

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

Birgit Marjak

**Bakteriofaagi MS2 kattevalgu ja pseudouridiini süntaasi RluD
 hübriidvalgu konstrueerimine ja iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Dr. Margus Leppik

TARTU 2015

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade	7
1 Ribosoomi funktsioon.....	7
1.1 Ribosomaalne RNA (rRNA).....	7
1.2 30S subühik.....	9
1.3 50S subühik.....	10
1.4. Valgusüntees.....	12
1.5 Ribosoomi subühikute vahelised sillad.....	12
1.6 Modifitseeritud nukleotiidid rRNA-s.....	13
1.7 Pseudouridiin	14
1.8 Pseudouridiini süntaasid	16
1.9 RluD.....	17
Eksperimentaalne osa	20
Töö eesmärgid.....	20
2 Materjal ja meetodika	21
2.1. Kasutatud bakteritüved:.....	21
2.2 Kasutatud praimerid (värvidega märgitud praimeritega sisse viidud restiktsioonisaidid):	21
2.3. Kasutatud plasmiidid:.....	21
2.4. Kimäärse plasmidi konstrueerimine ja kontrollimine	22
2.4.1. Kloneerimine	22
2.4.2. Transformatsioon	25
2.4.3. Plasmidi kontrollimine koloonia PCR meetodil	25
2.4.4. Plasmidse DNA puhastamine minipreparatsiooni meetodil	25

2.4.5	Valguekspressiooni kontroll PAA-SDS geelis.....	26
2.4.6.	Rakkude kasvatamine ja indutseerimine	26
2.4.7.	Ribosoomi subühikute lahutamine sahharoosgradiendis	26
2.4.8	Ribosoomi subühikute sadestamine	27
2.4.9.	Fenool-kloroformtöötlus	27
2.4.10.	Töötlus aluselise fosfataasi ja nukleasiga.....	27
2.4.11.	<i>E.coli</i> tüve Q13 kasvatamine, indutseerimine ja MS2 bakteriofaagiga inokuleerimine.....	29
2.4.12.	Viiruspartiklite eraldamine sahharoosgradiendis	29
3	Tulemused ja arutelu	30
3.1.1.	Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD konstrueerimine ja klonerimine	30
3.1.2.	RluMSD ekspressioon mõjutab ribosoomi subühikute assotsiatsiooni	31
3.1.3.	Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD mõju rRNA pseudouridiinidele	33
3.1.4.	Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD mõju rRNA modifikatsioonidele	36
3.1.5.	RluMSD modifitseerib MS2 bakteriofaagi RNA-d	38
	Kokkuvõte	41
	Construction and characterization of chimeric pseudouridine synthase containing MS2 coat protein and RluD catalytic domain.....	42
	Summary	42
	Tänuõnad.....	43
	Viited:	44
	Lisad	49
	Lihlitsents	50

Kasutatud lühendid

30S - prokarüoodi väike ribosomaalne subühik

50S - prokarüoodi suur ribosomaalne subühik

70S - prokarüoodi ribosoom

Amp - antibiootikum ampitsilliin

β -ME - 2-merkaptoetanool, β -merkaptoetanool

bp - aluspaar (inglise keelest: *base pair*)

dNTP - desoksünukleotiidtrifosfaat

EDTA - etüleendiamiintetraatsetaat

EF - elongatsioonifaktor

EtBr - etiidiumbromiid

GuTCN - guanidiintiotüsinaat

GTP - guanosiin-5'-trifosfaat

H69 - heeliks 69

HCC - heksakoobalkloriid

IF - initsiatsioonifaktor

IPTG -isopropüültio- β -D-galaktosiid

LB - Luria-Bertani sööde

LP- lüüsi puhver

LLP – lüüsi lahjenduspuhver

mQ vesi - milliQ vesi, ülipuhas vesi

PAA-SDS geel - polüakrüülamiid-naatriumdodetsüülsulfaat geel

PTC - peptidüültransferaasne tsender

RF2 - vabanemisfaktor 2 (inglise keelest: *release factor*)

RluD - ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas D

rRNA - ribosomaalne ribonukleinhape

U - ühik(inglise keelest: *unit*)

Ψ - pseudouridiin

Sissejuhatus

Ribosoom on ribosomaalsest RNA-st ja valkudest koosnev ribonukleoproteiin kompleks, mis katalüüsib aminohapete lülitumist polüpeptiididesse. Ribosoom koosneb 58-st ribosomaalsest valgust ning 5S, 16S ja 23S rRNA-st.

Kõik rRNA-d on posttranskriptsiooniliselt modifitseeritud ja nendeks modifikatsioonideks on pseudouridiinid (Ψ), dihydrouridiinid ja metülatsioonid. Kõige levinumaks modifikatsiooniks on pseudouridiin, mis tekib uridiini (U) isomeriseerimisel.

Modifikatsioonid asuvad rRNA funktsionaalselt olulistest positsioonides ning on väga konserveerunud ilmselt ribosoomi funktsiooni säilitamise eesmärgil. 23S rRNA domäänis IV asuvas heeliks-ling 69-s asuvad uridiinid 1911, 1915 ja 1917 isomeriseeritakse pseudouridiinideks pseudouridiini süntaasi RluD poolt. RluD on *in vivo* väga spetsiifiline, kuid *in vitro* osa spetsiifilisusest kaob. Pseudouridiinide spetsiifika kohta on võrdlemisi vähe teada ning eriti vähe on teada multispetsiifiliste ensüümide nagu RluC ja RluD, mis kumbki modifitseerib 3 pseudouridiini, substraatspetsiifika kohta. Varasemalt on teada, et kimäärne C4DK (pseudouridiini süntaasi RluC N-terminaalne domään kloneeritud RluD C-terminaalse katalüütilise domääni külge) sünteesib rRNA-sse rohkem pseudouridiine kui metsiktüüpi RluD. Olemasolevate andmete põhjal võib arvata, et RluDN-terminaalsel domäänil võib olla oluline roll RluD spetsiifika tagamises.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade *E.coli* ribosomaalses RNA-s leiduvatest modifikatsioonidest ja pseudouridiini süntaaside spetsiifikast ning pseudouridiini süntaasist RluD. Eksperimentaalses osas konstrueeritakse kimäärne pseudouridiini süntaas RluMSD, mis koosneb C-terminaalsest RluD katalüütilisest domäänist ja N-terminaalsest bakteriofaag MS2 kattevalgust. Seejärel kontrollitakse saadud kimäärase RluMSD valgu spetsiifilisust nii rRNA kui ka MS2 bakteriofaagi RNA suhtes. Esialgseid andmed viitavad, et RluD N-terminaalse S4-sarnase domääni vahetamine MS2 bakteriofaagi kattevalgu vastu võimaldab RluD katalüütilisel domäänil modifitseerida MS2 bakteriofaagi RNA-d.

Märksõnad: MS2 bakteriofaagi RNA, rRNA, RNA modifikatsioonid, pseudouridiini süntaas, translatsioon

Kirjanduse ülevaade

1 Ribosoomi funktsioon

Escherichia coli ribosoom on 2,4 MDa suurune ribonukleoproteiin kompleks, mis koosneb 58 ribosomaalsest valgust (r-valgust) ja kolmest ribosomaalsest RNA-st (rRNA). Need valgud ja rRNA-d moodustavad kaks erineva suurusega osakest, väikse ribosomaalse (30S) subühiku ja suure ribosomaalse (50S) subühiku. Kaks subühikut omakorda moodustuvad ühinedes 70S ribosoomi (Cate 2012). Bakteri ribosoom koosneb 1/3 ulatuses ribosomaalsetest valkudest, 2/3 ulatuses rRNA-st (Schuwirth *et al.* 2005; Kaczanowska & Ryden-Aulin 2007).

Ribosoomil on kolm tRNA-de sidumis-saiti, mida nimetatakse vastavalt aminoatsüül-tRNA (A-sait), peptidüül-tRNA (P-sait) ja exit-tRNA saidiks (E-sait), vastavalt sellele millist tRNA-d antud saidid eelistatult seovad (Cate 2012).

Valgud sünteesitakse aminotermineusest karboksü-terminuse suunas mRNA järjestuse järgi, millesse informatsioon on kodeeritud 5'-3' suunas. Valkude aminohappelise järjestuse määravad mRNA järjestuse kolmenukleotiidilised üksused, mida nimetatakse koodoniteks (Cooper 2000). mRNA sisaldab oma järjestuses nelja erinevat nukleotiidi (A, C, G, U), mis annab võimaluse genereerida 64 erinevat koodonit (4^3). Kolm koodonit UAA, UAG ja UGA vastutavad valgusünteesi lõppemise eest ja aminohapet ei kodeeri (Petry *et al.* 2008). Seega on 20 erineva aminohappe kodeerimiseks 61 erinevat koodonit ja seetõttu võib väita, et geneetiline kood onkõdunud.

