

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

bL31 paraloogide mõju *E. coli* kasvufenotüübile erinevatel keskkonnatingimustel

bakalaureusetöö

12 EAP

Annete Sikora

Juhendaja MSc Silva Lilleorg

TARTU 2019

bL31 paraloogide mõju *E. coli* kasvufenotübile erinevatel keskkonnatingimustel

Kahest erinevast subühikust koosnevad ribosoomid (30S ja 50S), sisaldavad nii rRNA-d kui ka valke, millest viimased võivad omada ka paralooge. Selle töö raames uuriti bL31 paraloogsete r-alkude bL31A ja bL31B mõju *E. coli* kasvufenotübile lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumisel ning statsionaarses kasvufaasis rakkude elumusele.

Varasemalt oli teada, et bL31A paraloogi sisaldavad rakud võiksid kasvada pidevas oksüdatiivsest stressist paremini kui bL31B-d sisaldavad rakud. Samuti teati, et topeltdeletsioonitüvi MGΔAB generatsiooniaeg on pikem paraloogi sisaldavate tüvede omast. Lisaks oli teada, et eksponentsiaalses kasvufaasis on ribosoomides koosseisus enamasti valk bL31A ja statsionaarses faasis valk bL31B.

Märksõnade loend: ribosoom, ribosoomi valgud, paraloogid, bL31, oksüdatiivne stress, FACS, ribosoomide heterogeensus.

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Influence of bL31 paralogs on *E. coli* growth phenotype under different environmental conditions

Ribosomes consisting of two different subunits (30S and 50S), contain both rRNA and proteins, the latter of which may also have paralogs. In this work, effects on the *E. coli* growth phenotype when recovering from short-term oxidative stress and for cells growing in stationary growth phase, were examined.

Previously, it was known that the cells containing the bL31A paralog may grow better from constant oxidative stress than the cells containing the bL31B. It was also known that the generation time of the double-deletion strain MGΔAB is longer than the strains containing the paralogue. In addition, it was known that, in the exponential growth phase, the ribosomes are mostly composed of protein bL31A and in the stationary growth phase it contains mostly bL31B protein.

Keywords: ribosome, ribosomal proteins, paralogs, bL31, oxidative stress, FACS, ribosome heterogeneity.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	2
LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Bakteri ribosoomi ehitus.....	6
1.2. R-alkude paraloogidest bakterites.....	9
1.3. <i>Escherichia coli</i> r-valgu bL31 paraloogid.....	9
1.4. Ribosoomide heterogeensus	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1. Töö eesmärk	14
2.2. Materjal ja metoodika.....	14
2.2.1. Bakteritüved ja söötmed	14
2.2.2. Optimaalse H ₂ O ₂ kontsentratsiooni leidmine bakterirakkude kasvu oksüdatiivsest stressist taastumise uurimiseks	15
2.2.3. Tilkkülvanalüüs rakkude oksüdatiivsest stressist taastumise hindamiseks	17
2.2.4. Surnud ja elusrakkude osakaalu hindamine FACS (<i>fluorescence-activated cell sorter</i>) analüüsiga.....	17
2.2.4.1. Andmeanalüüs	18
2.3. Tulemused ja arutelu	19
2.3.1. Rakkude kasvu taastumine pärast oksüdatiivset stressi.....	19
2.3.1.1. Optimaalsete katsetingimuste leidmine lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumise uurimiseks	19
2.3.1.2. bL31 paraloogide mõju rakkude kasvu taastumisele H ₂ O ₂ töötlukest.....	23
2.3.2. bL31 paraloogide mõju rakkude elumusele statsionaarses kasvufaasis.....	28
KOKKUVÕTE	35
Summary	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	38
KASUTATUD VEEBILEHED	42

LÜHENDID

CRIM - (*conditional-replication, integration, and modular plasmids*) replikatsioonist sõltuvad, integreeritavad, modulaarsed plasmiidid

FACS - (*fluorescence-activated cell sorter*), fluorestsentsiga aktiveeritav rakusorter

LB - Luria-Bertani sööde

OD – (*optical density*), optiline tihedus

PI – (*propidium iodide*), propiidium jodiid

S- Svedbergi ühik, sedimentatsiooni määde tseentrifuugimisel

SILAC – (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), stabiilsete isotoopidega märgistamine rakukultuuris aminohapete abil

ZUR - (zinc uptake regulator), tsingi rakku sisenemise regulaator

SISSEJUHATUS

Bakteri ribosoom sisaldab kolme erinevat rRNAd (23S, 16S ja 5S) ning rohkem kui viiskümmend erinevat ribosoomi valku (r-valgud), millest viimaste seas leidub ka paralooge. See tähendab, et valgu geen on duplitseerinud ning võimaldab vajadusel ühel valgul jätkata vana funktsiooni täitmist, kuid teine võib omandada uue funktsiooni (Jensen 2001). *E. coli*'s on paralooge oma- vaid valke kaks: bL31 ja bL36, millest antud töös keskendutakse esimesele.

bL31 paraloogid bL31A ja bL31B kodeeritakse eri operonides paiknevateelt geenidelt. Kaks valku on aminohappejärjestuse põhjal küllalt erinevad – identseid aminohappeid on vaid 40% (NCBI BLASTp andmebaas).

bL31 paraloogide kohta oli molekulaarioloogia laboris kindlaks tehtud, et bL31A paraloogi sisaldavad rakud kasvavad oksüdatiivse stressis tingimustes paremini kui bL31B-d sisaldavad rakud (Volõnkin, 2018). Samuti oli teada, et topeltdeletsioonitüve MGΔAB generatsiooniaeg on kaks korda pikem kui mõlemat paraloogi sisaldaval metsiktüüpi tüvel või üht paraloogi sisaldaval tüvel (Lilleorg et al. 2017). Lisaks oli teada, et eksponentsiaalses kasvufaasis on ribosoomide koosseisus enamasti valk bL31A ja statsionaarses faasis valk bL31B (Lilleorg et al. 2019).

Käesoleva töö teoreetilises osas kirjeldatakse ribosoomi üldist ehitust, tutvustatakse r-valkude paralooget bakterites ja antakse ülevaade *Escherichia coli* paraloogsest valgust bL31. Lisaks vaadeldakse lühidalt ribosoomide heterogeensust.

Eksperimentaalse töö eesmärk on kindlaks teha, kas *E. coli* paraloogsetel valkudel bL31A-l või bL31B-l on mõju bakteri kasvufenotübile lühiajalisest vesinikperoksiidiga tekitatud oksüdatiivsest stressist taastumisel või rakkude elumusele statsionaarses kasvufaasis vaesel söötmel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

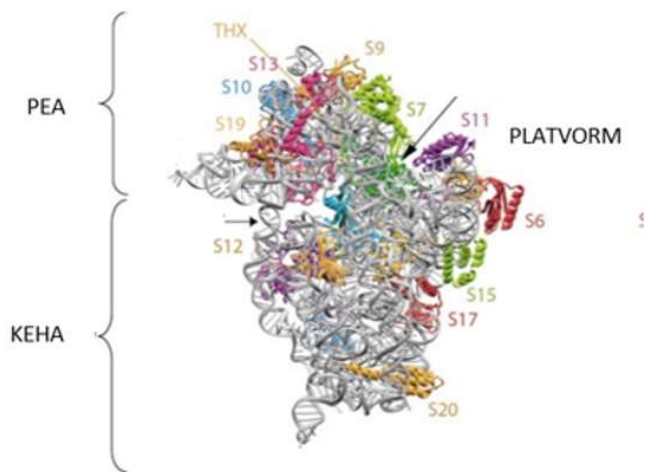
1.1. Bakteri ribosoomi ehitus

Ribosoomi funktsioon nii eukarüootses kui prokarüootses rakus on DNA järjestuselt transkribeeritud mRNA järjestuse põhjal sünteesida elutegevuseks vajalikke valke. Selleks on ribosoomil kaks subühikut: väike subühik seob mRNA-d ja kontrollib dekodeerivas tsentris koodon-antikoodon paardumist (Brodersen et al. 2002) ja suur subühik seob tRNA-sid ning katalüüsib aminohapetevahelisi peptiidsidemete moodustumist (Connolly ja Culver 2009; Shajani, Sykes ja Williamson 2011).

Bakteri ribosoomi väike 30S (Svedbergi ühik) ja suur 50S subühik moodustavad omavahel seondudes 70S subühiku. Bakteriaalne ribosoom pannakse kokku kolmest rRNA molekulist. *Escherichia coli*'s kodeerivad rRNA-d seitse operoni, mis on peaaegu identse järjestusega, sisaldades erinevas järjekorras 5S, 16S, 23S rRNA-d ja üht tRNA-d. Bakteri ribosoomis on vähemalt 55 erinevat valku (Kaczanowska ja Ryden-Aulin 2007). Väiksem, 30S subühik koosneb 16S rRNA-st (1541 aluspaari (*base pair, bp*)) ja 22. ribosoomi valgust (joonis 1) ning suurem, 50S subühik 23S (2905 bp) ja 5S (120 bp) rRNA-st (joonis 2), millele lisanduvad 33 ribosoomi valku (Connolly ja Culver 2009; Nenad Ban et al. 2014). Väikese subühiku valke tähistatakse S1-S21, bTHX ja suures subühikus on valgud L1-L6, L9-L25, L27-L36 (Shajani, Sykes, ja Williamson 2011; Nenad Ban et al. 2014). Varem arvati, et leiduvad ka valgud L7, L8 ja L6. Selgus, et L7 on üks vorm valgust L12: L12 omab vaba N-terminaalset otsa, L7-l on aga N-terminaalne seriin aminoatsetüleeritud (Gudkov 1997). L8 on kompleks ribosoomivalkudest L12 ja L10 (Pettersson, Hardy ja Liljas 1976) ning L26 on identne väikese subühiku valguga S20 (Wittmann 1974). Ribosoomi valgud on oma nime saanud nende jaotumise järgi 2D elektroforeesil (number) ning paiknemise järgi subühikus (*L-large*, suur subühik; *S-small*, väikse subühik) (Hindennach, Kaltschmidt, ja Wittmann 1971). R-valkude nimetamiseks loodi 2014. aastal süsteem, kus ribosoomi valgu nime ette lisatakse ühetäheline tähis, andmaks ülevaadet, millises domeenis sellise valgu homoloogid on levinud. Selliseid lühendeid on kolm: u – universaalne, e – eukarüoodispetsiifiline, b – bakterispetsiifiline (Ban et al. 2014).

Ribosoomi subühikute vahelisi ühendusi (ühe subühiku teatud molekulid interakteeruvad teise subühiku molekulidega) nimetatakse sildadeks. Ribosoomis on neid kokku 12: B1a, B1b, B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B6, B7a, B7b ja B8 (Liu ja Fredrick 2016). Neist vaid B1b on valk-valk ühendusega sild, ülejäänud on kas RNA-RNA või RNA-valk tüüpi ühendused (Liiv ja O'Connor

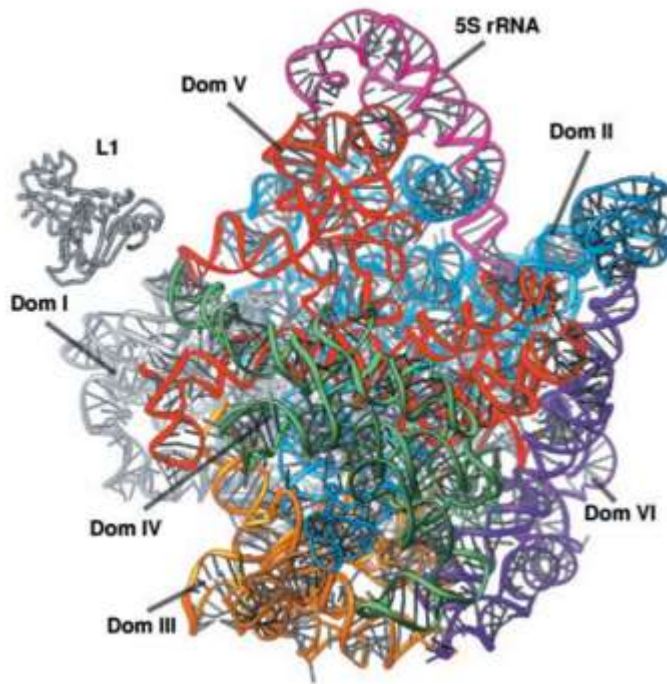
2006). Eelmainitud sildadest on RNA-RNA sillad B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B6, B7a ja RNA-valk kontakti moodustavad B1a, B4, B5, B6, B7b, B8 (Yusupov et al. 2001). RNA-RNA sillad paiknevad mõlemas subühikus tsentraalselt ja puutuvad seeläbi otseselt kokku tRNA seondumiskohadega, kuid valke sisaldavad sillad paiknevad perifeerselt, s.t ribosoomi äärealal (Yusupov et al. 2001). Ainuke valk-valk kontakti moodustav sild on B1b, mis moodustub ribosoomi väikese subühikuga seotud valguga S13 N-terminaalse osa vahendusel ja suure subühikuga valguga L5 vahendusel (Cukras ja Green 2005).



Joonis 1. Bakteri ribosoomi väikese subühiku komponendid *Thermus thermophilus*'e näitel. 16S rRNA on kujutatud halliga, r-valgud teiste värvidega. Esitatud on elektronmikroskoobi (electron microscopy, EM) rekonstruktsioon ribosoomi subühikute kokkupuutepinnast. Peapiirkonda kuuluvad valgud uS2, uS3, uS7, uS9, uS10, uS13, uS14, uS19 ja 16S rRNA 3' mažoorne domeen. Keha moodustavad valgud uS4, uS5, uSb12, bS16, uS17 ja bS20 ja 16S rRNA 5' ja 3' minoorne domeen ning platvorm koosneb valkudest bS1, bS6, uS8, uS11, uS15, bS18 ja 16S rRNA kehadomeenist. Joonis on kohandatud Brodersen jt avaldatud artikli põhjal (Brodersen et al. 2002).

30S ribosoom (joonis 1) jaotatakse 16S rRNA sekundaarstruktuuri alusel (keskosa, 5', 3' minoorne ja 3' mažoorne) neljaks piirkonnaks, mis moodustavad omakorda neile seonduvate väikese subühikute valkudega kolm suurt domeeni (Noller ja Woese 1981; Brodersen et al. 2002). Kehadomeenis (16S rRNA 5' ja 3' minoorne domeen) on valgud uS4, uS5, uSb12, bS16, uS17 ja bS20; peadomeenis (16S rRNA 3' mažoorne domeen) valgud uS2, uS3, uS7, uS9, uS10, uS13, uS14, uS19 ja platvorm (16S rRNA kehadomeen) koosneb valkudest bS1, bS6, uS8, uS11, uS15, bS18 (Wilson ja Nierhaus 2005).

50S ribosoom jaotatakse rRNA alusel tervelt seitsmeks domeeniks (joonis 2), milles on omavahel põimunud nii rRNA kui ka valgud (Wilson ja Nierhaus 2005).



Joonis 2. 50S subühiku tertsiaalstruktuur 23S ja 5S rRNA sekundaarstruktuuri domeenide paiknemise alusel halofiilses arhes *H. marismortui*. Kujutatud on domeenide I-VI paiknemine. VII domeeniks nimetatakse 5S rRNA-d. Joonis on pärit Bani artiklist (Ban 2000).

