 501-526.
- Sharpe Elles, L.M., Sykes, M.T., Williamson, J.R. and Uhlenbeck, O.C. (2009) A dominant negative mutant of the E. coli RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* (19): 6503-6514.
- 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.
- Srivastava, A.K. and Schlessinger, D. (1988) Coregulation of processing and translation: mature 5' termini of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA form in polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19): 7144-7148.
- Srivastava, A.K. and Schlessinger, D. (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu Rev Microbiol* 44: 105-129.

- Sulthana, S., Deutscher, M.P. (2013) Multiple exoribonucleases catalyze maturation of the 3' terminus of 16S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem* 288(18): 12574-12579.
- Tan, J., Jakob, U. and Bardwell, J.C. (2002) Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* 184(10): 2692-2698.
- Trubetskoy, D., Proux, F., Allemand, F., Dreyfus, M. and Iost, I. (2009) SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 37(19): 6540-6549.
- Turner, W. A., Cheraton F. L., Rebecca W. A. and P. G. Jones.(2007) Mutational analysis of the *Escherichia coli* DEAD box protein CsdA. *J.Bacteriol* 189(7): 2769.
- Verstraeten, N., Fauvart, M., Versées, W. and Michiels, J. (2011) The universally conserved prokaryotic GTPases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(3): 507-542.
- Williamson, J. R. (2003). After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *RNA* 9(2): 165-167.
- Williamson, J. R. (2008) Biophysical studies of bacterial ribosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18: 299-304.
- Wilson, D. N., Gupta, R., Mikolajka, A. and Nierhaus, K. H. (2009) Ribosomal proteins: role in ribosomal functions. *Encyclopedia of Life Sciences* 10-10.
- Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H. (2003) The ribosome through the looking glass. *Angew Chem Int Ed Engl* 42(30): 3464-3486.
- Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(3): 187-219.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch T. and Ramakrishnan V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407(6802): 327-339.

Yamamoto, H., Qin, Y., Achenbach, J., Li, C., Kijek, J., Spahn, C.M., Nierhaus, K.H. (2014) EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat Rev Microbiol* 12(2): 89-100.

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* 292(5518): 883-896.

Zhao, X. and Jain, C. (2011) DEAD-box proteins from *Escherichia coli* exhibit multiple ATP-independent activities. *J Bacteriol* 193(9): 2236-2241.

Zhou, Z. and Deutscher, M.P. (1997) An essential function for the phosphate-dependent exoribonucleases RNase PH and polynucleotide phosphorylase. *J Bacteriol* 179(13): 4391-4395.

#### **Raamatud:**

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) Protein fold into a conformation of lowest energy p. 130 - 131 *In* Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the cell*, 5<sup>th</sup> ed., Garland Science

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) How genetic switches work, p. 432 - 437 *In* Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the cell*, 5<sup>th</sup> ed., Garland Science.

Bryan, L., Williams, M. Wilson, K. (1975) Affinity chromatography, p. 100 - 104 *In* A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry, Bryan, L., Williams, M. Wilson, K., Edward Arnold, London

Kusk, S., Sedman, T., Sedman, T. (2002) Recombinant yeast mtDNA helicases, p. 303 - 316 *In* *Mitochondrial DNA Methods and Protocols*, William C. (ed.) Humana Press vol. 197

Nierhaus, K.H. and Wilson, D.N. (2004) Precursor particles and recostitution intermediates, p. 85-104. *In* Nierhaus, K.H. and Wilson, D.N., *Protein Synthesis and ribosome structure*. 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Qiagen, 2011: The QIAexpress System, p.15 – 22 *In* The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (2001) 5<sup>th</sup> ed. Qiagen

Rapley, R. (2000) Expression constructs in *pQE* vector, p. 923 - 924 *In* Rapley, R., The nucleic acid protocols handbook, Humana Press

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Liquid media for *E. coli*, p. A2.4. *In* Sambrook, J. and Russell, D. W. (ed.), Molecular cloning: a laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Spirin, 1971: Спирин, А.С., Гаврилова, Л.П. (1971) Ассоциация субчастиц, p. 55-61 *In* Рибосома, Спирин, А.С., Гаврилова, Л.П. 2-е изд. Наука

Spirin, 2011: Спирин, А.С. (2011) мРНК и биосинтез белков, p 5-11 *In* Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка, Спирин, А.С., Пирогова И.В. (ed.) Академия

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

[www.apollo.chemistry.gatech.edu](http://www.apollo.chemistry.gatech.edu)

## Lihtlitsents

Mina, Angelina Kulikovitš

(sünnikuupäev: 26.09.1991)

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

*Escherichia coli* RNA helikaasi CsdA eraldamine ning selle ATPaasse aktiivsuse  
iseloostamine,

mille juhendaja on Aivar Liiv,

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

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

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

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

Tartus, 26.5.2014