1.1 Ribosomaalne RNA (rRNA)

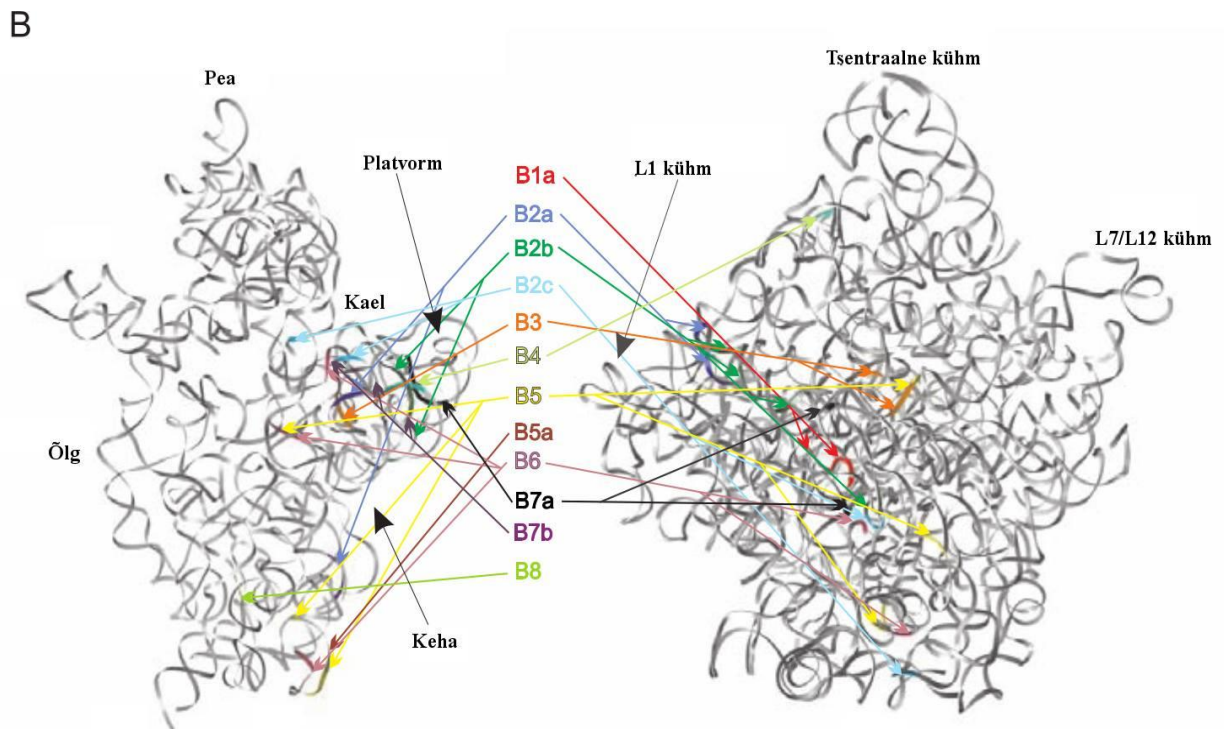
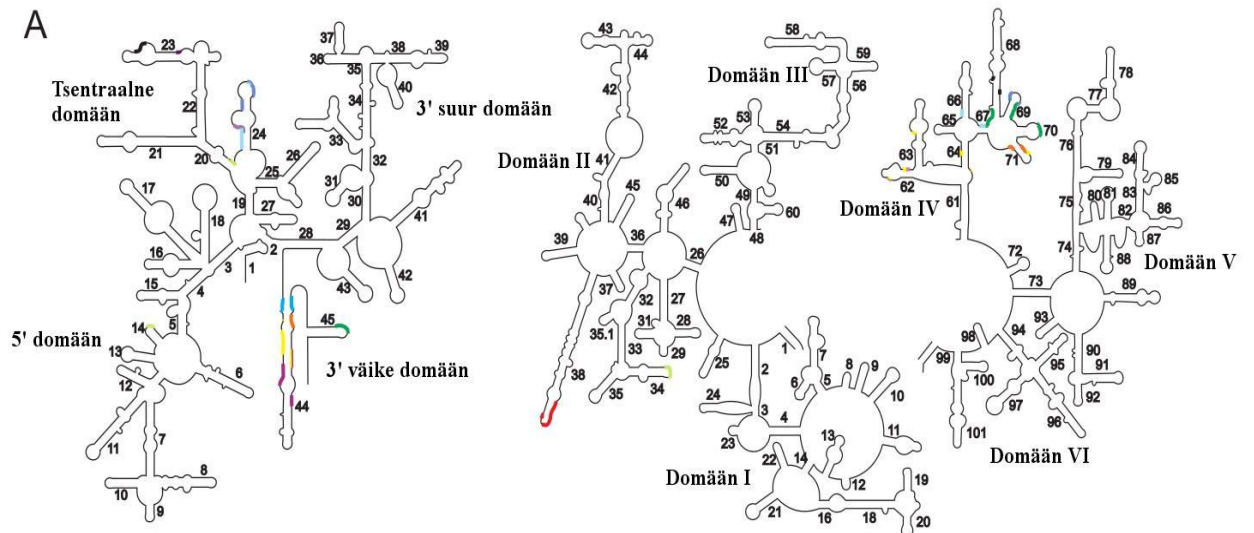
2/3 prokarioti ribosoomist moodustab rRNA. Bakteriaalne väike ribosomaalne subühik sisaldab 16S rRNA-d (1542 nt) ning suur ribosomaalne subühik sisaldab kahte rRNA-d: 5S rRNA-d (120 nt) ja 23S rRNA-d (2904 nt) (Cate 2012). Ribosoomi katalüütilised keskused (peptidüüli transferaasi ja dekodeeriv tsepter) moodustuvad pea eranditult rRNA-st (Picking *et al.* 1992).

Ribosoomi biogenees algab rRNA transkriptsiooniga ning kogu rRNA (16S, 23S ja 5S rRNA) sünteesitakse ühe primaarse transkriptina. Selleks, et rRNA algsest transkriptist saaks tekkida kaks erineva suurusega ribosomaalset subühikut, peab rRNA läbima rea posttranskriptsioonilisi sündmusi nagu rRNA modifitseerimine ja 5' ning 3' otste lõikamine RNAaside poolt (King *et al.* 1984; Del Campo *et al.* 2004). Transkripti küpsemine algab enne kui rRNA primaarse transkripti transkriptsioon on lõpuni viidud ning rRNA

sekundaarstruktuur hakkab tekkima kohe peale seda, kui vastav rRNA osa on transkribeeritud(Williamson 2003).

16S rRNA struktuur jaguneb sekundaarstruktuuri järgi neljaks domääniks:5' domään, tsentraalne domään, 3' väike ja 3' suur domään (Joonis 1A, vasak)(Yusupov *et al.* 2001). Kõik needsekundaarstruktuuri domäänid hargnevad 16S rRNA punktist, mis asub 30S subühiku geomeetrilises keskpunktis, kus toimuvad ühtlasi ka funktsionaalsed interaktsioonid mRNA ja tRNA-ga translatsiooni ajal. Selline rRNA organiseerumine 30S subühikus võimaldavad 16S rRNA domäänidel valgusünteesi ajal teineteise suhtes liikuda. (Yusupov *et al.* 2001).

23S rRNA on 16S rRNA-st ligi kaks korda suurem, sellega on seotud ligi kaks korda rohkem ribosomaalseid valke ning funktsioneerivas 50S subühikus peab 23S rRNA 5S rRNA-ga korrektseid interaktsioone looma(Kaczanowska & Ryden-Aulin 2007). Sekundaarstruktuuri järgi on 23S rRNA jagatud kuueks domääniks: domään I(nt 1-561, 2895-2904), domään II(nt 587-1250), domään III (nt 1271-1647), domään IV (nt 1679-1989), domään V (nt 2058-2610) ja domään VI (nt 2667-2914) (Joonis 1A, parem)(Yusupov *et al.* 2001). Sarnaselt 16S rRNA-ga harunevad ka 23S rRNA domäänid ühest kindlast piirkonnast. See piirkond on suurem, kui 16S rRNA puhul ja hiljuti on leitud ka, et see on struktureeritud. Tänu struktureeritusele moodustab see piirkond 23S rRNA-s omaette seitsmenda domääni, mida tuntakse nüüd domääni 0 nime all(Anton S. Petrov 2013).