Ribosoomi koostisesse kuuluvad väikesed väga aluselised (keskmine pI on 10,1), 25-300 aminohapet sisaldavad valgud. Valkude positiivne laeng võib neil aidata interakteeruda rRNA negatiivselt laetud fosfaatrühmadega ning samuti on valgud olulised ribosoomi moodustumisel, täites arvatavasti tšaperoni rolli (Wilson ja Nierhaus 2005; Semrad, Green, ja Schroeder 2004). Kõigi väikese subühiku valkude (peale uS4 ja uS15) ja umbes poolte suure subühiku valkude aminohappejärjestustest sisaldavad rohkelt glütsiini (tagab valgu paindlikkuse) ning aluselisi aminohappeid (võimeline seonduma happelise rRNA-ga) (Wilson ja Nierhaus 2005).

Bakteri ribosoomis on struktuurseid valke kokku vähemalt 55, millest suure subühiku koosseisus on 33 valku ja ning väikesesse subühikusse kuulub 22 valku. Kolme suure eludomeeni - bakterite, arhede ja eukarüootide - vahel leidub homologseid ribosoomivalke: väikese subühiku koostises on sellised uS2-uS5, uS7-uS15, uS17 ja uS19 ning suure subühiku koosseisus uL1-uL6, uL10, uL11, uL13-uL16, uL18, uL22-uL24, uL29 ja uL30 (Ban et al. 2014). Ainult bakterites esinevad seitse väikese subühiku valku: bS1, bS6, bS16, bS18, bS20, bS21 ja bTHX ning lausa 15 suure subühiku valku: bL9, bL12, bL17, bL19-bL21, bL25, bL27, bL28, bL31-bL36 (Ban et al. 2014).

1.2. R-valkude paraloogidest bakterites

Paraloog geneetilisel tasemel tähendab duplitseerinud geeni, millest üks koopia täidab oma algset ülesannet ning teise funktsioon on tavaliselt sarnane algsega, kuid see võib ka pseudo-geenistuda või omandada täiesti uue funktsiooni (Jensen 2001).

Bakteritel on leitud mitmeid r-valkude paralooge, millest ühe geenijärjestus kodeerib tsinki siduvat motiivi, teisel see aga puudub (Yutin et al. 2012). Spekuleeritakse, et sellised valgud võivad olla osa vaba Zn^{2+} hulga regulatsioonist rakus. Seda on uuritud näiteks *Bacillus subtilis*'el, kelle bL31 paraloogide vahetus - tsinki sisaldav bL31A vahetatakse statsionaarses kasvufaasis ilma tsingita bL31B vastu – võimaldab tal tõenäoliselt kontrollida vaba Zn^{2+} hulka rakkudes (Nanamiya et al. 2004). Selline kontroll oleks vajalik, sest kuigi tsink aitab stabiliseerida nii DNA-d, RNA-d kui ka ribosome, moodustab nii valkude funktsioneerimiseks olulisi tsink-sõrmi ning toimib ka valkude kofaktorina, on ta suurtes kogustes vaba ioonina mürgine (MacDonald 2000). Võimalus asendada ribosoomis tsinki sisaldav paraloog tsingita paraloogiga lubaks esiteks kõrge tsingi kontsentratsiooni korral seda toksilisuse vältimiseks rakus säilitada r-valkude koosseisus. Teiseks spekuleeritakse, et kui tsingipuudusel kasutataks ribosoomides tsinki mittesiduvaid r-valke (nt bL31B), võimaldaks see tsinki siduvate valkude lagundamise ja seeläbi tsingiioonide vabanemise, mida saaksid kasutada teised valgud nagu DNA polümeraas (Panina, Mironov, ja Gelfand 2003).

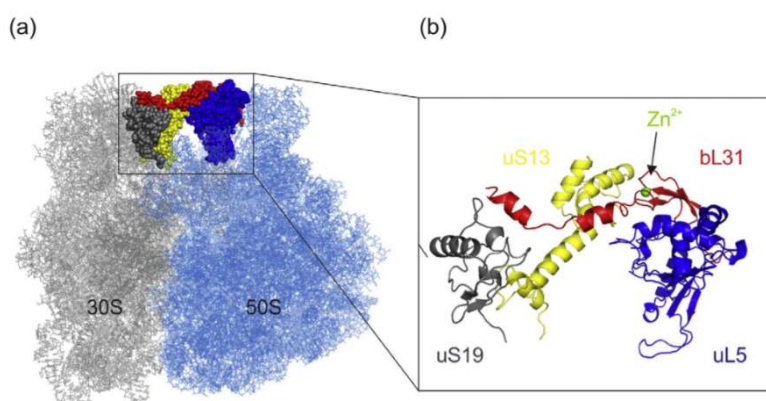
R-valkude paralooge leidub vähemalt pooltel bakteritel, kelle täisgenoom oli sekveneeritud enne 2012. aastat (Yutin et al. 2012). Kõige rohkem esineb paralooge suure subühiku valkudel bL31, bL33, bL36 ning väikese subühiku valgul uS14: kõigil juhtudel on üks paraloog võimeline seondama tsinki ning teine ei ole (Makarova, Ponomarev, ja Koonin 2001). *E. coli* genoomis on kahe r-valgu bL31 ja bL36 paraloogid ning paralooge esineb näiteks ka bakteritel *Bacillus subtilis* (S14 ja bL31) (Natori et al. 2007), *Streptomyces coelicolor* (uS14, bL18, bL28, bL31-33, bL36) (Owen et al. 2007) ja *Mycobacterium tuberculosis* (uS14, bS18, bL28 ja bL33) (Makarova, Ponomarev, ja Koonin 2001; Maciąg et al. 2007). Samas ei oma mõned r-valkude geenid üldse paralooge, näiteks bL9, bL20, bL27, bL35, bS6, bS20, S22, S31 geenid (Yutin et al. 2012).

1.3. *Escherichia coli* r-valgu bL31 paraloogid

E. coli valgul bL31 on kaks paraloogi: bL31A või bL31B. Neid kaht valku kodeerivad eri operonides olevad geenid: *rpmE* (213 bp) ja *ykgM* (264 bp) (Uniprot andmebaas; NCBI Nucleotide andmebaas). Kui *rpmE*-d sisaldavat operoni inhibeerib näiteks ppGpp (biocyc andmebaas), siis

transkriptsiooni *ykgM-ykgO* operonilt takistab DNA-le seonduv ZUR-Zn²⁺ transkriptsiooni repressor (Patzner ja Hantke 1998; Hemm et al. 2010). See repressor inhibeerib lisaks kahte Zn²⁺ raku sisenemise transportsüsteemi (Moore ja Helmann 2005).

Paraloogi bL31A valgujärjestus on 70 aminohapet pikk ja molekulmass 7871 daltonit, samas kui bL31B sisaldab 87 aminohapet ja on molekulmassiga 9920 daltonit (Uniprot andmebaas). Kahe aminohappejärjestuse omavaheline identsus on vaid 40% (NCBI BLASTp andmebaas). bL31 valk kuulub ribosoomi silla B1b koosseisu, moodustades bL5-ga dimeeri ning seondudes C-terminaalses osas valguga bS13 (joonis 3) (Jenner et al. 2010). Lisaks sellele, et valk bL31 moodustab silla B1b, on ta väidetavalt valkude S14 ja S19 vahendusel kontaktis ka sillaga B1c. Just valgu bL31 sidemed erinevate valkudega võivadki olla olulised 30S pea liikumise stabiiliseerimiseks, tagades ribosoomi subühikute koospüsümise, kuid säilitades translatsiooni toimimiseks vajaliku dünaamilisuse (Liu ja Fredrick 2016).



Joonis 3. Ribosoomi silla B1b asukoht (a) ja komponendid (b) *E.coli* 70S ribosoomis. (a) Sinisega on märgitud ribosoomi suur subühik 50S ja halliga väike subühik 30S. (b) B1b silla koosseisu kuuluvad bL31 (punane), uL5 (tumesinine), uS19 (hall) ja uS13 (kollane). Joonis on pärit artiklist Lilleorg et al. 2017. (Protein Data Bank 5AFI)

Spekuleeritakse, et bL31B valgul võiks olla biofilmi moodustamisel regulatoorne roll. Nimelt on tsinginäljas bL31B valku sisaldavatel rakkudel inhibeeritud Curli valgu süntees, mis on oluline biofilmi moodustumiseks, seetõttu on häiritud ka biofilmi teke (kasutati $\Delta ykgM$ tüve ja bL31B valguga tüve) (Lim et al. 2011). Paraloog bL31A sisaldab nelja tsüsteiini, mis on võimelised siduma tsinki (Cys16, Cys18, Cys37, Cys40), bL31B valk tsinki siduvaid tsüsteiine ei sisalda (Hensley et al. 2012).

Tsüsteiin on võimeline reageerima hapnikuradikaalidega, mille tulemusena võivad moodustuda disulfiidsillad (Murray ja Van Eyk 2012). Seega võivad bL31A valgus asuvad neli tsüsteiini oksüdatiivse stressi tingimustes Zn²⁺ sidumise asemel seonduda hoopis omavahel. Seda, kas

ribosoomidest selline defektne valk kõrvaldatakse ja asendatakse uuega (näiteks bL31B-ga), degradeeritakse või ei ole võimalike disulfiidsildade teke üldse oluline, ei ole teada.

2017. aastal avaldatud töös leiti, et mõlema bL31 paraloogi puudumine viib rakkude generatsiooni pikenemisele, samas ühe paraloogi kaotus ei põhjusta olulist generatsiooni muutust võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Lilleorg et al. 2017). Autorite sõnul võib see topeltdelatsioonitüve puhul olla tingitud vähenenud translatsiooni initsiatsioonist. Kuid märgati ka MGΔAB tüve sagenenud raaminihkeid ja stoppkoodoni läbilugemist.

Fan jt. tööst (Fan et al. 2015) saab järeldada, et suurenenud translatsioonivigade sagedus on *E.coli*'le oluline oksüdatiivsest stressist taastumiseks. Eksperimentideks konstrueeriti translatsioonil rohkem ja vähem vigu tegev tüvi võrreldes metsiktüübiga ning mõlemale tüvele rakendati lühiajaline oksüdatiivne stress vesinikperoksiidiga. Translatsioonil rohkem vigu tegeva tüve rakud tootsid rohkem erinevaid antioksidante, kui vähem vigu tegeva tüve rakud. Samuti sünteesisid need rohkem üldist stressivastuse valku RpoS, mis võimaldas neil rakkudel paremini stressist taastuda.

bL31 paraloogide olulisust oksüdatiivsest stressist taastumisel uuriti eelmisel aastal kaitstud magistritöös. Selles töös vaadeldi rakkude kasvu parakvaadiga tekitatud oksüdatiivses stressis tilkkülvide abil ning nende katsete põhjal näib, et bL31A sisaldav tüvi talub oksüdatiivset stressi paremini (Volõnkin, 2018).

Ribosoomi valku bL31 kodeerivad geenid on duplitseerinud mitmetes bakteriliikides, näiteks *Vibrio cholerae*'s, *Neisseria meningitidis*'es, *Bacillus subtilis*'es (Makarova, Ponomarev, ja Koonin 2001). Mõlemalt geenilt toimub *E.coli*'s ka funktsionaalsete valkude süntees (Hensley et al. 2012). *B. subtilis*'est eraldatud ribosoomide valguanalüüsil RFHR (radical free and highly reducing) 2D polüakrüül geel elektroforeesil selgus, et eksponentsiaalses kasvufaasis on ribosoomide koosseisus peaaesjalikult valk *RpmE* (bL31A) ja statsionaarses faasis *YtiA* (bL31B) (Nanamiya et al. 2004). *E. coli* puhul on jõutud sarnase tulemuseni, kui SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) massispektromeetriga tuvastati, et eksponentsiaalses kasvufaasis on ribosoomides ülekaalus valk bL31A ja statsionaarses kasvufaasis bL31B (Lilleorg et al. 2019). Töö autorid spekulatsioonivad, et selline vahetus võiks toimuda ribosoomides ühe valgu vahetamisega teise vastu. Seda mõtet toetab Pulki ja kolleegide töö, kus näidati, et osad r-valgud (nt. bL31 ja bL36 *E.coli*'l) on ribosoomides statsionaarses kasvufaasis stressi tingimustes võimelised vahetuma (Pulk et al. 2010). Samas on võimalus, et paraloogide osakaalude

muutus ribosoomides toimub uute ribosoomipartiklite sünteesil, kuid selline meetod on aeglasem kui valguvahetus olemasolevatel ribosoomidel.

1.4 Ribosoomide heterogeensus

Heterogeensus tähendab koostiselt või tekkelt ebaühtlane, erisugune - ribosoomi kontekstis peetakse silmas seda, et need võivad ühe organismi piires erineda nii rRNA, r- Valkude kui ka rRNA ja r- Valkude erinevate modifikatsioonide poolest (Nesterchuk, Sergiev, ja Dontsova 2011; Ferretti ja Karbstein 2019). rRNA võib olla sünteesitud erinevatelt operonidelt või olla alterantivse modifikatsioonimustriga, r- Valkude stöhhimeetria võib olla erinev, neil võib olla erinev modifikatsioonide muster või paralooigid, nagu ka antud töös uuritava bL31 puhul (Ferretti ja Karbstein 2019). Küsimus seisneb heterogeensete ribosoomide bioloogilises rollis. Levinuima teooria kohaselt võiksid heterogeensed ribosoomid käituda filtritena erinevate mRNA-de translatsioonil ehk nii nimetatud spetsialiseerunud ribosoomid seovad mRNA-sid eri efektiivsusega, „valides“ ja transleerides mRNA-sid eri efektiivsusega (Mauro ja Edelman 2002). Spetsialiseerunud ribosoom on selline, mille koostis on erinev klassikalisest ribosoomist ning seetõttu muutub midagi ribosoomi aktiivsuses ja see väljendub teistsugustes valgusünteesi parameetrites, nt translatsiooni täpsuses ja initsiatsiooni efektiivsuses vms (Ferretti ja Karbstein 2019). On leitud, et stoppkoodoni läbilugemine võib olla statsionaarses faasis rakule kasulik, nimelt UGA koodonit läbilugevad rakud kasvavad statsionaarses faasis kiiremini (Fan et al. 2017). Sellele tuginedes võiks ka rohkem ja vähem vigu tegevad ribosoomid olla rakule kasulikud erinevatel tingimustel.

E. coli's on 7 sarnast rDNA operoni, mille promootorid ja nende regulaatorid on erineva järjekorraga ning see võimaldab suunata eri rRNA-de sünteesi erinevates keskkonnatingimustes (Ferretti ja Karbstein 2019). Näiteks on üks operonidest oluline toitainepuuduses, kus erinevus rDNA järjestuses viib lõpuks muutunud geeniekspressioonini võimaldamaks rakul ellu jääda (Kurylo et al. 2018). *E. coli*'s esineb rRNA modifikatsioonidest peamiselt lämmastikaluste või 2' hüdroksüülrühmade metüleerimine ja uridiini konverteerimine pseudouridiiniks (Ψ) (Decatur ja Fournier 2002). Samas ei ole teada, et modifikatsioonide mustri muutmine (heterogeensus) oleks bakterirakule eluks vajalik.

Paljusid ribosoomivalke sünteesitakse rakkudes erineval tasemel sõltuvalt raku kasvufaasist (Xue ja Barna 2012). Ribosoomid võivad *E. coli*'s olla r- Valkude tasemel heterogeensed nii paralooigide, posttranslatsiooniliste modifikatsioonide kui stöhhimeetria poolest (Ferretti ja

Karbstein 2019). *E.coli*'l on kahe paraloogse r-valgu bL31 ja bL36 puhul täheldatud, et eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse faasi minekul väheneb bL31A valgu osakaal ribosoomides, samal ajal kui bL31B valku sisaldavate ribosoomide osakaal tõuseb (Lilleorg et al. 2019).

Ribosoomi valkude posttranslatsiooniliste modifikatsioonide alla kuuluvad nii metüleerimine, atsetüleerimine kui ka metüültioleerimine ja on teada, et need modifikatsioonid ei ole ribosoomide jaoks elutähtsad. Levinuim modifikatsioon *E. coli*'s on N-terminaalsest osast metioniini eemaldamine (Nesterchuk, Sergiev, ja Dontsova 2011).

Lisaks eelnimetatule on ribosoomides tuntud rakkude toksiin-antitoksiin kompleksi *mazEF* kuuluv toksiin *MazF* (endonukleas), mis on võimeline lagundama mRNA-d ACA saidi lõikamise läbi ja aeglustama seeläbi stressi tingimustes nii raku kasvu (Nikolic, Didara, ja Moll 2017). Lisaks *MazF* võimele mRNA-d lagundada, võib ta teatud järjestustel lagundada vaid 30S subühikuga seonduva mRNA liiderjärjestuse ja modifitseerima ribosoomi nii, et nad tunneksid ära just selle järjestuse. Üheks selliseks on *grcA* mRNA, mille liiderjärjestus stressitingimustes lõigatakse ning millega on võimeline seostuma *MazF* poolt modifitseeritud ribosoomid (30-terminus 16S rRNA-l puudub) (Nikolic, Didara, ja Moll 2017; Vesper et al. 2011).

Ribosoomide heterogeensus on bakterite hulgas levinud nii rRNA kui r-valkude tasemel, kuid selle bioloogilise rolli kohta on vähe andmeid.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärk on kindlaks teha, kas/mis mõju on *E. coli* paraloogsetel valkudel bL31A ja bL31B bakteri kasvufenotüübile erinevates keskkonnatingimustes.

Bakteriliikide *E. coli* ja *B. subtilis* puhul on näidatud, et eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes on ülekaalus bL31A valk, statsionaarses faasis aga bL31B (Lilleorg et al. 2019; Nanamiya et al. 2004). Kas sellisel vahetusega kaasneb rakule mõni kasvueelise peale tsinginäljaga toimetuleku, ei ole veel teada (Nanamiya et al. 2004).

Hüpoteesi kohaselt mõjutavad bL31 paraloogid *E. coli* kasvu eri tingimustes. Eesmärgi saavutamiseks uuriti rakkude taastumist vesinikperoksiidi tööstlusest nii rikkal (LB) kui ka vaesel söötmel (M9+0,4% glükoos) 37°C, 30°C, 25°C juures, tuvastamaks bL31A valku sisaldavate rakkude võimalikku kasvufenotüübi muutust oksüdatsiooniprotsesside tagajärjel. Samuti uuriti rakkude elumust statsionaarses faasis (16 päeva jooksul) kahel süsinikuallika poolest erineval vaesel söötmel kahel temperatuuril (37°C ja 25°C), selgitamaks võimalikku bL31B valku sisaldavate rakkude kasvueelise statsionaarse kasvufaasis.

Eksperimentide eesmärk oli välja selgitada, kas mõlema paraloogi olemasolul bakteritüves (metsiktüüpi tüvi), ainult bL31A-d või bL31B-d kodeerivates tüvedes või ilma bL31 paraloogideta tüve vahel on kasvufenotüübis erinevuseid.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Bakteritüved ja söötmed

Töös on kasutatud kuut bakteritüve (tabel 1), sh bL31 paraloogide üksikdeletsioonitüvesid (MGΔA, MGΔB) ja kaksikdeletsioonitüve (MGΔAB). Selleks, et võrrelda eraldi kas bL31A või bL31B valgul on mõju rakkude kasvule, kasutati MGΔAB bakteritüvesid, mille kromosoomi oli lambda faagi integratsioonikohta viidud *tac* promootori kontrolli alla kas bL31A-d (*rpmE*) või bL31B-d (*ykgM*) kodeeriv geen. Sellised tüved võeti kasutusele, et tagada mõlema valgu ühesugune ekspressioon rakkudes. Tulenevalt tüvede tegemiseks kasutatud CRIM meetodikast (inglise keelne lühend *conditional-replication, integration, and modular plasmids*, eesti keeles replikatsioonist sõltuvad, integreeritavad, modulaarsed plasmiidid (Haldimann ja Wanner 2001)) nimetatakse neid tüvesid CRIM-A ja CRIM-B.

Tabel 1. Bakteritüved

bakteritüvi	genotüüp	viide
MG1655	MG1655 Δ lacZ Δ lacI::kan	Aivar Liiv
MG Δ A	MG1655 Δ rpmE::kan	Aivar Liiv
MG Δ B	MG1655 Δ ykg::kan	Aivar Liiv
MG Δ AB	MG1655 Δ lacZ Δ lacI Δ rpmE Δ ykgM::kan	(Lilleorg et al. 2017)
CRIM-A	MG1655 Δ lacZ Δ lacI Δ rpmE Δ ykgM::kan::rpmE	Aivar Liiv
CRIM-B	MG1655 Δ lacI Δ lacZ Δ rpmE Δ ykgM::kan::ykgM	Aivar Liiv

Töös kasutati kolme söödet. Rikas sööde oli Lysogeny broth'i sööde (LB), mis sisaldab 0,5% pärmiekstrakti, 1% trüptooni, 1%NaCl (Bertani, 1951), tardsööde lisaks 1,7% agarit.

Lisaks rikkale söötmele kasutati vaest söödet M9 baasil (Sambrook et al. 1987), milles varieeriti C-allikat. M9+0,4%glükoos vedelsööde sisaldas 1xM9 soolasid (47,8mM Na₂HPO₄*2H₂O, 22,1mM KH₂PO₄, 8,6mM NaCl, 18,7mM NH₄Cl), 2mM MgSO₄, 0,4% glükoosi, 0,1mM CaCl₂, 1mg/ml tiamiini, tardsöötmele lisati 1,5% agarit. Teise süsinikuallikana kasutati M9 söötmes glükoosi asemel 0,2% glütserooli.

2.2.2. Optimaalse H₂O₂ kontsentratsiooni leidmine bakterirakkude kasvu oksüdatiivsest stressist taastumise uurimiseks

Eksperimendi protokollil väljatöötamisel lähtuti Fani ja kolleegide tööst, mida on täiendatud ajapunktide ja vesinikperoksiidi kontsentratsiooni osas vastavalt eelkatsete tulemustele (Fan et al. 2015). Selles töös tekitati rakkudele lühiajaline stress (0h, 1h, 2h ja 3h juures) 5mM lõppkontsentratsiooniga H₂O₂-ga ning hinnati rakkude kasvu taastumist stressist tilkkülvanalüüsi abil.

Eelkatsed seisnesid selles, et -80°C juurest võetud rakud, kasvatati sobival temperatuuril (37°C). Kolooniad inokuleeriti vastavalt eelkatse sisule kas LB või M9+0,4% glükoos söötmesse, rakkudel lasti kasvada kuni OD₆₀₀ oli vähemalt 1,5. Järgnevalt lahjendati rakukultuure kuni OD₆₀₀=0,1 ja kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi (OD₆₀₀≈0,4...0,9). Seejärel rakud tsentrifugeeriti (Hettich ROTINA 420r - 4000rpm, 22°C, 10 min), eemaldati sööde ja pesti rakud kahel

korral fosfaatpuhvriga (83mM, pH7, valmistatud 0,5M NaPO₄ puhvrist (0,5M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,5M NaH₂PO₄ x H₂O)). Fosfaatpuhvris olevaid eksponentsiaalse kasvufaasi rakke töödeldi sobiva lõppkontsentratsiooniga H₂O₂-ga mahus 50µl ning töötuse kestus oli määratud juba eelkatse tingimustega. Pärast H₂O₂ töötust rakususpensioon lahjendati (10⁰-10⁻⁵) fosfaatpuhvris, külvati LB söötmeplaatidele (külvimäär 4,5 µl) ning kasvatati 37°C juures.

Esimeses eelkatses töödeldi metsiktüüpi rakke (MG1655) nelja H₂O₂ lõppkontsentratsiooniga (0mM, 2,5mM, 5mM ja 10mM). Töötus kestis kas 0h, 1h, 2h või 3h vastavalt eelpoolmainitud Fan'i ja kolleegide tööle.

Teise eelkatse protokoll oli sama, mis esimeses eelkatses, kuid nüüd kasutati kahte söödet: LB ja M9+0,4% glükoos ja kolme ajapunkti: **0h, 0,5h ja 1h**. Selles katses tsentrifugeeriti rakud peale töötust lauatsentrifuugil rakud tuubi põhja ning eemaldati fosfaatpuhver, mis sisaldas vesinikperoksiidi ja rakud suspendeeriti värskes fosfaatpuhvris. Selle eesmärk oli kindlustada see, et tilkkülvanalüüsi väljakülvid ei sisaldaks H₂O₂ ja tegemist oleks tõesti lühiajalise stressiga.

Kolmandas eelkatses kasutati nii metsiktüüpi kui ka MGΔAB rakke, mida kasvatati 37°C juures kahel söötmel (LB ja M9+0,4%glükoos). Tilkkülv (4,5µl) tehti lahjendustest 10⁰-10⁻⁵. Ka selles katses tsentrifugeeriti rakud pärast H₂O₂ töötuse lõppu, eemaldati fosfaatpuhver koos vesinikperoksiidiga ja lisati uus vesinikperoksiid. Kuna aga rakke oli vähe ja neid eemaldati fosfaatpuhvriga koos liiga palju, otsustati sellest edaspidi loobuda.

Vesinikperoksiidi töötus viidi läbi: 0mM, 13mM, 28mM ja 69mM lõppkontsentratsioonidega, mis on arvutuslikud. Kontsentratsioonid on veidi kummalised, kuna alguses kasutati lahjenduste arvutamiseks vale vesinikperoksiidi algkontsentratsiooni, töös on esitatud õiged lõppkontsentratsioonid lahuses. Selle eelkatse tulemuste põhjal otsustati edasistes katsetes kasutada lahustes H₂O₂-d lõppkontsentratsiooniga **10mM**.

Viimaks viidi katse läbi kõikide tüvedega (MG1655, MGΔA, MGΔB, MGΔAB, CRIM-A, CRIM-B). Katses kasutati eelnevalt valitud vesinikperoksiidi kontsentratsiooni (lõppkontsentratsioon 10mM), tilkkülvatud rakke (väljakülv 4,5µl, lahjendused **10⁻¹-10⁻⁶**) kasvatati 37°C juures kahel söötmel (LB, M9+0,4%glükoos). Peale töötuse lõppu tehti **lahjendused** tavapärase fosfaatpuhvri asemel katses kasutatud **värskesse söötmesse** ning lahjenduste rida plaatimisel algas **10⁻¹**-st, selleks, et minimaliseerida tilkkülvis sisalduv H₂O₂ hulk.

2.2.3. Tilkkülvanalüüs rakkude oksüdatiivsest stressist taastumise hindamiseks

Kõik katsed viidi läbi kuue bakteritüvega kolmel temperatuuril (37°C, 30°C ja 25°C) ja kahes söötmes (LB ja M9+0,4% glükoos) alates -80°C juures hoiustatud rakkude üleskasvatamisest tardsöötmel.

LB tardsöötmele inokuleeriti üks koloonia 2 ml katsetingimustele vastavasse vedelsöötmesse (LB või M9+0,4% glükoos) ning kasvatati üleöö (vähemalt OD₆₀₀ 1,5). Järgnevalt tehti 5ml mahus lahjendused värskesse söötmesse lõpptihedusega OD₆₀₀ 0,1 ning rakud kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi (OD₆₀₀ 0,4...0,9). Oluline oli, et konkreetsetel katsetingimustel oleks tüvedel sarnased OD₆₀₀ väärtused.

Rakke pesti kaks korda fosfaatpuhvriga (83mM, pH7, valmistatud 0,5M NaPO₄ puhvrist (0,5M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,5M NaH₂PO₄ x H₂O)), tsentrifuugiti (4000rpm, 22°C, 10 min), supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 5ml fosfaatpuhvrisk. Rakussuspensioon lahjendati kolme tuubi vastavalt järgnevale H₂O₂ töötamise kestusele (0h, 0,5h, 1h) nii, et 1,03ml OD₆₀₀ 0,1.

Nullajapunkti proovidele lisati 50 µl 83mM fosfaatpuhvrisk ja nii 0,5h kui ka 1h proovidele lisati 50 µl 0,2M vesinikperoksiidi (lõppkontsentratsioon 10mM (950µl lahusele lisati H₂O₂)). Töötlus toimus valitud temperatuuril 0,5h või 1h.

Pärast H₂O₂ töötlust tehti suspensioonidest 10x lahjenduste rida (10⁻¹-10⁻⁶) värskesse söötmesse (lõppruumala 200 µl) mikrotiiterplaadil. Tilkkülvanalüüsiks kanti igast lahjendusest 4,5µl söötmeplaadile, rakke kasvatati valitud temperatuuril. Eksperimenti korrati kolm korda. Rakkude kasvu hinnati kvalitatiivselt, võrreldes omavahel ühel plaadil olevaid tüvesid ja eri plaatidel olnud korduseid.

2.2.4. Surnud ja elusrakkude osakaalu hindamine FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) analüüsiga

Kõik katsed viidi läbi nelja tüvega (MG1655, MGΔAB, CRIM-A, CRIM-B) kahel temperatuuril (37°C ja 25°C) ja söötmes (M9+0,4% glükoos, M9+0,2% glütserool). Eksperimenti läbiviimiseks kasutati üht temperatuuri alates -80°C juures hoiustatud rakkude üleskasvatamisest kanamütisiiniga (50µg/ml) LB tardsöötmel. Rakud inokuleeriti sobivasse M9 vedelsöötmesse (3 ml) ning kasvatati üleöö või kuni OD₆₀₀ oli vähemalt 1,5 (25°C juures kasvasid rakud kuni paar ööpäeva).

Üleöökultuuridest tehti lahjendused OD₆₀₀ ≈ 0,1 100ml kolbidesse lõppruumalaga 20ml. Kolvid kaaluti enne ja pärast söötme ja rakukultuuri lisamist. Järgnevalt kaaluti kolvid igal korral peale

proovi võtmist. See võimaldas vajadusel lisada kolbidesse MQ vett, mis kahe proovi võtmise vaheajal oli aurustunud.

Rakukultuur kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi (OD_{600} 0,4...0,8) ja võeti esimene ehk 0 päeva proov (300 μ l). Edaspidi võeti proov iga nelja päeva tagant (4., 8., 12. ja 16. päeval). Proovide optiline tihedus mõõdeti ja valmistati lahjendused OD_{600} 0,02-ni 100 μ l mahus.

Seejärel bakterirakud värviti, kasutades kaht fluorestseeruvat värvi: SYTO9 (roheline fluorestsents) ja propiidiumjodiid (PI, punane fluorestsents), mis olid pärit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit komplektist (invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Värvid segati omavahel järgnevalt: 140 μ l-le söötmele (samale, mis katses kasutusel) lisati 4,2 μ l SYTO9 (3,34mM) ja 4,2 μ l PI-d (20mM). Bakterikultuuri lahjendusele (OD_{600} 0,02, 100 μ l) lisati 5 μ l värvisegu ning inkubeeriti termostaadil (30°C, 350 rpm, 30 min). Värvitud rakud viidi rakusorterrisse (FACS analüüs), mis luges rakkudelt tulnud fluorestsentsignaali. „Elus“ ja „surnud“ rakkude osakaalude leidmiseks vajalikud piirid määrati, kasutades surnud rakkude populatsiooni (kuidas surnud rakud graafikul paiknesid). Elus rakkudeks nimetatakse terve membraaniga ja surnud rakkudeks kahjustatud membraaniga rakke.