Joonis 1. Sekundaar- (A) ja tertsiaarstruktuur (B) 16S rRNA-st (vasakul) ja 23S rRNA-st (paremal) koos ribosomaalsete sildade asukohtadega. A paneelil on kujutatud *E. coli* rRNA sekundaarstruktuur ja B paneelil *H. Marismortui* ribosomaalsete subühikute tertsiaarstruktuurid. Ribosomaalseid sildasid tekitavad järjestused märgitud erinevates värvides ja ribosomaalsete subühikute morfoloogilised elemendid on näidatud tertsiaarstruktuuri peal (Kiertyš *et al* 2009).

1.2 30S subühik

Väike subühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 ribosomaalselt valgust nimedega S1 kuni S21, kus „S“ tähistab väikest subühikut (S tuleneb inglise keelsest sõnast: *small* ehk väike) (Wilson

&Nierhaus 2005). Valkude ja rRNA jaotus 30S ribosomaalses subühikus on asümeetriline. Valgud asuvad reeglina subühikus perifeerselt ja subühiku pind, millega 30S kontakteerub 50S subühikuga, on väga valguvaene. Ükski valkudest ei asu täielikult subühiku sisemuses.(Wimberly *et al.* 2000). Valdav enamus r-valke omavad vähemalt ühte globulaarset domääni, mis reeglina asub ribosoomi subühiku pinnal. R-valgud võivad lisaks omada veel pikendusi, mis ulatuvad ribosoomi sisse, stabiliseerides sellega rRNA struktuuri. Peab märkima, et kui sellised valgud ei ole ribosoomiga seotud, siis valgu mitteglobulaarsed pikendused ei oma konkreetset struktuuri (Wilson & Nierhaus 2005).

Väike ribosomaalne subühik vastutab mRNA dekodeerimise eest ja selle struktuur on organiseeritud nii, et see võimaldaks translatsiooni käigus säilitada mRNA lugemisraami ning samal ajal hoida tRNA-sid, kui neid liigutatakse ühest seondumis-saidist teise (Cate 2012). Väike subühik roteerub translokatsioonil 50S subühiku suhtes 6°, mille tagajärjel suures subühikus tRNA-d liiguvad vastavalt A-st P-saiti ja P-st E-saiti. Väikeses subühikus esialgu translokatsiooni ei toimu(Frank & Agrawal 2000). Selleks, et tRNA-d liiguksid lõplikult järgmisesse saiti, liigub30S subühiku pea 12° vastu kellaosuti suunda ja sellega kontrollib mRNA ja tRNA liikumistvastavalt A ja P saidist P- ja E-saiti väikeses subühikus(Schuwirth *et al.* 2005).

Erinevalt 50S subühikust moodustavad 16S rRNA domäänid kõik eraldiseisvad morfoloogilised elemendid 30S ribosomaalses subühikus.Kokkuleppeliselt nimetatakse neid morfoloofilisi elemente sarnasus alusel peaks (16S rRNA 3' suur domään), kehaks (domään D), platvormiks (domään II) (Joonis 1B, vasak) (Stagg *et al.* 2003). Vähene kokkupuude pea ja teiste subühiku osade vahel viitab sellel, et 30S subühiku pea on translatsiooni ajal ilmselt väga liikuv (Yusupov *et al.* 2001).30S subühiku platvorm on paindub ja funktsionaalselt tähtis struktuur,mis sisaldab heeliks-lingusid 23 ja 24, mis on vajalikud P-saidis oleva tRNA sidumiseks ning subühikute ühendamisel. Tsentraalse domääni 3' otsas on heeliks 27 (H27), mis mõjutab translatsiooni täpsust, moduleerides dekodeeriva tsentri konformatsiooni (Clemons *et al.* 1999).

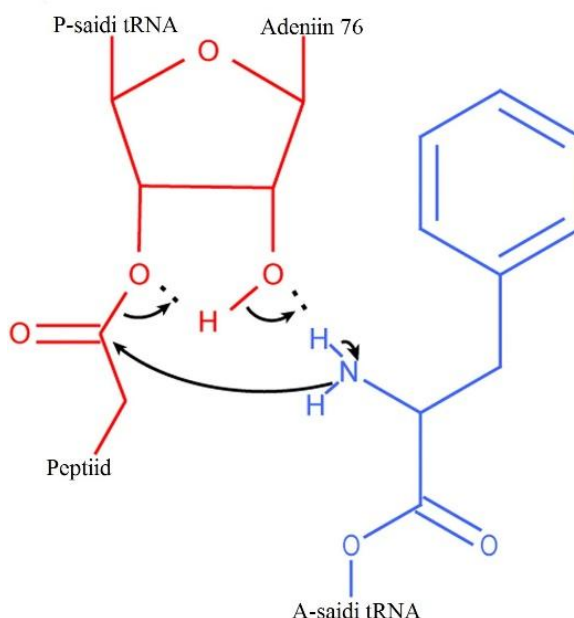
1.3 50S subühik

Eubakteriaalse suure subühiku struktuur on poolkera kujuline ja selle pinnal asuvate kolme kümme tõttu meenutab selle struktuur krooni (Joonis 1B, parem)(Yusupov *et al.* 2001; Schuwirth *et al.* 2005). 50S subühik koosneb 33 ribosomaalsest valgus L1 kuni L36 (L tuleneb inglise keelsest sõnast: *large* ehk suur) (Wilson & Nierhaus 2005). Suures subühikus

asuv peptidüültransferaasne tsepter (PTC) katalüüsib peptiidisideme teket A-saidis asuva aminoatsüül-tRNA küljes oleva aminohappe ja P-saidis asuva peptidüül-tRNA küljes oleva peptiidahela vahel (Hirabayashi *et al.* 2006).

PTC-st saab alguse polüpeptiidi väljumistunnel, mis võimaldab sünteesitava valgulliikuda läbi ribosoomi tsütoplasmasse (Moore & Steitz 2003). PTC koosneb täielikult rRNA-st. Seega katalüüsib valkude sünteesimist täielikult rRNA ja ribosoomi puhul on tegemist ribosüümiga (Cate 2012).

PTC peamiseks funktsiooniks on peptiidisideme süntees ja aminohapete kovalentne polüpeptiidiks ühendamine (Polacek & Mankin 2005). Peptiidisideme moodustumisel ründab A-saidis olev aminoatsüül-tRNA α -aminogrupp peptidüül-tRNA karbonüülgrupi süsinikku. Toimub estersideme aminolüüs tRNA A76 nukleotiidi ja aminohappe vahel (Joonis 2) ja kasvava peptiidahela ja A-saidi tRNA küljes oleva aminohappe vahele sünteesitakse peptiidside. Selle tagajärjel tekib A-saiti peptidüül-tRNA, mis on pikendatud ühe aminohappe võrra. Peale seda peab toimuma translokatsioon, et A-sait oleks vaba uue aminoatsüül-tRNA vastu võtmiseks ja saaks toimuda järgmise aminohappe lülitamine peptiidahelasse. Valgusünteesi kiirus on 15 kuni 50 peptiidsidet sekundis (Polacek & Mankin 2005).



Joonis 2. Peptidüültransferaases tseptri (PTC) toimuv reaktsioon. Aminoatsüül-tRNA (sinine) α -aminorühma nukleofiilne asendusreaktsioon P-saidi peptidüül-tRNA (punane) karbonüülsüsinikule (Johansson *et al.* 2011).

1.4. Valgusüntees

Valgusünteesi toimumiseks on vaja kolme erinevat RNA molekuli (mRNA, tRNA, rRNA) ning lisaks ka erinevatetranslatsioonifaktorite koostöö (Cooper2000). Valgusünteesi initsiatsiooniks bakteris on vajalik interaktsioon mRNA 6 kuni 9 nukleotiidi translatsiooni alguspunktist *upstream* asuva Shine-Dalgarno (SD) järjestuse ja 16S rRNA 3' otsas asuva anti-SD järjestuse vahel. Peale 30S subühiku ja mRNA primaarse ühinemise läbi SD-anti-SD interaktsiooni osalevad initsiatsioonifaktorid start-koodoni (AUG) paigutamises P-saiti. Valgusünteesi initsiatsiooniks *E.coli* rakus on vajalikud kolm initsiatsioonifaktorit: IF1, IF2 ja IF3.

IF1 seondub 30S subühikuga ja takistab animoatsüül-tRNA sisenemist A-saiti. IF2 seondub initsiaator-tRNA-ga ja kontrollib selle korrektset paigutamist ribosoomi P-saiti. IF2 hüdrolüüsib GTP-d, mis viib konformatsioonilise muutuseni ja võimaldab 70S subühiku moodustumise. IF3 hoiab 30S ja 50S subühikuid lahus, seega IF3 eraldumine on vajalik 70S subühiku moodustumiseks (Carter *et al.* 2001).

Peale initsiatsiooni asub initsiaator-tRNA P-saidis ning A-sait on vaba ning valmis elongaator-tRNA vastu võtmiseks (Shine & Dalgarno 1974). Aminoatsüül-tRNA saabub ribosoomi kompleksis EF-Tu ja GTP-ga. Korrektne koodon-antikoodon paardumine 30S subühiku dekodeerivas tsentris viib GTP hüdrolüüsini, mille viib läbi elongatsioonifaktor EF-Tu. Peale GTP hüdrolüüsi lahkub EF-Tu ribosoomist ja tRNA liigub lõplikult ribosoomi A-saiti (Cate2012). P-saidis asuv tRNA deatsetüleeritakse ja A-saidi tRNA ühendatakse kovalentselt kasvava polüpeptiidi külge. Selleks, et elongatsioon korduks peavad mRNA ja tRNA ühe koodoni võrra edasi liikuma. mRNA ja tRNA liikumist ribosoomis ühe koodoni võrra edasi nimetatakse translatsiooniks ja selle eest vastutab ribosoomi elongatsioonifaktor G (EF-G), mis on sarnaselt EF-Tu-le GTPaas (Steitz 2008).

1.5 Ribosoomi subühikute vahelised sillad

Ribosoomi subühikud on translatsiooni käigus teineteisega ühendatud erinevate subühikutevaheliste sildade kaudu. Suurem osa subühikutevahelisi sildasid omavad vaid RNA-RNA interaktsioone, kuid on ka RNA-valk interaktsioonidega sildasid ja ka üks valk-valk interaktsiooniga subühikute vaheline sild. *E.coli* 70S ribosoomi struktuurist on avastatud 13 silda: B1a, B1b, B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B5a, B6, B7a, B7b, B8 (Joonis 1B). B1b on ainuke ribosoomi subühikutevaheline sild, mis omab vaid valgulist komponenti (Yusupov *et al.* 2001). B2a, mis ühendab 23S rRNA heeliksit 69 16S rRNA-s asuva dekodeeriva

piirkonnaga, mängib tähtsat rolli subühikute ühinemises ja ribosoomi taaskasutamises. Seega on süühikutevaheline sild B2a vajalik aktiivse ribosoomi tekkeks (Liiv & O'Connor 2006).

Subühikutevaheliste sildade funktsiooniks on: (i) ribosoomi subühikute ühendamine valgusünteesi initsiatsioonil, (ii) ribosoomi funktsionaalsete keskuste (dekodeeriva ja peptidüültransferaasse tsentri) vahel signaali ülekandmine, (iii) translatsiooni ajal subühikute omavahelise liikumise vahendamine, (iv) tRNA-ribosoomi interaktsioonide moduleerimine (Liiv & O'Connor 2006).

1.6 Modifitseeritud nukleotiidid rRNA-s

RNA modifitseeritud nukleosiidid on keemiliselt muudetud standardsed A, G, U ja C nukleosiidid. Ribosomaalse RNA modifikatsioonideks on uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks (Ψ), uridiini 5,6 topeltsidemele ühe vesiniku lisamine dihydrouridiini (hU) tekkeks, ning metüülrühmade lisamine puriini- ja pürimidiiniringidele ja ka riboosi 2'-hüdrosüülile (Campo 2004).

rRNA modifitseeritakse posttranskriptsiooniliselt igas organismis ning enamasti on need modifikatsioonid ja nende asukoht konserveerunud. Enamus modifikatsioonidest asuvad RNA-de funktsionaalselt olulistest regioonides ja on spekulatsioonid, et selline rRNA modifikatsioonide konserveeruvus on oluline ribosoomi struktuuri ja funktsiooni säilitamiseks (Hur *et al.* 2006).

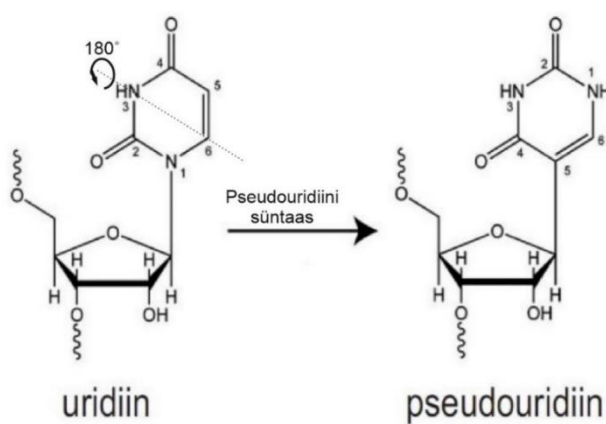
Modifikatsioonid sünteesitakse rRNA-sse posttranskriptsiooniliselt, kuid ribosomaalse RNA küpsemise erinevates etappides. Osa modifikatsioone sünteesitakse rRNA-sse varases assambleerimise etapis, kui enamasti r-valke ei ole veel rRNA-ga seotud ja rRNA ei ole veel oma lõpliku konformatsiooni saavutanud. Seevastu hiliste modifikatsioonide tekkimiseks on vajalik valmis ribosoom, kusenamasti valke on juba rRNA-ga seotunud ja rRNA on saavutanud oma lõpliku konformatsiooni (Siibak & Remme 2010). Sellest võib järeldada, et vähemasti osa modifikatsioonide vajavad õige nukleotiidi ära tundmiseks õigesti kokku pakitud struktuuri (Hur *et al.* 2006).

E. coli 16S rRNA sisaldab üht pseudouridiini ja kümme modifitseeritud nukleosiidi, kus metüülrühm on lisatud puriini- või pürimidiiniringile. Lisaks on veel dimetüülatsioon m^4Cm positsioonis 1402, mille puhul on modifitseeritud nii nukleotiidi riboos kui lämmastikalus (Ofengand & del Campo 2004). Kuna 16S rRNAs on ka kaks dimetüüladenosiini (m^6_2A), on 16S rRNAs kokku 13 modifitseeritud nukleotiidi (Ofengand & del Campo 2004).

E.coli 23S rRNA-s on 10 pseudouridiini ning 14 metüleeritud nukleotiidi, millest kolm on 2'-O-metülatsioonid. 23S rRNA sisaldab veel ka üksikut dihydrouridiini (del Campo *et al.* 2004) ja osaliselt modifitseeritud 5-hüdrosüütidiin positsioonis 2501 (h^5C) (Andersen *et al.* 2004). h^5C2501 esineb enamasti vaid statsionaarses kasvufaasis olevates *E.coli* rakkudes (Havelund *et al.* 2011).

1.7 Pseudouridiin

Pseudouridiin ehk uridiini C1'-C5 glükosiid-isomeer (Joonis 3) on kõige levinum modifikatsioonRNA-s ja seda on leitud tRNA-s, rRNA-s, tmRNA-s ja snRNA-s (Hur *et al.* 2006), eukariootidel on pseudouridiini leitud ka mRNA-s (Schwartz *et al.* 2014).