FACS analüüs viidi läbi kasutades FACS Aria I (BD Biosciences, USA) rakusorterit, mis mõõtis \approx 30 000 bakterirakku igas proovis. Fluorestsentsvärvide ergastamiseks kasutati sinist laserit (488nm) nominaalse võimsusega 20mW. SYTO9 fluorestsents (roheline fluorestsentsignaali) tuvastati kasutades 530/30nm optilist filtrit ja PI (punane fluorestsentsignaali) fluorestsentsi tuvastamiseks kasutati 585/42nm optilist filtrit.

2.2.4.1. Andmeanalüüs

Iga proovi kohta arvutati elus ja surnud rakkude summast mõlema alapopulatsiooni osakaal (valem 1 ja 2). Rakkude osakaalu arvutamiseks kasutati valemeid:

$$1) \quad \text{Surnud rakkude osakaal} = \frac{\text{Surnud rakkude arv}}{\text{Surnud rakkude arv} + \text{Elus rakkude arv}}$$

$$2) \quad \text{Elusrakkude osakaal} = \frac{\text{Elus rakkude arv}}{\text{Surnud rakkude arv} + \text{Elus rakkude arv}}$$

Surnud rakkude osakaalu muutuse interpreteerimiseks lahutati katse algpäeval (0 päeva proov) saadud surnud rakkude osakaal kõigil ülejäänud päevadel saadud surnute osakaalust, sest katse eesmärk oli uurida surnud rakkude osakaalu muutust asjas.

Elusrakkude osakaalud eri ajapunktides normaliseeriti sama tüve 0 päeva elusrakkude osakaalude suhtes.

Tüvede vaheliste ja tüvesiseste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks kasutati Studenti T-testi. Tüvesiseste surnud ja elusrakkude osakaalude muutuste olulisust iga nelja päeva tagant hinnati paaris T-testi kasutades, erinevuseid tüvede vahel hinnati kolmandat tüüpi T-testi kasutades (erineva varieeruvusega grupid). Mõlemal juhul rakendati mõlemapoolset testi, st huvituti elus ja surnud rakkude osakaalu mõlemapoolsest muutusest.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Rakkude kasvu taastumine pärast oksüdatiivset stressi

Ribosoomide heterogeensus võiks olla rakkudele oluline stressiga toimetulekuks (Genuth ja Barna 2018). Kuna mitme sama funktsiooniga geeni järjestuse hoidmine genoomis ja ekspresseerimine, on rakule kulukas, siis võiks bL31 valkude vahel olla funktsionaalne erinevus, mis võiks anda rakule eelise kasvuks teatud stressitingimustes. Samas on ka variant, et bL31 on raku jaoks nii oluline valk, et seda hoitakse rakus alles kahe variandina, mis erinevad nii suuruselt kui aminohappejärjestuselt, kuid mõjuvad rakule sarnaselt.

2.3.1.1. Optimaalsete katsetingimuste leidmine lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumise uurimiseks

Eelkatsete eesmärk oli leida rakkude lühiajaliseks töötluks sobiv H_2O_2 kontsentratsioon ja töötlu aeg. Sobiv vesinikperoksiidi kontsentratsioon ja aeg olid sellised, mille juures oli sama tüve piires näha lahjendustes kolooniate arvu vähenemist erinevates ajapunktides.

Üleöökultuuridest (OD_{600} vähemalt 1,5) tehti lahjendused $OD_{600} \approx 0,1$ ning kasvatati rakud eksponentsiaalsesse kasvufaasi (OD_{600} 0,4...0,9). Rakke pesti kaks korda fosfaatpuhvriga ning lahjendati $OD_{600} \approx 0,1$. Rakususpensioonile lisati valitud lõppkontsentratsiooniga vesinikperoksiid (0mM proovidele lisati fosfaatpuhver). Töötluks määratud aja lõppedes tehti proovidest mikrotiiterplaadile 10 kordsed lahjendused, mis tilkkülvati söötmeplaadile.

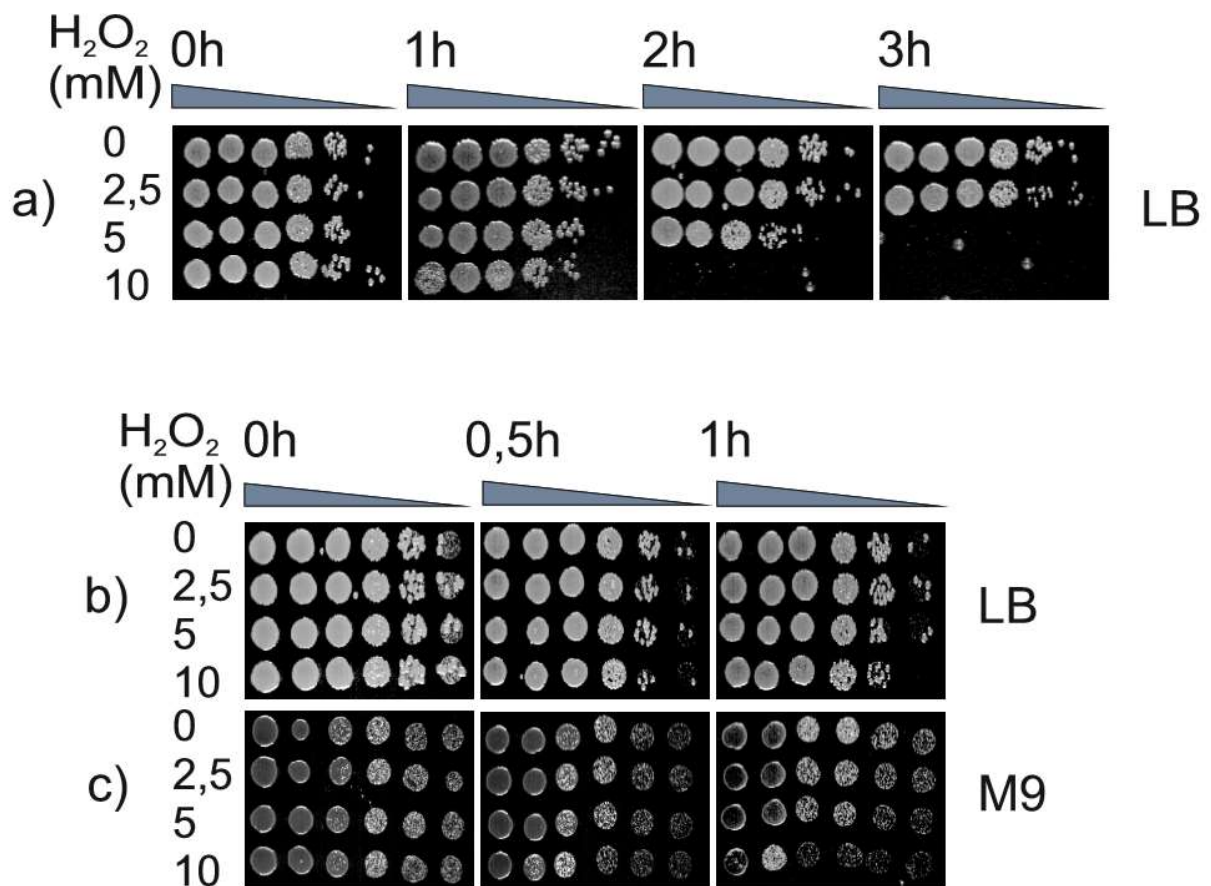
Esimeses eelkatses töödeldi metsiktüüpi rakke (MG1655) 37°C juures LB söötmel erineva lõppkontsentratsiooniga vesinikperoksiidi lahustega, mis valiti Fani ja kolleegide eeskujul (Fan et al. 2015): 0mM, 2,5mM, 5mM ja 10 mM, töötlus kestis 0h, 1h, 1h või 3h.

See eelkatse näitab, et 2,5mM lõppkontsentratsiooniga vesinikperoksiid metsiktüüpi rakkude kasvule erilist mõju ei avalda (visuaalselt sama nagu ilma peroksiidita tilkkülvid) (joonis 4a). Pärast kahtunnist töötlust 5mM vesinikperoksiidiga oli näha, et elujõulisi rakke on vähem võrreldes 2,5mM lõppkontsentratsiooniga H₂O₂ töödeldud rakkudega. 10mM vesinikperoksiidiga töödeldud rakkude kasv taastub peale tunnipikkust H₂O₂ töötlust, kuid peale kahte tundi enam mitte.

Esimese eelkatse põhjal otsustati muuta vesinikperoksiidi töötamise aega. Teises eelkatses töödeldi rakke 0h, 0,5h ja 1h ning lisaks LB söötmele kasutati vaest M9+0,4% glükoos söödet. Ülejäänud tingimused (temperatuur, H₂O₂ lõppkontsentratsioonid) jäid samaks.

Rakkude kasv LB söötmel on sarnane erineva pikkusega H₂O₂ töötamise (0h, 0,5h, 1h) vahel (joonis 4b ja 4c). Ka vaesel söötmel kasvavad metsiktüüpi rakud olenemata H₂O₂ kontsentratsioonist ja töötamise kestvusest üldiselt samamoodi, välja arvatud pärast 1h töötust 10mM lõppkontsentratsiooniga H₂O₂-ga, kui rakkude kolooniaid on vähem.

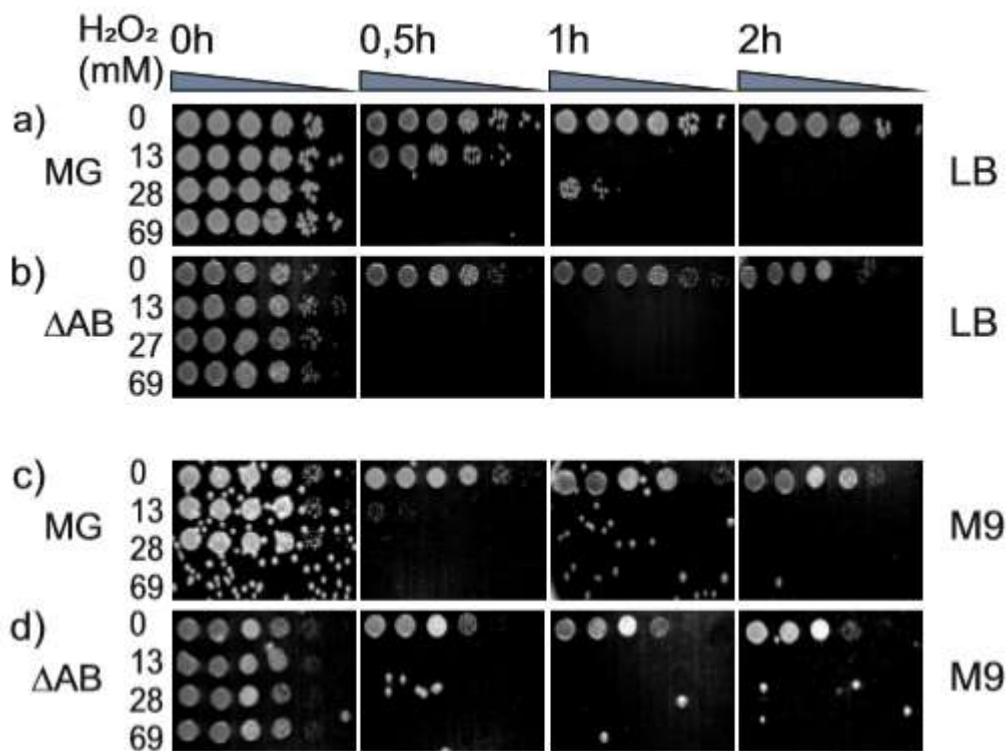
Katse tulemusel leiti, et edaspidi tuleks kasutada vähemalt 10mM H₂O₂, lahjenduste vahel ei olnud näha erilist muutust (joonis 4b ja 4c).



Joonis 4. *E. coli* metsiktüüpi (MG1655) rakkude taastumine H_2O_2 töötlustest $37^\circ C$ juures. Eksponentsiaalses kasvufaasis rakke töödeldi vesinikperoksiidiga, mille lõppkontsentratsioon lahuses oli 0mM (fosfaatpuhver), 2,5mM, 5mM või 10mM. Esimeses eelkatses (a) kestis töötlus kas 0h, 1h, 2h või 3h ning pärast töötlust kasvatati rakke rikkal LB söötmel. Teises eelkatses (b ja c) valiti töötluste kestvuseks 0h, 0,5h ja 1h ning kasutati nii rikast LB söödet (b) kui ka vaest M9+0,4%glükoos söödet (c).

Järgnevalt otsustati kasutada kõrgemat vesinikperoksiidi lõppkontsentratsiooni (0mM; 13mM; 28mM; 69mM) ja kahte tüve (MG1655 ja $MG\Delta AB$). Metsiktüüpi tüve kasutamine andis võimaluse näha, kuidas plaanitava eksperimendi eeldatavasti kõige paremini vesinikperoksiidi töötlust taluvad rakud sellest taastuvad. Sellele vastukaaluks kasutati bL31AB puudulikku tüve, mis võiks olla vesinikperoksiidi töötlustele kõige tundlikum (varasemalt näidatud tüve pikemat generatsiooniaega (Lilleorg et al. 2017)). Vesinikperoksiidil lasti mõjuda 0h, 0,5h, 1h ja 2h.

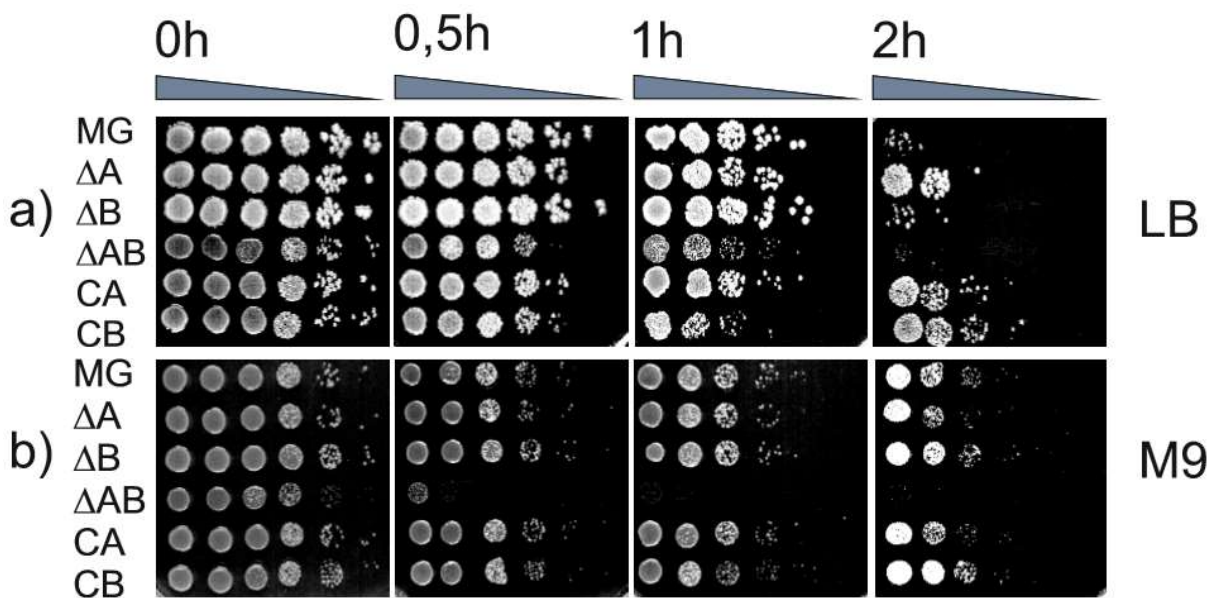
Kuna rakud põhimõtteliselt ei kasvanud neil kontsentratsioonidel (MG kasvas 13mM juures LB söötmel 0,5h töötluste järel (joonis 5a)), siis otsustati jääda 10mM vesinikperoksiidi lõppkontsentratsiooni juurde.