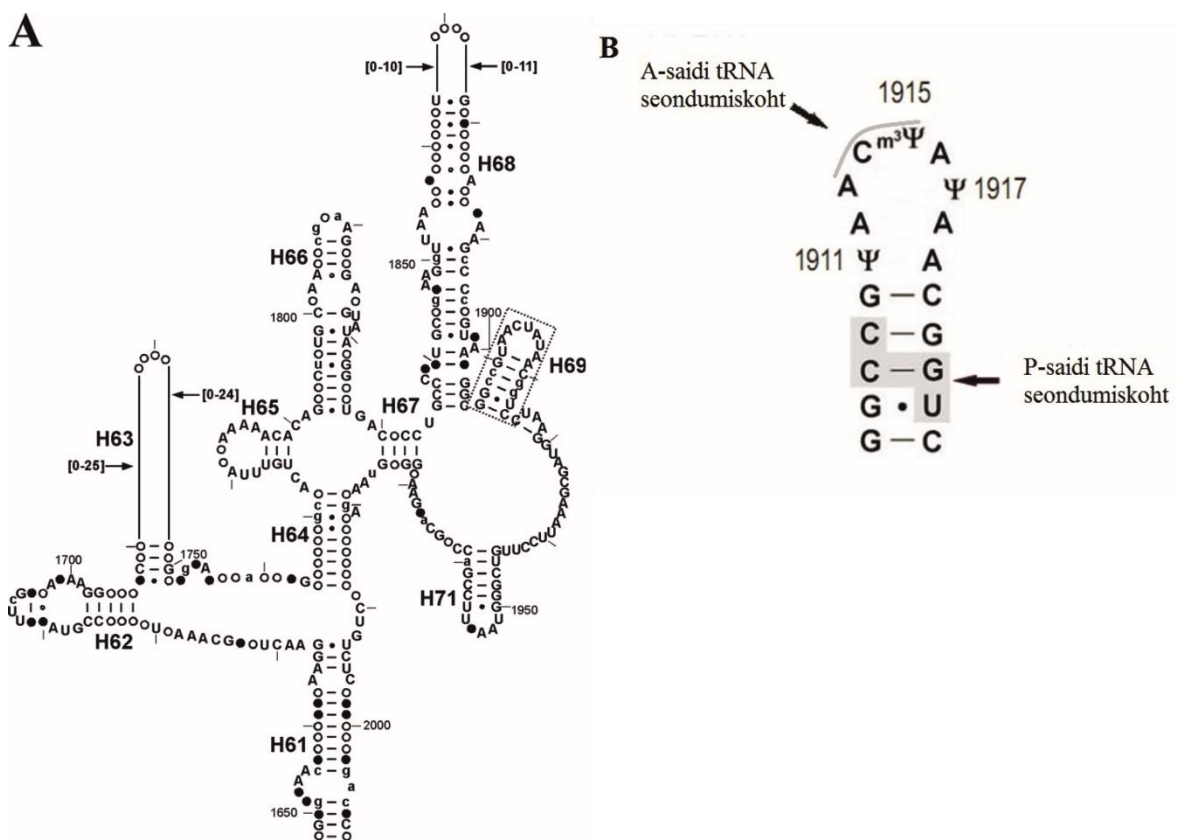
Joonis 3. Uridiini isomerisatsioonireaktsioon pseudouridiiniks pseudouridiini süntaasi toimel. Reaktsiooni käigus katkestatakse C1'-N1 glükosiidne side. Uratsiilalus keeratakse 180° ümber C6-N3 telje ning sünteesitakse uus C1'-C5 glükosiidne side. Pseudouridiini lämmastikaluse ja riboosi vahel on C-C glükosiidne side, mis võimaldab suuremat pöörlemisvabadust võrrelduna uridiini N-C glükosiidse sidemega. Pseudouridiin omab võrreldes uridiiniga ühte lisa vesiniksideme doonorit N1 positsioonis (Hamma & Ferre-D'Amare 2006).

Escherichia coli rRNA-des on avastatud kokku 11 pseudouridiini: üks 16S rRNA-s ja kümme pseudouridiini 23S rRNA-s, millest üks on lisaks metüleeritud (Ofengand & del Campo 2004).

Kuna pseudouridiin omab võrreldes uridiiniga ühte lisa vesiniksideme doonorit, on spekuleeritud, et pseudouridiini lisamine võib vähendada RNA lokaalset paindlikkust RNA-RNA kontakte juurde luues või mõnel juhul ka RNA- Valk interaktsioone täiustades (Ofengand & del Campo 2004). Samuti võib pseudouridiin osa võtta intramolekulaarsetest interaktsioonidest ribosoomi tähtsate ligandidega nagu tRNA ja mRNA või valgusünteesi faktoritega (Davis 1995).

Pseudouridiinid positsioonides 1911, 1915 ja 1917, mis kõik on sünteesitud pseudouridiini süntaasi RluD poolt, on tähtsad 50S subühiku korrektsele assambleerumisele ja selle seondumisele 30S subühikuga (Vaidyanathan *et al.* 2007). Need pseudouridiinid asuvad 23S rRNA heeliksis 69 (H69) (Joonis 4), mis moodustab heeliksi 44-ga subühikute vahelise silla B2a, mis omakorda mängib tähtsat rolli kahe ribosomaalse subühiku ühendamisega ja ribosoomi stabiliseerimisel valgusünteesi ajal (Yusupov *et al.* 2001).

RluD poolt sünteesitavad pseudouridiinid on vajalikud ribosoomi normaalseks funktsioneerimiseks ja assambleerimiseks (Raychaudhuri *et al.* 1998). On leitud, et *rluD* geeni deletsioon *E. coli* tüves K-12 põhjustab aeglase kasvu fenotüüpi, suurenenud stopkoodonist ülelugemist ning vigase 50S subühiku assambleerimist ja defektset 30S-50S subühikute ühinemist. Aeglase kasvu fenotüüp ja teised defektid, mis on seotud *rluD* inaktivatsiooniga *E. coli* tüves K-12, on seotud vigase RF2 (*release factor 2*) valguga, millel onalaniini või seriini asemel treoniin positsioonis 246 (O'Connor & Gregory 2011).



Joonis 4. *E. coli* 23S rRNA IV domääni ja H69 sekundaarstruktuur. Heeliksi 69 punktiiriga piiratud, joonisel B suurendatult. Joonisel B märgitud pseudouridiinid positsioonides 1911, 1915, 1917 ja ka A-saidi ning P-saidi tRNA seondumiskoht (Hirabayashi *et al.* 2006).

1.8 Pseudouridiini süntaasid

Kõigi tänaseks teada olevate pseudouridiini süntaaside struktuurid viitavad konserveerunud katalüüsi reaktsioonimehhanismile, kuid erinevate pseudouridiini süntaaside märklaua ära tundmine varieerub lihtsast „juuksenõela“ struktuuri ära tundmisest kuni komplekssete kolmedimensionaalsete RNA struktuuride ära tundmiseni (Hur *et al.* 2006).

Pseudouridiini süntaasidmuudavad oluliselt substraadiks oleva nukleotiidi omadusi lisamata sellele ühtegi keemilist rühma. Reaktsiooni käigus katkestatakse C1'-N1 glükosiidne side. Uratsiilalus keeratakse 180° ümber C6-N3 telje ning sünteesitakse uus C1'-C5 glükosüülside (Joonis 3)(Arluison *et al.* 1998). Kõik pseudouridiini süntaasid sisaldavad aktiivtsentris aspartaati ja samuti on sarnane nende katalüütilise tsentri ehitus, mis võimaldab katalüüsida sellist isomerisatsioonireaktsiooni (Del Campo *et al.* 2001).

Primaarstruktuuri järgi on pseudouridiini süntaasid jagatud viieks perekonnaks: TruA, TruB, TruD, RsuA ja RluA(Koonin 1996; Kaya & Ofengand 2003). Perekonnad on nimetatud vastavalt nende perekondade esindajate järgi *E.coli*-s(Hamma & Ferre-D'Amare 2006).

TruB (tRNA spetsiifiline pseudouridiini süntaas B) katalüüsibpseudouridiini sünteesimise tRNA T-„juuksenõela“ positsiooni 55. TruB-l on C-terminaalses otsas PUA domään, mis mängib suurt rolli tRNA aktseptor „juuksenõela“ äratundmisel(Hur *et al.* 2006). TruB kritstallstruktuuris on näha 29 aminohappe pikkune „pöial“ domään, mis asub TruB aktiivtsentri vahetus läheduses. Seostumisel substraadiga võtab „pöial“ domään heeliksi kuju, põhjustades sellega tRNA antikoodon „juuksenõelas“ asuva kolme aluse, kaasaarvatud U55, liikumise TruB aktiivsaiti(Hur *et al.* 2006). On näidatud, et TruB tunneb ära konsensusjärjestuse U54-U55-X56-X57-A58, kus X on suvaline nukleotiid (Gu *et al.* 1998).

TruD isomeriseeriburidiini tRNA D-„juuksenõela“ positsioonis 15. Võrreldes teiste pseudouridiini süntaasidega omab TruD ~140 aminohappe pikkust insertsiooniC-terminuses, mida nimetatakse TRUD domääniks. TRUD domään ja selle positiivne elektrostaatiline olemus sarnanevad TruB pöialdomäänile. Valgu seostumisel substraadiga liigub ka TRUD domään ~18° konserveerunud katalüütilise südamikku suhtes ja klammerdub RNA substraadi külge, põhjustades sellega radikaalse tRNA konformatsiooni muutuse. Sellised TRUD domeeni poolt põhjustatud konformatsioonilised muutused tRNA D-„juuksenõelas“ võimaldavad positsioonis 15 asuval uridiinil liikuda ensüümi aktiivtsentrisse. TRUD domään interakteerub antikoodon „juuksenõelaga“ ja ka D-„juuksenõelaga“, samas kui TruB-tRNA pöialdomään interakteerub vaid T-„juuksenõelaga“ (Ericsson *et al.* 2004; Hur *et al.* 2006).

TruA modifitseerib tRNA antikoodoni „juuksenõelas“ positsioonides 38-40 asuvad uridiinid, seega tegu on pseudouridiini süntaasiga, mis pole spetsiifiline ühe kindla uridiini suhtes, vaid spetsiifiline kindla tRNA piirkonna suhtes (Foster *et al.* 2000). TruA on ainus pseudouridiini süntaas *E.coli*-s, mis funktsioneerib kui homodimeer(Foster *et al.* 2000). Erinevalt TruB-st vajab TruA modifitseerimiseks tervet funktsionaalset tRNA-d, ainult tRNA antikoodon „juuksenõel“ struktuur ei ole TruA jaoks substraadiks (Hur *et al.* 2006).

RluA (ribosoomi suure subühiku RNA pseudouridiini süntaas A) sünteesib pseudouridiine *E.coli* 23S rRNA positsiooni 746, mis asub 23S rRNA „juuksenõelas“ 35 ning tRNA positsiooni 32, mis asub tRNA antikoodon „juuksenõelas“ (Wrzesinski *et al.* 1995). Seega on RluA ainuke teadaolev pseudouridiini süntaas, mis on võimeline modifitseerima kahte erinevat liiki RNA-d. On teada, et nii 23S rRNA pseudouridiin 746 kui ka tRNA pseudouridiin 32 esinevad samas konsensusjärjestuses ΨUGAAAA(Wrzesinski *et al.* 1995). Seega võib arvata, et RluA tunneb oma substraadi ära eelkõige RNA primaarjärjestuse järgi (Wrzesinski *et al.* 1995). Ensüümi seondumisel substraadile RNA „juuksenõel“ reorganiseerub, mis võib kaasa aidata järjestuse ära tundmisele. Ensüüm modifitseerib nii täispikkuses 23S rRNA-d kui ka selle fragmenti, mis koosneb 23S rRNA nukleotiididest 1-847 (Hoang *et al.* 2006).

RsuA katalüüsib 16S rRNA positsioonis 516 oleva uridiini muutmist pseudouridiiniks. RsuA koosneb N-terminaalsest domäänist, mis on C-terminaalse domääni ja südamikuga ühendatud pika linkeri kaudu. N-terminaalne RNA-d siduv domään on sarnane ribosomaalse valguga S4. C-terminaalne domään ja südamik on nii struktuuri kui ka katalüütilise aspartaadijäägi positsiooni poolest sarnased TruA-le(Sivaraman *et al.* 2002). Mille järgi RluA oma substraadi ära tunneb ei ole veel teada.

1.9 RluD

RluD (inglise keelest: *Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D*, endine nimi Yfil) on ribosoomi suure subühiku RNA-d modifitseeriv ensüüm, mis sünteesib uridiinist pseudouridiini 23S rRNA positsioonides 1911, 1915 ja 1917(Koonin 1996). RluD märklaud asub 23S rRNA domeeni IV väikeses „juuksenõelas“, mis on väga konserveerunud piirkond ning seostub 16S rRNA-ga ja on vajalik dekodeerimises (Joonis 4)(Leppik 2013).

Geeni katkestamisel saadud RluC ja RluD defitsiitseid rakke uurides ja võrreldes metsiktüübi teadaolevatele pseudouridiini saitidele selgus, et RluC modifitseerib positsioonid 955, 2504 ja 2580 ning RluD positsioonid 1911, 1915 ja 1917. Seega mõlemad valgud on multispetsiifilised(Huang *et al.* 1998). *rluC* geeni katkestamine ei mõjuta raku kasvu, samas

kui *rluD* geeni katkestamine viib aeglase kasvu fenotüübile (Huang *et al.* 1998). Kui aga RF2 (*release factor2*) valgu positsioonis 246 on treoniini asemelalaniin, ei oma *rluD* deletsioonrakkude kasvule, terminatsioonile ega ribosoomi funktsioonile olulist mõju (O'Connor & Gregory 2011).

Nii RluD kui ka RluC substraadiks on 23S rRNA ja mõlemad ensüümid kuuluvad homoloogia alusel RluA pseudouridiini süntaaside perekonda. Kui RluD ja RluC substraadina kasutada *in vitro* sünteesitud modifitseerimata 16S rRNA-d, 23S rRNA-d ja pärmi tRNA-d, katalüüsivad mõlemad ensüümid pseudouridiini teket ainult rRNA-s (Huang *et al.* 1998). RluD katalüüsib *in vitro* 23S rRNA 591 uridiinist pseudouridiiniks oodatud ühe või mõne asemel märgatavalt rohkem, mis viitab ensüümi spetsiifilisuse olulisele vähenemisele *in vitro* transkribeeritud substraadi suhtes (Huang *et al.*, 1998). Oodatult ei ole tRNA kummalegi ensüümile substraadiks. 16S rRNA-d substraadina kasutades katalüüsivad ensüümid samuti oodatud ühe pseudouridiini asemel rohkem. Kui aga kasutada substraadina ribosoomidest välja puhastatud rRNA-d, sünteesitakse pseudouridiinid ka vastavatesse kohtadesse, mis on ensüümidele looduslikeks substraatideks, mida *in vitro* sünteesitud rRNA puhul ei toimunud (Huang *et al.* 1998). *In vitro* modifitseerivad ensüümid rohkem uridiine kui *in vivo*, seega mõjutavad ensüümi spetsiifilisust ka teised faktorid, nagu näiteks RNA struktuurielemendid ja seotud valgud (Huang *et al.* 1998).

RluD on monomeerne ensüüm ja see koosneb üheksast beeta-ahelast, viiest alfa-heeliksist ja N-terminaalsest S4-sarnasest domäänist, mis ühendub painduva linkeriga C-terminaalse katalüütilise domääni külge (Del Campo *et al.* 2004). RluD katalüütiline domään koosneb 250 aminohappe jäägist. RluD S4-sarnane domäänipeetakse RNA-d siduvaks domeeniks tänu tema sarnasusele ribosoomi valguga S4. Ilma S4-sarnase domäänita on RluD *in vitro* võimeline modifitseerima ka positsiooni U2457, mis tavaliselt modifitseeritakse RluE poolt (Huang *et al.* 1998; Del Campo *et al.* 2004).

Olemasolevate andmete põhjal võib arvata, et S4-sarnase domäänil võib olla oluline roll RluD spetsiifika tagamises, kuna see osaleb esialgses substraadile kinnitumises, mis võimaldab katalüütilise domääni väiksemat affiinsust substraadi suhtes (Vaidyanathan *et al.* 2007). Nii saab ensüüm modifitseerida sobivad kolm nukleotiidi ning hoiduda mitteproduktiivsesse ensüüm-produkt kompleksidesse takerdumist (Mizutani *et al.* 2004). Nagu kõigil pseudouridiini süntaasidel asub ka RluD katalüütilises tsentris katalüütiline aspartaadijääk (Asp 139) (Del Campo *et al.* 2004).

Varasemalt arvati, et RluD tunneb ära vaid H69 struktuuri ja isomeriseerib ebaspetsiifiliselt kõiki seal leiduvaid uridiine (Ofengand 2002). Siiski isomeriseerib RluD *in vivo* uridiine ainult positsioonides 1911, 1915, 1917 ja seda olenemata uridiinide olemasolust 23S rRNA heeliksi 69 teistes positsioonides (Leppik *et al.* 2007). RluD on *in vivo* väga spetsiifiline positsioonidele 1911, 1915, 1917 suhtes, kuid kaotab osa oma spetsiifilisusest *in vitro*. Madala magneesiumi kontsentratsiooni juures ja *in vitro* transkribeeritud rRNA-l isomeriseerib RluD märksa rohkem uridiine (Wrzesinski *et al.* 2000). Seega RluD on *in vitro* vähespetsiifiline ning isomeriseerib uridiine, mis pole tema looduslikeks substraatideks. Võimalik, et rRNA on madala magneesiumi kontsentratsiooni juures vähem struktureeritud. Lisaks pole *in vitro* transkribeeritud 23S rRNA-l ühtki modifikatsiooni. Võib järeldada, et RluD spetsiifiliseks seondumiseks vajalikud struktuurielemendid on puudu. *In vitro* tRNA-le ei sünteesi RluD ühtki pseudouridiini, seega ei kaota ensüüm *in vitro* oma spetsiifilisust täielikult (Leppik 2013).