Joonis 5. Metsiktüüpi (MG1655) ja bL31 topeltdeletsioonitüve (MGΔAB) rakkude kasvu taastumine H₂O₂ tötlusest temperatuuril 37°C. Rakke töödeldi vesinikperoksiidiga, mille lõppkontsentratsioon lahuses oli 0mM, 13mM, 28mM või 69mM. Töötuse kestis 0h, 0,5h, 1h ja 2h. Kasutati järgmisi keskkonnatingimuste kombinatsioone: metsiktüüpi rakud (MG1655) rikkal söötmel LB (a) ja vaesel söötmel M9+0,4%glükoos (c) ning MGΔAB tüvi rikkal söötmel (b) ja vaesel söötmel (d).

Viimaks tehti katse kõigi uuritavate tüvedega: MG1655, MGΔA, MGΔB, MGΔAB, CRIM-A, CRIM-B (joonis 6). Vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioon oli 10mM, temperatuur 37C ja töötus kestis 0h, 0,5h, 1h ja 2h, kasutati kahte söödet (LB ja M9+0,4% glükoos).

Katse põhjal on näha, et erinevate ajapunktide jooksul rakud enam suuremates lahjendustes ei kasva, mis annab kinnitust sellest, et vesinikperoksiidi töötus mõjutab rakkude kasvu. Järeldati, et töötus 10mM vesinikperoksiidiga 0,5h ja 1h jooksul on piisav, et välja tuua võimalikud erinevused kasvufenotüübis. 2h ajapunkti ei kasutatud, kuna rakkude kasvus esines anomaaliaid (näiteks LB söötmel MG tüvi) (joonis 6).

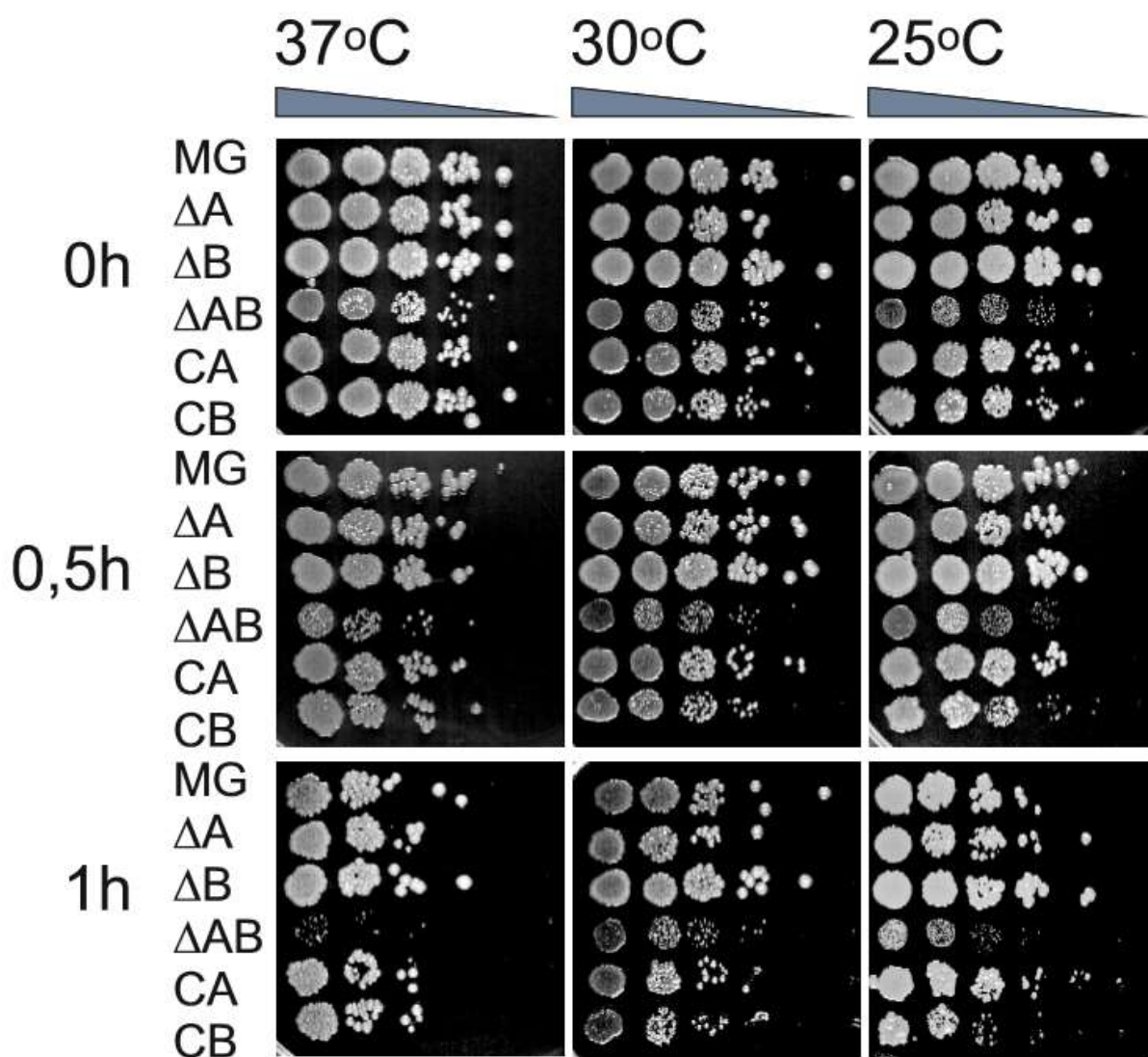


Joonis 6. Rakkude taastumine 10 mM H_2O_2 töötlustest temperatuuril 37°C. Kasutati kuut bakteritüve: MG (MG1655), ΔA (MG ΔA), ΔB (MG ΔB), ΔAB (MG ΔAB), CA (CRIM-A), CB (CRIM-B). Vesinikperoksiidi töötlus kestis 0h, 0,5h, 1h või 2h. Katse viidi läbi kahel erineval söötmel: LB (a) ja M9+0,4% glükoos (b).

2.3.1.2. bL31 paralooide mõju rakkude kasvu taastumisele H_2O_2 töötlustest

Eksperimentides kasutati tüvesid MG1655, MG ΔA , MG ΔB , MG ΔAB , CRIM-A, CRIM-B. Katsete läbiviimiseks kasutati kolme erinevat temperatuuri: 37°C, 30°C ja 25°C. Rakke töödeldi 10mM lõppkontsentratsiooniga vesinikperoksiidiga.

LB söötmel kasvavad ilma töötlusteta rakud järgmiselt (joonis 7). **37°C juures** on tüvede MG, MG ΔA , MG ΔB , CRIM-A ja CRIM-B kasv sarnane ja MG ΔAB tüve kolooniad on väiksemad, mis viitab võimalikule pikemale generatsiooniajale. **30 °C juures** kasvavad omavahel sarnaselt MG, MG ΔA ja MG ΔB ning MG ΔAB , CRIM-A ja CRIM-B, kusjuures viimase rühma kolooniad on väiksemad kui esimese kolmiku omad. **25°C juures** kasvavad endiselt sarnaselt kolm esimest tüve MG, MG ΔA , MG ΔB . Kui 30 °C juures kasvasid CRIM-A ja CRIM-B sarnaselt MG ΔAB tüvega, siis 25°C juures on topeltdelatsioonitüve kolooniad märgatavalt väiksemad CRIM-tüvede omadest.



Joonis7. Tüvede MG, ΔA , ΔB , ΔAB CRIM-A (tähistatud CA) ja CRIM-B (tähistatud CB) taastumine 10mM H_2O_2 tötlusest temperatuuridel 37°C, 30°C, 25°C. Vesinikperoksiidi tötlus kestis 0h, 0,5h, 1h ning rakke kasvatati LB söötmel. Eksperiment viidi läbi kolm korda ning joonisel on esitatud üks pilt kolmest.

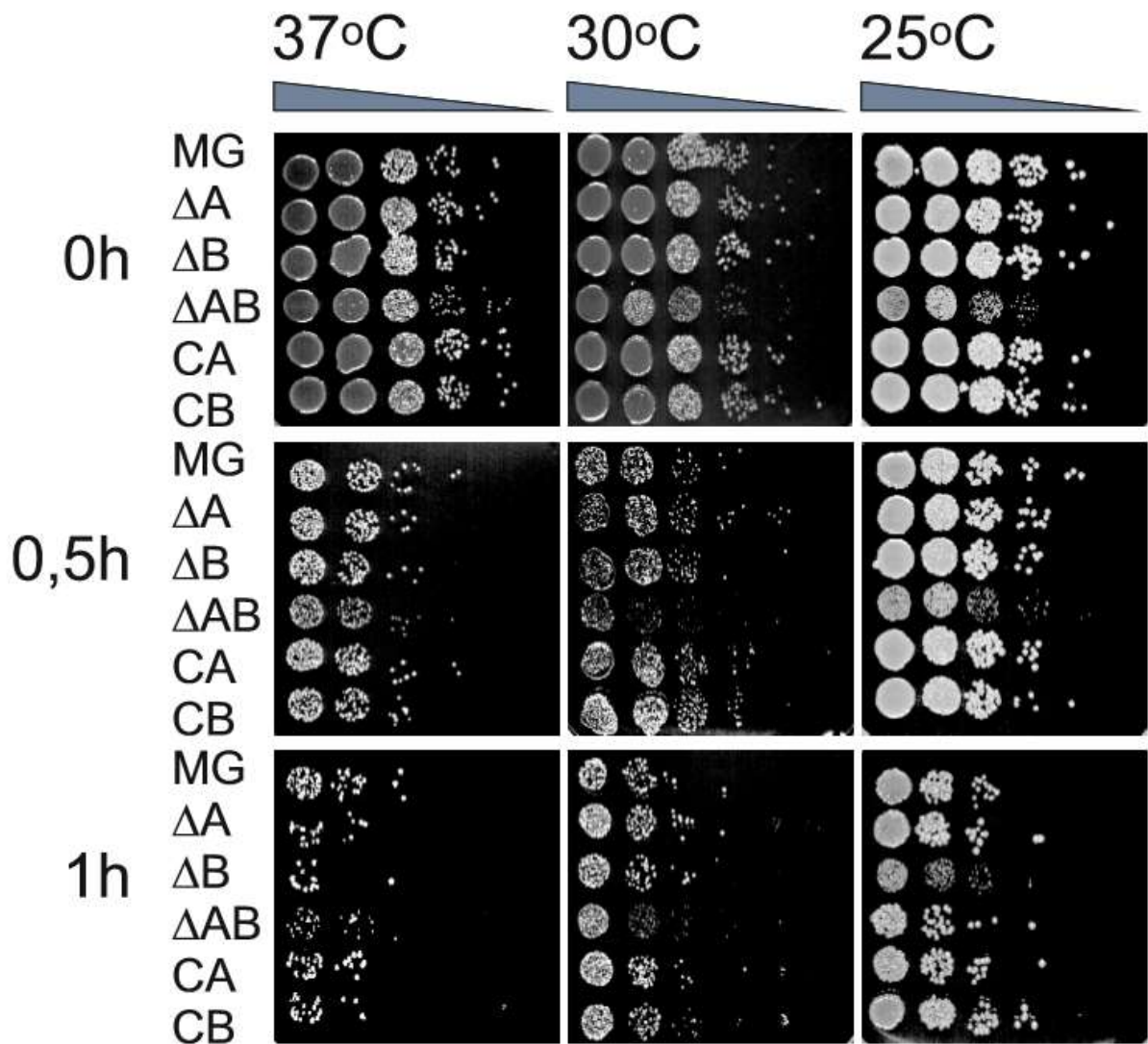
37°C juures LB söötmel on pärast vesinikperoksiidiga tötlust kolooniaid moodustavate rakkude arv vähenenud: kui töötlemata rakud kasvasid ka lahjenduses 10^{-5} , siis pärast poole tundi tötlust on moodustunud kolooniad lahjenduseni 10^{-4} , ühetunnise tötluse järel lahjenduseni 10^{-3} . Seega H_2O_2 tötluse tulemusena osad rakud surevad. Pooletunnise ja tunnise vesinikperoksiidi tötluse järel taastuvad vesinikperoksiidi tötlusest sarnaselt tüved MG, MG ΔA , MG ΔB , CRIM-A ja CRIM-B. MG ΔAB tüve kolooniad on pooletunnise H_2O_2 tötluse järel väiksemad ja ühetunnise tötluse järel märgatavalt väiksemad kui teistel tüvedel.

30°C juures LB söötmel kasvavad pool tundi vesinikperoksiidiga töödeldud rakud sarnaselt töötlemata rakkudega. Küll aga erineb tund aega vesinikperoksiidiga töödeldud rakkude kasv.

Kui 0h ja 0,5h juures on 10^{-4} lahjenduse tundub kolooniate arv visuaalselt sarnane, siis 1h juures on lahjenduses 10^{-4} tüvedel märgatavalt vähem kolooniaid ning vähenenud on ka 10^{-3} lahjenduse kolooniate arv. 0,5h ja 1h vesinikperoksiidi töötlustest taastunud MG, MGΔA ja MGΔB tüvede kolooniad olid sama suurusega, samuti olid sama suurusega CRIM-A ja CRIM-B kolooniad. MGΔAB kolooniad on väiksemad kõigi teiste tüvedest. Lisaks on märgata väikest erinevust tüvede CRIM-A ja CRIM-B vahel 0,5 tunnise töötlustest taastumisel – CRIM-A tundub kasvavat veidi paremini kui CRIM-B.

Pooletunnisel vesinikperoksiidi töötlusel ei ole sarnaselt 30°C juures kasvavatele rakkudele ka **25°C juures LB söötmel** kasvanud rakkude kolooniate moodustumisele olulist mõju. Tunnise vesinikperoksiidi töötluste järel on märgatavalt vähenenud kolooniate arv lahjendustes 10^{-4} ja 10^{-3} . Kolm esimest tüve - MG, MGΔA ja MGΔB – kasvavad omavahel sarnaselt pärast 0,5 ja 1h töötlust. Ilma oksüdatiivse stressita tundus nagu sarnaselt kasvaksid CRIM-A ja CRIM-B ning neist veel väiksemate kolooniatega oleks MGΔAB. Seevastu pärast 0,5h ja 1h vesinikperoksiidi töötlust on CRIM-A tüve kolooniad küll väiksemad kui metsiktüüpi tüvel, ent suuremad kui CRIM-B ja MGΔAB tüvedel. Siin ilmneb ka erinevus CRIM-A ja CRIM-B tüvede vahel – nimelt kasvab CRIM-A tüvi pärast 0,5h ja 1h töötlust paremini kui CRIM-B.

Lisaks rikkale söötmele viidi sama eksperiment läbi ka **M9+0,4% glükoos** söötmel (joonis 8). Ilma vesinikperoksiidi töötlusteta kasvavad kõigil kolmel temperatuuril juures tüved MG, MGΔA, MGΔB, CRIM-A ja CRIM-B sarnaselt ja MGΔAB tüve kolooniad on väiksemad, mis viitab võimalikule pikemale generatsiooniajale. Samas on kolooniaid väiksemad kui rikkal LB söötmel kasvanud rakkudel. 30 °C juures kasvavad omavahel MG, MGΔA, MGΔB, CRIM-A ja CRIM-B, nagu ka rikkal LB söötmel. MGΔAB tüve kolooniad on palju väiksemad teiste tüvede kolooniatest.



Joonis 8. Tüvede MG, ΔA , ΔB , ΔAB CRIM-A (tähistatud CA) ja CRIM-B (tähistatud CB) kasvu taastumine 10mM H_2O_2 töötlustest temperatuuridel 37°C, 30°C, 25°C. Vesinikperoksiidi töötlus kestis 0h, 0,5h, 1h ning rakke kasvatati söötmel M9+0,4% glükoos. 25°C juures on 1h puhul tüvede järjekord ülevalt alla MG, ΔA , ΔAB , ΔB , CA, CB katsete-gija eksimuse tõttu. Eksperiment viidi läbi kolm korda ning joonisel on esitatud üks pilt kolmest.

37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel on vesinikperoksiidi töötluse järel rakkude elujõulisuses olulisi muutuseid. Kui 0h juures kasvasid pea kõikide tüvede rakud ka lahjenduses 10^{-5} , siis 0,5h töötluse järel on kolooniad moodustunud viimasena lahjenduses 10^{-3} . Tunnise vesinikperoksiidi töötluse järel leidub enamikel tüvedel kolooniaid lahjenduses kuni 10^{-2} . Seega H_2O_2 töötluse tulemusel osa rakkudest sureb. Nii poole tunnise kui tunnise töötluse järel on pea kõikide tüvede kolooniad sama suured, erandiks $MG\Delta AB$ tüvi, kelle kolooniad on väiksemad, **sama efekt** ilmneb ka vaesel söötmel **30°C ja 25°C juures**. Huvitav on, et 37°C juures kasvab CRIM-A tüvi pärast 0,5h töötlust veidi paremini kui CRIM-B.

Teada on, et *E.coli* optimaalne kasvutemperatuur on 37°C, samas kui 30°C ja 25°C juures on bakteri kasv pärssitud (Noor et al. 2013). Seega 37°C juures kasvanud rakud võiks olla tundlikumad vesinikperoksiidi töötlusele, sest kasvutemperatuur oli optimaalne ja H₂O₂ töötlus tabas rakke, kes ei olnud stressis (joonis 7 ja 8). 30°C ja 25°C juures kasvanud rakud olid juba enne töötlust vesinikperoksiidiga madalama temperatuuri pärast stressis ning seetõttu taastusid ka töötlustest paremini (Di Sante et al. 2018).

Teine põhjus võib olla selles, et osa protokollis ettenähtud punktides (OD₆₀₀ mõõtmine toatemperatuuril, rakkude tseentrifuugimine pesemisel 22°C juures) toimusid madalamal temperatuuril kui ülejäänud töö rakkudega (kasvatamine, töötlus H₂O₂-ga 37°C). Kuna kõige suuremat temperatuuride vahet pidid taluma 37°C juures kasvanud rakud, siis selline võimalik lisastress, võis rakud muuta tundlikumaks lühiajalisele H₂O₂-ga tekitatud stressile.

Rakud taastuvad lühiajalisest vesinikperoksiidi töötlustest paremini, kui nad kodeerivad üht või mõlemat bL31 paralooži. Seda järeldati topeltdelatsioonitüve väiksematest kolooniastest kõigil söötmetel ja temperatuuridel. Samas oli MGΔAB tüve kolooniast suurus väiksem ka vesinikperoksiidiga töötlemata rakkudel, seega ei ole tegemist vaid vesinikperoksiidi töötlustega kaasneva nähtusega, vaid rakkude üldise aeglase kasvuga.

Need tulemused lähevad kokku varem avaldatud andmetega, kus näidati, et mõlema bL31 paralooži puudumisel on rakkude generatsiooniaeg üle kahe korra pikem kui metsiktüüpi ja MGΔA tüvel, samas ühe paralooži kaotus ei põhjusta olulist generatsiooniaja muutust võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Lilleorg et al. 2017). See efekt võib olla seotud ribosoomis esineva sillaga B1b. bL31 moodustab koos valkudega bL5 ja bS13 silla B1b, mis on ainuke valk-valk interaktsiooniga sild 12-ne ribosoomis oleva silla hulgast (Shasmal, Chakraborty, ja Sengupta 2010; Fredrick 2016). Olles kõige liikuvam sild ribosoomis on tema ülesanne reguleerida ribosoomi subühikute liikumist teineteise suhtes ning neid stabiliseerida (Gao et al., 2003). Seega võib oletada, et sellise tähtsa valguga puudumisel saavad suurema tõenäosusega tekkida translatsioonil vead, näiteks ribosoomi libisemise tõttu, kuna kontroll subühikute liikumise üle võib olla raskendatud. Veiarohkema valgusünteesi tulemusena võib omakorda suurenedada mittefunktsionaalsete valkude hulk, millega rakk peab hakkama saama ja mille tõttu võibki kasv aeglustuda.

37°C juures vaesel M9 söötmetel ja 30°C juures rikkal LB söötmetel 0,5h töötluste järel kasvas CRIM-A veidi paremini kui CRIM-B tüvi. Samuti taastus vesinikperoksiidi töötlustest CRIM-A

veidi paremini kui CRIM-B nii 0,5h kui ka 1h töötuse järel LB söötmel 25°C juures. Need tulemused kattuvad eelmisel aastal (2018) kaitstud magistritöö tulemustega, mille raames uuriti muuhulgas rakkude võimet kasvada oksüdatiivses stressis ning leiti, et bL31A-d sisaldavad rakud kasvavad paremini kui bL31B sisaldavad rakud (Volõnkin, 2018).

Selle bakalaureuse töö läbiviimiseks kasutati kahte erinevat ainult üht bL31 paraloogii kodeerivat tüve: ainult bL31A valgu geeni sisaldasid MGΔB ja CRIM-A tüvi ning ainult bL31B valku kodeerisid MGΔA ja CRIM-B tüved. Nende tüvede puhul oli näha, et LB söötmel 30°C ja 25°C juures olid CRIM tüvede kolooniad väiksemad kui üksikdeletsioonitüvedel. Kuna üksikdeletsioonitüvede vahel ei olnud rakkude taastumises oksüdatiivsest stressist erinevuseid, ei saa hoolimata CRIM-tüvede vahelistest kasvuerinevustest väita, et bL31A valgu olemasolu tüves annaks eelise lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumisel.

2.3.2. bL31 paraloogide mõju rakkude elumusele statsionaarses kasvufaasis

2019. aastal ilmunud artiklis (Lilleorg et al. 2019) leiti, et metsiktüüpi rakkude ribosoomides muutub bakterikultuuri kasvu jooksul bL31 paraloogide osakaal: kui eksponentsiaalses kasvufaasis sisaldab enamik ribosoomi bL31A-d, siis 24h möödudes hoopis bL31B-d. Miks selline muutus toimub, ei ole teada.

Selgitamaks välja, kas bL31 paraloogid mõjutavad rakkude elumust statsionaarses kasvufaasis, kasvatati nelja tüve (MG, MGΔAB, CRIM-A ja CRIM-B) 16. päeva jooksul ning hinnati elus ja surnud rakkude osakaalu rakusorteri (FACS analüüsi) abil.

Antud töös kasutati nii kahte minimaalsöödet (M9+0,4%glükoos ja M9+0,2%glütserool) kui ka temperatuuri (25°C ja 37°C). Sööde valiti selle järgi, et oleks võimalik vahetada süsinikuallikat: 0,4% glükoos ja 0,2% glütserool. Katsetsükli pikkus oli 16 päeva: proovid elus ja surnud rakkude osakaalude määramiseks võeti 0. päeval, 4. päeval, 8. päeval, 12. päeval ja 16. päeval. Igas ajapunktis võetud proovidest mõõdeti FACS'i abil elus- ja surnud rakkude arvukus, millest omakorda leiti osakaalud ning teostati andmeanalüüs. Ajapunktid valiti lähtuvalt molekulaarbioloogia labori avaldamata andmetest (Silva Lilleorg). Nendes katsetes võeti proovid 2 ja 6 päeva tagant, antud töö raames otsustati võtta proov iga 4 päeva tagant. Lisaekatseid bakalaureusetöö autor ei teinud.

FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) analüüs kujutab endast rakkude eristamist nendest tulevate erineva fluorestsentssignaali põhjal. Rakud läbivad kapillaari ükshaaval ning rakusorter registreerib fluorestsentssignaali.

Rakkude värvimiseks kasutati Invitrogen by LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit'i (Thermo Fisher Scientific). Komplekt sisaldas kaht fluorestseeruvat värvi: SYTO9 ja PI. Neist esimene annab rohelise fluorestsentsi ja on võimeline seonduma nukleiinhapetega kõigis rakkudes ning punase fluorestsentsiga PI (propiidiumiodiid) on samuti võimeline seonduma nukleiinhapetega, kuid seda vaid kahjustatud membraaniga rakkudes, sest terve membraaniga rakkudesse ei ole PI võimeline sisenema. Propiidiumiodiidi sisenemine raku vähendab SYTO9 signaali ning sellised kahjustatud membraaniga rakud annavad punase fluorestsentsignaali. SYTO9 ergastus- ja emissiooni-maksimumid on 480/500nm, PI-l on samad näitajad 490/635nm. Elusateks rakkudeks nimetatakse selles katses rakke, mille membraan on terve, ja surnuteks kahjustunud membraaniga rakke.

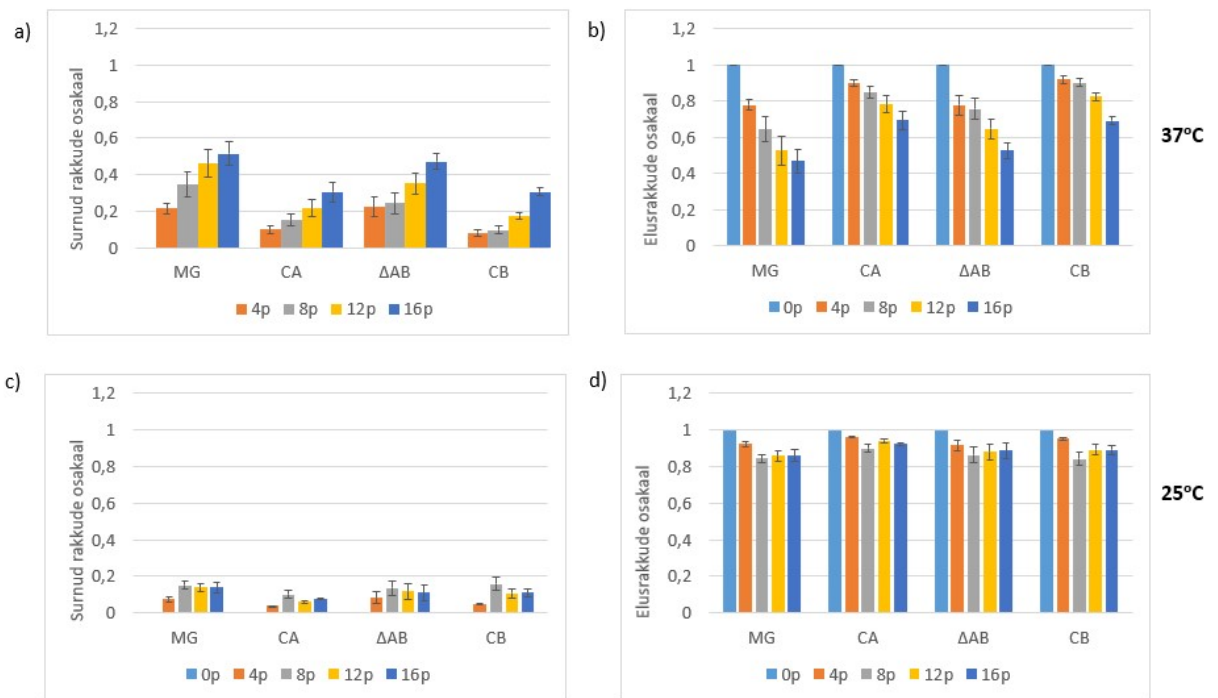
Statsionaarse kasvufaasi jooksul suureneb **glükoosiga söötmes 37°C juures** iga tüve rakukultuuris surnud rakkude osakaal (joonis 9a). Glükoosiga söötmel 37°C juures kasvavad omavahel sarnaselt CRIM-A ja CRIM-B tüvi ning metsiktüüpi rakud ja MGΔAB tüvi.

4. päevaks on metsiktüüpi tüve surnud rakkude osakaal tõusnud sarnaselt MGΔAB tüvega ≈20%, CRIM-A tüvel sarnaselt CRIM-B tüvega ≈9%. 8. päevaks oli MG tüve surnud rakkude osakaal tõusnud sarnaselt MGΔAB-ga ≈ 24-35% , CRIM-A sarnaselt CRIM-B tüvega ≈10-15%. 12. päevaks moodustas metsiktüüpi ja MGΔAB tüve surnud rakkude osakaal pea poole populatsioonist (35%-46%), CRIM-A ja CRIM-B surnud rakkude osakaal on tõusnud ≈20%-ni. Viimaseks mõõtmispäevaks (16.päev) olid ligi pooled metsiktüüpi rakkudest (52%) ja MGΔAB (47%) surnud, CRIM-A ja CRIM-B-l moodustasid surnud rakud populatsioonist kolmandiku (≈30%).

Surnud rakkude osakaalude vahel on erinevused tüvede MG ja mõlema CRIM-tüve vahel ning MGΔAB ja CRIM-B vahel. 4., 8. ja 12. päeval on CRIM-A tüve surnud rakkude osakaal umbes kaks korda väiksem kui metsiktüübil (10% vs 21%, 15% vs 35% ja 22% vs 46), 16 mõõtmispäeval on erinevus 1,7 kordne (30% vs 52%). CRIM-B surnud rakkude osakaal on 4. ja 12. mõõtmispäeval 2,6 korda väiksem kui metsiktüübil (8% vs 21 ja 18% vs 46%), 8. mõõtmispäeval on erinevus 3,5 kordne (10% vs 35%), 16. mõõtmispäeval on CRIM-B surnud rakkude osakaal 1,6 korda väiksem kui MG-l (31% vs 52%). CRIM-B surnud rakkude osakaal on väiksem ka MGΔAB tüve surnud rakkude osakaalust, seda igas katsepunktis. 4. päeval on CRIM-B surnud rakkude osakaal 2,7 korda (8% vs 22%), 8. päeval 2,4 korda (10% vs 24%), 12. päeval kaks korda (18% vs 35%) ja 16. päeval 1,5 korda (31% vs 47%) väiksem kui kaksikdeletsioonitüvel. CRIM-A tüve surnud rakkude osakaal on viimasel mõõtmispäeval 1,6 korda väiksem kui MGΔAB tüvel (30% vs 47%).