Prokarüootide pseudouridiini sünteesi substraadi spetsiifilisuse kohta on vähe teada. Kogutud andmete alusel on spekulatsioonid, et RluD seondumine substraadile on kaheetapiline. S4-sarnane domään vastutab RluD esimese seondumise eest 23S rRNA-le ja on vajalik katalüütilise domääni suunamiseks H69-le lähedusse. Teise etapina seondub katalüütiline domään H69-ga. Sobivalt S4-sarnase domääni seondumiseks tekib alles peale ribosoomi 50S subühiku täieliku assambleerimise ning RluD spetsiifilise *in vivo* seondumise substraadiga enne seda toimuda ei saa (Leppik 2013).

Ühe RluD substraadiks oleva uridiini vahetamine tsütosiini vastu ei oma mingit efekti ülejäänud RluD poolt sünteesitud pseudouridiinide tekkel ehk siis pseudouridiinide tekkimine positsioonides 1911, 1915 ning 1917 on teineteisest täiesti sõltumatud (Leppik 2013). Kõik RluD poolt sünteesitud pseudouridiinid ilmuvad RNA ahelasse samaaegselt, mis viitab sellele, et erinevate pseudouridiinide süntees on üksteisest sõltumatu. RluD isomeriseerib oma substraadid järjest, ühe seondumise jooksul, või siis isomeriseerib iga seondumisega ühe uridiini. Mõlemal juhul isomeriseerib RluD uridiine suvalises järjekorras (Leppik 2013)

Eksperimentaalne osa

Töö eesmärgid

Pseudouridiinide asukoht rRNA struktuuris on väga konserveerunud, mis viitab sellele, et pseudouridiinid on rRNA funktsioneerimiseks vajalikud. Pseudouridini süntaaside funktsioon on spetsiifiliselt isomeriseerida uridiine pseudouridiinideks. Olgugi, et pseudouridiini süntaaside katalüütilise tsentri struktuur on väga konserveerunud, pole siiani selge kuidas enamuse süntaase saavutab oma spetsiifilisuse. Eriti intrigeeriv on multispetsiifiliste pseudouridiini süntaaside spetsiifika, kuna üks valk peab spetsiifiliselt ära tundma mitu substraadiks olevat uridiini.

E.coli-s on kolm multispetsiifilist rRNA-d isomeriseerivat pseudouridiini süntaasi: RluA, RluC ja RluD. Kõik nimetatud ensüümid omavad oma N-terminaalses osas S4-sarnast domääni, mis on ühendatud C-terminaalse katalüütilise domääniga linkeri kaudu. Meie laboris on varasemalt kindlaks tehtud, et RluD S4-sarnase domääni vahetamine RluC S4-sarnase domääni vastu põhjustab RluD spetsiifilisuse kadumise oma looduslike substraatide suhtes. Siiski säilib spetsiifilisus rRNA suhtes (Leppik & Remme, avaldamata).

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida uus kimäärne pseudouridiini süntaas RluMSD, mis sisaldaks N-terminaalse domäänina MS2 bakteriofaagi kattevalku ja C-terminaalse domäänina RluD katalüütilist domääni. Lisaks oli eesmärgiks välja selgitada kas N-terminaalne MS2 kattevalk põhjustab uue kimäärse pseudouridiini süntaasi spetsiifilisust MS2 bakteriofaagi RNA suhtes.

2 Materjal ja meetodika

2.1. Kasutatud bakteritüved:

Escherichia coli M15DZ291 F-, $\Phi 80\Delta lacM15$, *thi*, *lac*-, *mtl*-, *recA*+ , *KmR* (Qiagen)

Escherichia coli MG1655 F-, λ - *ilvG*-, *rfb-50*, *rph-1*

Escherichia coli PRC MG1655 2 F-, λ -, *rph-1*, $\Delta rluC$, $\Delta rluD$

Escherichia coli Q13 8 Hfr(PO21), *rna-19*, *gdhA2*, *his-95?*, *tyrA6*, *relA1*, *pnp-13*, *spoT1*, *metB1*

2.2 Kasutatud praimerid (värvidega märgitud praimeritega sisse viidud restiktsioonisaaidid):

RluQE 3'5' - GCA GAT CTT AAC CAG TCC ACT TCA TCC T - 3'

RluD Esp3I 5' NcoI 5' - GCC GTC TCCCAT GGC ACA ACG AGT ACA GCT -3'

MS2 Coat NcoI Dir 5' - GCC ATG GCT TCT AAC TTT ACT CAG TTC GTT CTC G - 3'

MS2 Coat Esp3I Rev 5' - G CGT CTC TTC TTC GTA GAT GCC GGA GTT TGC TGC
GAT TGC TGA GGG AAT CGG - 3'

Type III/IV primer 5'-CGGAT AACAA TTTCA CACAG-3'

Reverse primer 3'-GGTCA TTA CT GGAGT CTTG-5'

2.3. Kasutatud plasmiidid:

pQE-60 (Qiagen) – ekspressioonivektor, mis sisaldab represseritavat lac promootorit ja võimaldab lisada valgule C-terminaalsesse otsa aafiinsuspuhastamiseks 6 histidiini jääki.

pQE-60 RluD wt - pQE-60 ekspressioonivektor pQE-60, mis sisaldab lac promootori kontrolli all *rluDwt* geeni.

pQE-60 MS2 Coat - pQE-60 ekspressioonivektor pQE-60, mis sisaldab lac promootori kontrolli all MS2 kattevalgu geeni

HBP MS2-His – ekspressioonivektor, mis sisaldab bakteriofaag MS2 kattevalku ja valgu aafiinsuspuhastamiseks 6xHis järjestust (kingitus Rachel Green'i laborist)

2.4. Kimäärese plasmidi konstrueerimine ja kontrollimine

2.4.1. Kloneerimine

MS2 bakteriofaagi kattevalgust ja RluD katalüütilisest domäänist koosneva kimäärese valgu geeni kloneerimiseks ekspresioonivektorisse pQE-60 (Qiagen) kasutati mitmeetapilist kloneerimisskeemi. Kloneerimise skeem on toodud joonisel 5.

RluD katalüütilise domääni ning MS2 kattevalgu geenijärjestused amplifitseeriti ja nende otstesse viidi restriksioonisaaidid PCR meetodiga, kasutades vastavalt praimereid **RluQE 3'**, **RluD Esp3I 5' NcoI** ja **MS2 Coat NcoI Dir**, **MS2 Coat Esp3I Rev**. Matriitsidena kasutati plasmide pQE-60 RluD wt ja HBP MS2-His. PCR-i reaktsioonisegu sisaldas 5µl 10x PCR puhvrit (750mM Tris ph 8.8, 200mM NH₂SO₄, 0,1% tritonX 100, 5% ficoll400, 10mM tartazine), 10ng matriits DNA-d, 30pmol praimereid, 2,5mM lõppkonsentratsiooniga MgCl₂, 0,2mM dNTP-d, 5U Pfu DNA polümeraasi (puhastatud Üldise- ja mikrobibiokeemia laboris). Reaktsiooni lõppruumala oli 50µl ja toimus järgmistel tingimustel:

Etapp	Temperatuur	Aeg (sek)	Tsüklike arv
1. Algne denaturatsioon	94°C	180	1
2. Denaturatsioon	93°C	30	32
3. Praimerite seondumine	56°C	40	
4. Elongatsioon	72°C	90	
5. Lõplik elongatsioon	72°C	420	1

Peale PCR reaktsiooni lõppu lahutati DNA fragmendid eraldi radadel 0,8% agarosgeelis, 1X TBE puhvris (90mM TrisHCl pH 8.8, 90mM boorhape, 1mM EDTA) elektroforeesi teel pingega 120V, et vabaneda praimeritest, nukleotiididest ja PCR-i käigus tekkinud valedest reaktsiooni produktidest. DNA suurusmarkerina kasutati Gene Ruler Plus 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific). DNA fragmentide visualiseerimiseks UV valguses (260nm) sisaldas agarosgeel 0,6µg/ml EtBr. Agarosgeelist puhastati DNA fragmendid, mis vastasid RluD katalüütilisele domäänile (797 bp) ja MS2 bakteriofaagi kattevalgule (400 bp), GeneJET Gel Extraction Kit-iga (Thermo Scientific) vastavalt tootjapoolsele protokollile.

MS2 kattevalgu ja RluD katalüütilise domääni geenide ühendamiseks lõigati geelist puhastatud PCR produkte restriktasiga Esp3I (Thermo Scientific) tootja poolt ettenähtud puhvris 2 tundi +37°C. DNA fragmendid lahutati 0,8%-lises agarosgeelis ja puhastati nagu kirjeldatud eelnevalt.