Söötmel **M9+0,4% glükoos 25°C** juures oli surnud rakkude osakaal kõikides tüvedes madalam ja tõusis vähem kui 37°C juures, (joonis 9a ja 9c). Surnud rakkude osakaalu tõus tüvede vahel püsib kogu katseperioodi vältel sarnane. Metsiktüüpi surnud rakkude osakaal tõusis 14%, MGΔAB tüvel 11%, CRIM-A-l 8% ja CRIM-B-l 11%-ni.

Olulised surnud rakkude osakaalude muutused tüve piires toimusid 4. ja 8. mõõtmispäeval. 4. päevaks oli metsiktüüpi tüve, MGΔAB ja CRIM-B surnud rakkude osakaal sarnane (5-8%), CRIM-A surnud rakkude osakaal oli 4%. 8. päeval olid kõigi tüvede surnud rakkude osakaal sarnane jäädes vahemikku 10-16%, suurendes eelmise ajapunktiga võrreldes umbes kaks korda.



Joonis 9. Surnud ja elusrakkude osakaal 37°C ja 25°C juures söötmes M9+0,4% glükoos. Tüvesid MG1655, MGΔAB, CRIM-A (joonisel lühend CA) ja CRIM-B (joonisel lühend CB) kasvatati kahel temperatuuril 16. päeva jooksul. Null-päevaks loeti eksponentsiaalse kasvufaasi proov (OD_{600} 0,4...0,8). Edaspidi võeti proov iga nelja päeva tagant (4., 8., 12. ja 16. päeval) ja mõõdeti rakkude SYTO9 ja PI fluorestsentssignaali FACS'i abil. Surnud rakkude osakaalude (a ja c) leidmiseks lahutati null päeval surnud rakkude osakaal järgnevate ajapunktide surnud rakkude osakaalust. Elusrakkude osakaalud (b, d) on esitatud normaliseerituna sama tüve null-päeva elusrakkude osakaalu suhtes ($n=6$, keskmine \pm standardviga).

Statsionaarse kasvufaasi jooksul suureneb **glütserooliga söötmes 37°C juures** iga tüve raku-kultuuris surnud rakkude osakaal (joonis 10a).

4.päevaks oli MG tüve surnud rakkude osakaal tõusnud 12%-ni, MGΔAB tüvel 8%, CRIM-A tüvel 6% ja CRIM-B tüvel 5%, püsid tagasihoidlikumal tasemel (pea poole väiksem surnud rakkude protsent) kui samas ajapunktis 37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud tüvede surnud rakkude osakaalud (joonised 9a ja 10a). 8.päevaks oli metsiktüüpi ja MGΔAB rakkudest ligi kolmandik surnud (26%-31%) ja CRIM-A ning CRIM-B tüvede surnute osakaal oli tõusnud pea kolm korda võrreldes 4. päevaga, jõudes \approx 16%-ni. Võrreldes 8. päeva surnud rakkude osakaalud mõlemas söötmes 37°C juures on glütserooliga söötmes kasvanud metsiktüüpi tüve näitaja 9% võrra madalam, MGΔAB surnud rakkude osakaal 7%, CRIM-A 2% ja CRIM-B-l 5% kõrgem. 12. päevaks moodustas metsiktüüpi rakkude populatsioonist sarnaselt 37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud rakkudega pea poole surnud rakud (45%). MGΔAB surnud rakkude osakaal tõusis võrreldes 8. päevaga poole võrra, jõudes 61%, mis on 26% võrra

rohkem kui 37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud rakkudel. Nii CRIM-A kui CRIM-B surnud rakkude osakaal tõusis 12. päevaks üle kahe korra võrreldes 8. päevaga, jõudes pea 40%-ni populatsioonist, mis on kaks korda rohkem kui samas ajapunktis (12 päeva) 37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud rakkudel. Viimaseks mõõtmispäevaks oli kõigi tüvede surnud rakkude osakaal tõusnud üle 60%: metsiktüüpi rakkudel 65%-ni, MGΔAB-l 78%-ni, CRIM-A-l ja CRIM-B-l 69%-ni. Võrreldes 37°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud rakkudega, on glütseroolil kasvanud surnud rakkude osakaalud palju suuremad: MG-l 13% võrra, teised tüved erinevad omavahel kolmandiku võrra (MGΔAB-l 31%, CRIM-A-l 39% ja CRIM-B-l 38%)

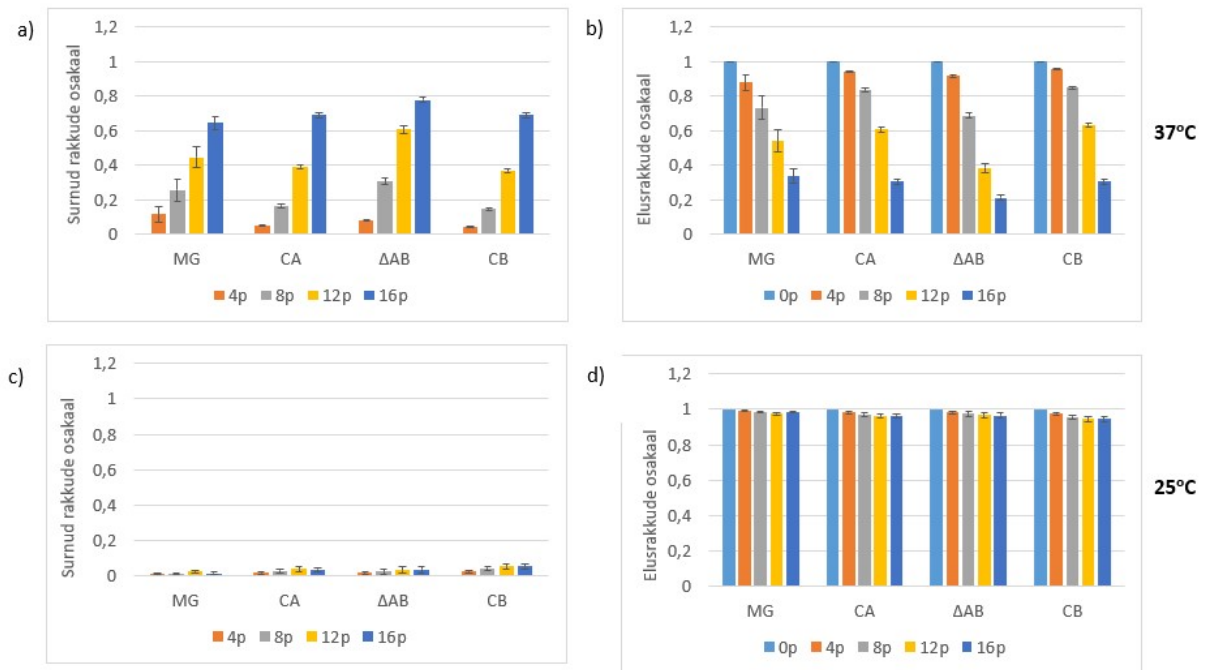
Söötmel **M9+0,2% glütserool 37°C juures** kasvanud rakkudel on surnute osakaalude vahel erinevused järgmistel tüvedel: MG ja MGΔAB; MGΔAB ja CRIM-A; MGΔAB ja CRIM-B; CRIM-A ja CRIM-B. MGΔAB surnud rakkude osakaal on 12. päeval 1,4 (60% vs 45%) ja 16. päeval 1,2 korda (78% vs 65%) suurem kui MG tüvel. CRIM-A tüve surnud rakkude osakaal on väiksem kui topeltdeletsioonitüvel kõigil mõõtmispäevadel (joonis10a). CRIM-A surnud rakkude osakaal on 4. päeval 1,5 korda, 8. päeval 1,9 korda, 12. päeval 1,6. väiksem kui MGΔAB tüvel. Samuti on CRIM-B tüve surnud rakkude osakaalud väiksemad kui deletsioonitüvel kõigil mõõtmispäevadel. Nii 4. kui ka 8. päeval on CRIM-B tüve surnud rakkude osakaal umbes kaks korda ja 12. päeval 1,7 korda väiksem kui MGΔAB tüvel.

37°C juures on nii glükoosi kui glütserooli süsinikuallikana kasutada saanud tüvede puhul näha, et omavahel sarnased kasvavad MG ja MGΔAB-ning CRIM-A ja CRIM-B.

Söötmel **M9+0,2% glütserool 25°C juures** püsis surnud rakkude osakaal katse lõpuni väga madalal (kuni 5%) (joonis 10c).

4. mõõtmispäevaks oli metsiktüüpi rakkude hulgas 1% surnuid, MGΔAB ja CRIM-A hulgas 1,7% ja CRIM-B tüve hulgas 2,6% surnud rakke. Võrreldes 25°C juures M9+0,4% glükoos söötmel kasvanud rakkudega, püsisid glütserooliga söötmes kasvanud rakukultuuride surnud rakkude osakaalud oluliselt madalamad kõigis ajapunktides (vahe MG tüvega kuni 13%, MGΔAB-ga 11%, CRIM-A-ga 8% ja CRIM-B-ga 14%) (joonis 9c ja 10c).

Söötmel **M9+0,2% glütserool 25°C juures** on tüvede surnud rakkude osakaalud sarnased.



Joonis 10. Surnud ja elusrakkude osakaal 37°C ja 25°C juures söötmes M9+0,2% glütserool. Tüvesid MG1655, MGΔAB, CRIM-A (joonisel lühend CA) ja CRIM-B (joonisel lühend CB) kasvatati kahel temperatuuril 16. päeva jooksul. Null-päevaks loeti eksponentsiaalse kasvufaasi proov (OD_{600} 0,4...0,8). Edaspidi võeti proov iga nelja päeva tagant (4., 8., 12. ja 16. päeval) ja mõõdeti rakkude SYTO9 ja PI fluorestsentssignaalid FACS'i abil. Surnud rakkude osakaalude (a ja c) leidmiseks lahutati null päeval surnud rakkude osakaal järgnevate ajapunktide surnud rakkude osakaalust. Elusrakkude osakaalud (b, d) on esitatud normaliseerituna sama tüve null-päeva elusrakkude osakaalu suhtes ($n=6$, keskmine \pm standardviga).

Võrreldes kahte vaest söödet, mis erinevad omavahel vaid süsinikuallika poolest, on 37°C juures näha, et 0,4%glükoosil kasvanud tüvede surnud rakkude osakaal on populatsioonis suurem kuni mõõtmispäevani 8, millest alates on glütserooli süsinikuallikana kasutatavatel tüvedel surnud rakkude osakaal suurem. Olenemata söötmest, püsivad 25°C juures surnud rakkude osakaalud 16. päeva jooksul sarnastena. Samas on näha, et glütseroolil kasvanud tüvede surnud rakkude osakaal püsib madalamal kui glükoosil kasvanud rakkudel. Põhjus võib peituda selles, et rakkude generatsiooniaeg vaesel söötmel madalal temperatuuril on lihtsalt pikem. 37°C juures kasvasid sarnaselt MG ning MGΔAB ja CRIM-A ning CRIM-B tüved.

Elumuse hindamise katsete põhjal saab järeldada, et *E. coli* rakud ei vaja bL31 valgu paralooget, et statsionaarses faasis paremini ellu jääda. Nimelt oli metsiktüüpi rakkude ja topeltdeletsioo- nitüve surnud rakkude osakaal sarnane 37°C juures nii glükoosi kui glütserooliga M9 söötmel.

Lisaks on nii bL31A kui bL31B paraloogi mõju elumusele samaväärne, sest nii CRIM-A kui CRIM-B tüvi kasvavad 37°C juures nii glükoosi kui glütserooliga M9 söötmel sarnaselt. CRIM tüvede elumus oli sarnane MG ja MGΔAB tüvede elumusega.

Oksüdatiivsest stressist taastumise katsete põhjal võib väita, et bL31 paraloogi geeni olemasolu rakus on oluline nende kasvuks, kuid ei ole vahet, kas rakk sisaldab mõlemat paraloogi (bL31A või bL31B) geeni või ainult ühe paraloogi geeni.

Samas statsionaarses kasvufaasis ei ole rakkude elumuse seisukohalt üldse oluline bL31 valgu geeni olemasolu genoomis – metsiktüüpi ja topeltdeletsioonitüvi kasvavad sarnaselt. Ka ei ole vahet CRIM-A ja CRIM-B tüvel.

Seega, *E.coli*'s ribosoomide heterogeensus bL31 paraloogide suhtes ei ole oluline rakkude kasvul statsionaarses faasis. Statsionaarses faasis ei ole bL31 paraloogi olemasolu genoomis üldse vajalik. Samuti sarnanevad bL31A ja bL31B geeni sisaldavate rakkude kasvufenotüüp lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumisel.

KOKKUVÕTE

E.coli's on paraloogsed valgud bL31A ja bL31B, mis mõlemad osalevad subühikute vahelise silla B1b moodustamisel, panustades oluliselt efektiivse valgusünteesi initsiatsiooni ja täpsuse tagamisele. Lisaks on välja selgitatud, et tüve MGΔAB generatsiooniaeg on üle kahe korra pikem kui metsiktüüpi rakkudel või ühe bL31 valguga tüvedel. Samuti on leitud, et oksüdatiivse stressi tingimustes võiks bL31A valguga geenid sisaldavatel rakkudel olla kasvueelises bL31B valguga geenid sisaldavate rakkude ees. Antud töö raames sooviti lisaks välja selgitada, kas *E. coli* paraloogsetel valgudel bL31A ja bL31B on mõju rakkude kasvufenotübile lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumisel ja elumusele statsionaarses kasvufaasis.

Lühiajalisest oksüdatiivsest stressist taastumise katse tulemusena võib öelda, et kõik tüved, mis kodeerisid üht või mõlemat bL31 paraloogi, taastusid lühiajalisest oksüdatiivsest stressist paremini kui ilma bL31 paraloogideta tüvi. Seega saab järeldada, et oksüdatiivsest stressist taastumise seisukohalt on oluline vähemalt ühe bL31 paraloogi olemasolu, kuid ei ole tähtis, kas kasutada on bL31A või bL31B.

Seega püstitatud hüpotees, mille kohaselt mõjutavad bL31 paraloogid *E. coli* kasvu eri tingimustes, pidas paika, kuna mõlemad bL31 paraloogid mõjutavad oksüdatiivsest stressist taastumist samamoodi (CRIM tüved vs MGΔAB). Statsionaarse faasi elumuse hindamise katse põhjal võib aga väita, et ühe või mõlema bL31 paraloogi puudumine ei mõjuta bakterite elumust.

Bakalaureusetöö katsed näitavad, et bL31 paraloogide näol esinev heterogeensus, ei ole oluline oksüdatiivsest stressist taastumisel ning samuti puudub vahe paraloogide kasvufenotüübis statsionaarses kasvufaasis.

Influence of bL31 paralogs on *E. coli* growth phenotype under different environmental conditions

Annete Sikora

Summary

The function of a ribosome consisting of two subunits in eukaryotic and prokaryotic cells is to synthesize proteins based on the mRNA sequence transcribed from the DNA sequence. Ribosomes consist of three rRNA molecules (5S, 16S and 23S) and at least 55 small basic proteins (r-proteins). Ribosomes are called heterogeneous if they differ in their structural components.

R-proteins may have paralogs meaning that there are two proteins encoded by genes resulting from an ancient gene duplication. In *E. coli* there are two such proteins bL31 and bL36. In the case of *E. coli* paralogs bL31A and bL31B are located in the same site on the ribosome, although they have rather different amino acid sequences (40% of identity).

bL31A contains a zinc binding motive consisting of 4 cysteines, while bL31B does not. Zinc-binding cysteines are capable of reacting with free oxygen radicals, whereby disulfide bridges may form between the cysteines. For the bL31A protein, this could mean that it is either no longer able to bind zinc or that the binding is weak. Whether, as a result of oxidative stress, the growth phenotype of bL31A protein-containing cells could change, and whether bL31B protein cells have growth advantages in front of bL31A protein-containing cells, has yet to be studied.

It has been shown that in *E. coli* and in *B. subtilis*, in the exponential growth phase the majority of ribosomes contains bL31A protein, while in the stationary phase the majority of ribosomes contains bL31B protein. Whether the presence of the bL31B protein in the ribosomes during stationary phase could confer a growth advantage over cells containing bL31A protein is not known.

This bachelor thesis aims to examine the effect of bL31 paralogs on *E. coli* growth phenotype under different conditions (temperature, nutrient and oxidative stress). For that bacterial cell growth of strains differing in their bL31 paralog content was examined after hydrogen peroxide treatment. In addition, the viability of strains was assessed during stationary growth phase (16 days) by using FACS analysis.

The main results of this study can be summarized as follows:

1. The strain without both bL31 paralogs exhibited slower growth than the strains encoding at least one bL31 paralogues gene under growth conditions (oxidative and temperature stress) assayed by spot-test.
2. In general, there is no significant difference in growth recovery after hydrogen peroxide treatment of strains encoding only one (bL31A or bL31B) paralog. However, under some conditions the CRIM-A stain grew slightly better than CRIM-B stain (at 37°C on poor M9 medium after 0.5h of treatment, at 25°C after 0.5h and 1h of treatment and at 30°C after 0.5h of treatment on rich LB medium).
3. Survival assessment experiment revealed that the presence of the bL31 protein genes in the genome is not important for the viability of stationary phase cells growing in poor media. Hence, there are no differences in the viability of stationary phase cells depending on bL31A or bL31B paralog.

- Ban, N. 2000. „The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution“. *Science* 289 (5481): 905–20. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>.
- Ban, Nenad, Roland Beckmann, Jamie HD Cate, Jonathan D Dinman, François Dragon, Steven R Ellis, Denis LJ Lafontaine, et al. 2014. „A new system for naming ribosomal proteins“. *Current opinion in structural biology* 24 (vebruar): 165–69. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.002>.
- Bertani, G. 1951. „STUDIES ON LYSOGENESIS I. THE MODE OF PHAGE LIBERATION BY LYSOGENIC ESCHERICHIA COLI“ 62: 8.
- Brodersen, Ditlev E., William M. Clemons, Andrew P. Carter, Brian T. Wimberly, ja V. Ramakrishnan. 2002. „Crystal Structure of the 30 s Ribosomal Subunit from *Thermus Thermophilus*: Structure of the Proteins and Their Interactions with 16 s RNA“. *Journal of Molecular Biology* 316 (3): 725–68. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5359>.
- Connolly, Keith, ja Gloria Culver. 2009. „Deconstructing Ribosome Construction“. *Trends in Biochemical Sciences* 34 (5): 256–63. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.01.011>.
- Cukras, Anthony R., ja Rachel Green. 2005. „Multiple Effects of S13 in Modulating the Strength of Intersubunit Interactions in the Ribosome During Translation“. *Journal of Molecular Biology* 349 (1): 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.075>.
- Decatur, Wayne A, ja Maurille J Fournier. 2002. „rRNA Modifications and Ribosome Function“. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (7): 344–51. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6).
- Fan, Yongqiang, Christopher R. Evans, Karl W. Barber, Kinshuk Banerjee, Kalyn J. Weiss, William Margolin, Oleg A. Igoshin, Jesse Rinehart, ja Jiqiang Ling. 2017. „Heterogeneity of Stop Codon Readthrough in Single Bacterial Cells and Implications for Population Fitness“. *Molecular Cell* 67 (5): 826-836.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.010>.
- Fan, Yongqiang, Jiang Wu, Matthew H. Ung, Nicholas De Lay, Chao Cheng, ja Jiqiang Ling. 2015. „Protein Mistranslation Protects Bacteria against Oxidative Stress“. *Nucleic Acids Research* 43 (3): 1740–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1404>.
- Ferretti, Max B., ja Katrin Karbstein. 2019. „Does Functional Specialization of Ribosomes Really Exist?“ *RNA*, veebruar, rna.069823.118. <https://doi.org/10.1261/rna.069823.118>.
- Genuth, Naomi R., ja Maria Barna. 2018. „The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life“. *Molecular Cell* 71 (3): 364–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>.
- Gudkov, A.T. 1997. „The L7/L12 Ribosomal Domain of the Ribosome: Structural and Functional Studies“. *FEBS Letters* 407 (3): 253–56. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00361-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00361-X).
- Haldimann, A., ja B. L. Wanner. 2001. „Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria“. *Journal of Bacteriology* 183 (21): 6384–93. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6384-6393.2001>.
- Hemm, Matthew R., Brian J. Paul, Juan Miranda-Ríos, Aixia Zhang, Nima Soltanzad, ja Gisela Storz. 2010. „Small Stress Response Proteins in *Escherichia coli*: Proteins Missed by Classical Proteomic Studies“. *Journal of Bacteriology* 192 (1): 46–58. <https://doi.org/10.1128/JB.00872-09>.
- Hensley, M. Patrick, Thusitha S. Gunasekera, J. Allen Easton, Tara K. Sigdel, Stacy A. Sugarbaker, Lindsey Klingbeil, Robert M. Breece, David L. Tierney, ja Michael W. Crowder. 2012. „Characterization of Zn(II)-responsive ribosomal proteins YkgM and L31 in *E. coli*“. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Bert Vallee Memorial, 111 (juuni): 164–72. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.022>.
- Hindennach, Ingrid, Eberhard Kaltschmidt, ja Heinz-Günter Wittmann. 1971. „Ribosomal Proteins“. *European Journal of Biochemistry* 23 (1): 12–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01585.x>.

- Jenner, Lasse, Natalia Demeshkina, Gulnara Yusupova, ja Marat Yusupov. 2010. „Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step“. *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (9): 1072–78. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1880>.
- Jensen, Roy A. 2001. „Orthologs and paralogs - we need to get it right“. *Genome Biology* 2 (8): interactions1002.1-interactions1002.3.
- Kaczanowska, M., ja M. Ryden-Aulin. 2007. „Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia Coli*“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3): 477–94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-07>.
- Kurylo, Chad M., Matthew M. Parks, Manuel F. Juette, Boris Zinshteyn, Roger B. Altman, Jordana K. Thibado, C. Theresa Vincent, ja Scott C. Blanchard. 2018. „Endogenous RRNA Sequence Variation Can Regulate Stress Response Gene Expression and Phenotype“. *Cell Reports* 25 (1): 236–248.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.093>.
- Liiv, Aivar, ja Michael O'Connor. 2006. „Mutations in the Intersubunit Bridge Regions of 23 S RRNA“. *Journal of Biological Chemistry* 281 (40): 29850–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603013200>.
- Lilleorg, Silva, Kaspar Reier, Arto Pulk, Aivar Liiv, Triin Tammsalu, Lauri Peil, Jamie H.D. Cate, ja Jaanus Remme. 2019a. „Bacterial Ribosome Heterogeneity: Changes in Ribosomal Protein Composition during Transition into Stationary Growth Phase“. *Biochimie* 156 (jaanuar): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.013>.
- Lilleorg, Silva, Kaspar Reier, Arto Pulk, Aivar Liiv, Triin Tammsalu, Lauri Peil, Jamie H. D. Cate, ja Jaanus Remme. 2019b. „Bacterial ribosome heterogeneity: Changes in ribosomal protein composition during transition into stationary growth phase“. *Biochimie* 156 (jaanuar): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.013>.
- Lilleorg, Silva, Kaspar Reier, Jaanus Remme, ja Aivar Liiv. 2017. „The Intersubunit Bridge B1b of the Bacterial Ribosome Facilitates Initiation of Protein Synthesis and Maintenance of Translational Fidelity“. *Journal of Molecular Biology* 429 (7): 1067–80. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.015>.
- Lim, Jeesun, Kang-Mu Lee, So Hyun Kim, Younghoon Kim, Sae-Hun Kim, Woojun Park, ja Sungsu Park. 2011. „YkgM and ZinT Proteins Are Required for Maintaining Intracellular Zinc Concentration and Producing Curli in Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC) O157:H7 under Zinc Deficient Conditions“. *International Journal of Food Microbiology* 149 (2): 159–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.017>.
- Liu, Qi, ja Kurt Fredrick. 2016. „Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome“. *Journal of Molecular Biology, Ribosomes Structure and Mechanisms in Regulation of Protein Synthesis* (I), 428 (10, Part B): 2146–64. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.009>.
- MacDonald, Ruth S. 2000. „The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation“. *The Journal of Nutrition* 130 (5): 1500S-1508S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>.
- Maciąg, Anna, Elisa Dainese, G. Marcela Rodriguez, Anna Milano, Roberta Provvedi, Maria R. Pasca, Issar Smith, Giorgio Palù, Giovanna Riccardi, ja Riccardo Manganelli. 2007. „Global Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) Regulon“. *Journal of Bacteriology* 189 (3): 730–40. <https://doi.org/10.1128/JB.01190-06>.
- Makarova, Kira S, Vladimir A Ponomarev, ja Eugene V Koonin. 2001. „Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins“. *Genome Biology* 2 (9): research0033.1-research0033.14.
- Mauro, Vincent P., ja Gerald M. Edelman. 2002. „The Ribosome Filter Hypothesis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (19): 12031–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>.
- Moore, Charles M, ja John D Helmann. 2005. „Metal Ion Homeostasis in *Bacillus Subtilis*“. *Current Opinion in Microbiology* 8 (2): 188–95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.007>.
- Murray, Christopher I., ja Jennifer E. Van Eyk. 2012. „Chasing Cysteine Oxidative Modifications: Proteomic Tools for Characterizing Cysteine Redox-Status“. *Circulation. Cardiovascular genetics* 5 (5): 591. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.961425>.

- Nanamiya, Hideaki, Genki Akanuma, Yousuke Natori, Rikinori Murayama, Saori Kosono, Toshiaki Kudo, Kazuo Kobayashi, et al. 2004. „Zinc Is a Key Factor in Controlling Alternation of Two Types of L31 Protein in the Bacillus Subtilis Ribosome“. *Molecular Microbiology* 52 (1): 273–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03972.x>.
- Natori, Yousuke, Hideaki Nanamiya, Genki Akanuma, Saori Kosono, Toshiaki Kudo, Kozo Ochi, ja Fujio Kawamura. 2007. „A Fail-Safe System for the Ribosome under Zinc-Limiting Conditions in Bacillus Subtilis“. *Molecular Microbiology* 63 (1): 294–307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05513.x>.
- Nesterchuk, M.V., P.V. Sergiev, ja O.A. Dontsova. 2011. „Posttranslational Modifications of Ribosomal Proteins in Escherichia coli“. *Acta Naturae* 3 (2): 22–33.
- Nikolic, Nela, Zrinka Didara, ja Isabella Moll. 2017. „MazF activation promotes translational heterogeneity of the grcA mRNA in Escherichia coli populations“. *PeerJ* 5 (september). <https://doi.org/10.7717/peerj.3830>.
- Noller, H. F., ja C. R. Woese. 1981. „Secondary Structure of 16S Ribosomal RNA“. *Science* 212 (4493): 403–11. <https://doi.org/10.1126/science.6163215>.
- Owen, G. A., B. Pascoe, D. Kallifidas, ja M. S. B. Paget. 2007. „Zinc-Responsive Regulation of Alternative Ribosomal Protein Genes in Streptomyces Coelicolor Involves Zur and R“. *Journal of Bacteriology* 189 (11): 4078–86. <https://doi.org/10.1128/JB.01901-06>.
- Panina, E. M., A. A. Mironov, ja M. S. Gelfand. 2003. „Comparative Genomics of Bacterial Zinc Regulons: Enhanced Ion Transport, Pathogenesis, and Rearrangement of Ribosomal Proteins“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (17): 9912–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733691100>.
- Patzer, Silke I., ja Klaus Hantke. 1998. „The ZnuABC High-Affinity Zinc Uptake System and Its Regulator Zur in Escherichia Coli“. *Molecular Microbiology* 28 (6): 1199–1210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00883.x>.
- Pettersson, I., S. J. S. Hardy, ja A. Liljas. 1976. „The Ribosomal Protein L8 Is a Complex of L7/L12 and L10“. *FEBS Letters* 64 (1): 135–38. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80267-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80267-0).
- Pulk, Arto, Aivar Liiv, Lauri Peil, Ülo Maiväli, Knud Nierhaus, ja Jaanus Remme. 2010. „Ribosome Reactivation by Replacement of Damaged Proteins“. *Molecular Microbiology* 75 (4): 801–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07002.x>.
- Sambrook, Joseph, Tom Maniatis, E. F. Fritsch, ja Cold Spring Harbor Laboratory. 1987. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://trove.nla.gov.au/work/13615226>.
- SEMRAD, KATHARINA, RACHEL GREEN, ja RENÉE SCHROEDER. 2004. „RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from Escherichia coli“. *RNA* 10 (12): 1855–60. <https://doi.org/10.1261/rna.7121704>.
- Shajani, Zahra, Michael T. Sykes, ja James R. Williamson. 2011. „Assembly of Bacterial Ribosomes“. *Annual Review of Biochemistry* 80 (1): 501–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062608-160432>.
- Vesper, Oliver, Shahar Amitai, Maria Belitsky, Konstantin Byrgazov, Anna Chao Kaberdina, Hanna Engelberg-Kulka, ja Isabella Moll. 2011. „Selective Translation of Leaderless MRNAs by Specialized Ribosomes Generated by MazF in Escherichia Coli“. *Cell* 147 (1): 147–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.047>.
- Volõnkin, Pavel. s.a. „TARTU ÜLIKOOL LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT MOLEKULAARBIOLOGIA ÖPPETOOL“, 68.
- Wilson, Daniel N., ja Knud H. Nierhaus. 2005. „Ribosomal Proteins in the Spotlight“. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40 (5): 243–67. <https://doi.org/10.1080/10409230500256523>.
- Wittmann, H. G. 1974. „[48] Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for separation of ribosomal proteins“. *Methods in Enzymology*, 30:497–505. Nucleic Acids and Protein Synthesis Part F. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)30050-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)30050-X).

- Xue, Shifeng, ja Maria Barna. 2012. „Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology“. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (6): 355–69.
<https://doi.org/10.1038/nrm3359>.
- Yusupov, Marat M, Gulnara Zh Yusupova, Albion Baucom, Kate Lieberman, Thomas N Earnest, J H D Cate, ja Harry F Noller. 2001. „Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution“ 292: 15.
- Yutin, Natalya, Pere Puigbo, Eugene V Koonin, ja Yuri I Wolf. 2012. „Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins“. *PLoS ONE* 7 (5): 10.

https://www.uniprot.org/uniprot/POA7M9_(01.05.19)

https://www.uniprot.org/uniprot/POA7N1_(01.05.19)

https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=CPLX0-7680_(01.05.19)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/J01859> (13.05.19)

<https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=RRLA-RRNA> (13.05.19)

<https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=RRFD-RRNA> (13.05.19)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000913.3?report=genbank&from=4127013&to=4127225 (14.05.19)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000913.3?report=genbank&from=312514&to=312777&strand=true (14.05.19)

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (25.05.19)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annete Sikora

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

„bL31 paraloogide mõju *E. coli* kasvufenotüübile erinevatel keskkonnatingimustel“,

mille juhendaja on Silva Lilleorg,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Annete Sikora

27.05.2019