Järgnevalt ligeeriti saadud MS2 kattevalgu ja RluD katalüütilise domääni fragmendid omavahel. Ligeerimiseks võeti mõlemast proovist ~0,6µg DNA-d, 5U T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific), lisati 2µl 10x tootja poolt määratud ligatsioonipuhvrit, 1µl 25mM HCC. MQ veega viidi maht 20µl-ni. Proove inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit ja seejärel 10 minutit +37°C juures. Kokku ligeeritud RluMSD fragmendi amplifitseerimiseks PCR-iga võeti 5µl ligatsioonisegu ja kasuti primereid **RluQE 3'** ja **MS2 Coat NcoI DIR**. PCR-i tingimused eelnevalt kirjeldatud.

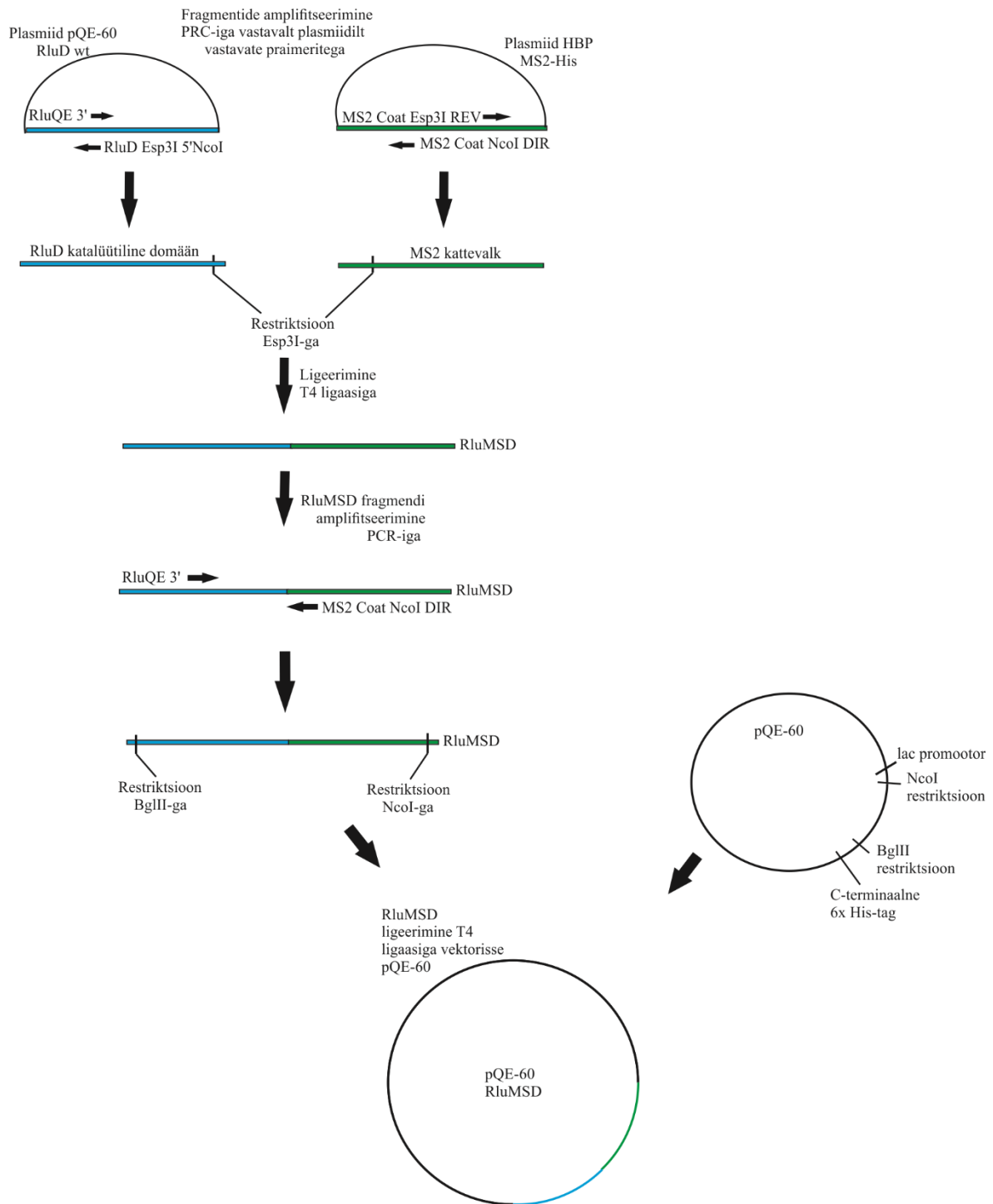
PCR-ga saadud fragment lahutati 0,8% agarosgeelil nagu kirjeldatud eelnevalt. Geelist lõigati välja fragment pikkusega 1170 bp, mis puhastati geelist GeneJET Gel Extraction Kit-iga (Thermo Scientific) vastavalt tootjapoolsele protokollile. Edaspidi MS2 kattevalgu ja RluD katalüütilise domääni kokku ligeeritud fragment nimetatud **RluMSD**-ks.

1µg agarosgeelist puhastatud RluMSD fragmenti ja 2µg plasmidi pQE-60 lõigati 7U restriktasidega NcoI ja BglII (Thermo Scientific) tootja poolt ette nähtud puhvrites 100µl-s reaktsioonimahus, inkubeerides +37°C juures 2h. Kahe restriksiooni vahel puhastati DNA puhvri vahetuseks reaktsioonisegust välja GeneJET Gel Extraction Kit-iga (Thermo Scientific).

RluMSD geen ligeeriti pQE-60 plasmidi NcoI/BglII restriksioonisaitide vahele T4 DNA ligaasiga. Ligeerimiseks võeti 0,6µg NcoI/BglII lõigatud pQE-60 plasmidi, 0,3 µg RluMSD fragmenti, 5U T4 DNA ligaasi (Thermo), 1µl 25mM HCC, 2µl 10x tootja poolt määratud ligatsioonipuhvrit. Proovi inkubeeriti ligeerimiseks +37°C juures 2h. Kloneerimise täpne skeem on toodud joonisel 5.

1µg agarosgeelist puhastatud RluMSD fragmenti ja 2µg plasmidi pQE-60 lõigati 7U restriktasidega NcoI ja BglII (Thermo Scientific) tootja poolt ette nähtud puhvrites 100 µl-s reaktsioonimahus, inkubeerides +37°C juures 2h. Kahe restriksiooni vahel puhastati DNA puhvri vahetuseks reaktsioonisegust välja GeneJET Gel Extraction Kit-iga (Thermo Scientific).

RluMSD geen ligeeriti pQE-60 plasmidi NcoI/BglII restriksioonisaitide vahele T4 DNA ligaasiga. Ligeerimiseks võeti 0,6µg NcoI/BglII lõigatud pQE-60 plasmidi, 0,3µg RluMSD fragmenti, 5U T4 DNA ligaasi (Thermo), 1µl 25mM HCC, 2µl 10x tootja poolt määratud ligatsioonipuhvrit. Proovi inkubeeriti ligeerimiseks toatemperatuuril 2h. Kloneerimise täpne skeem on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Skeem kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD konstrueerimiseks ja kloonimiseks ekspressioonivektorisse pQE-60. RluD katalüütiline domään amplifitseeriti PCR-iga märgitud praimereid kasutades üles plasmiidist pQE-60 RluD wt ja MS2 kattevalk märgitud praimeritega plasmiidilt HBP MS2-His. Saadud fragmendid lõigati restriktiaasiga Esp3I ja ligeeriti, mis järel amplifitseeriti saadud RluMSD fragment PCR-iga kasutades märgitud praimereid. RluMSD fragment ja plasmiid pQE-60 lõigati restriktiaasidega BglIII ja NcoI, misjärel RluMSD fragment ligeeriti pQE-60 plasmidi IPTG-ga indutseeritava lac promootori alla.

2.4.2. Transformatsioon

Transformatsiooniks kasutati keemiliselt kompetentseks muudetud *E. coli* M15tüve rakke. Rakud sulatati aeglaselt jääl. Lisati 12ng plasmidi ning inkubeeriti 40 minutit jääl. Seejärel tehti rakkudele *heatshock*, inkubeerides rakke 1 min 42°C. Rakkudele lisati ~1ml 2x YT (11 dH₂O kohta 16g trüptooni, 10g pärmiekstrakti, 5g NaCl) söödet ning inkubeeriti 1h +37°C juures. Rakud koguti tsentrifuugimise teel 4000 rpm 5 min toasoojas lauatsentrifuugis (Heraeus Pico). Rakusademelt eemaldati enamus söötmet. Eppendorfi reaktsioonituubi jäi ~150µl söödet, milles resuspendeeriti rakud, mis külvati ampitsilliini (100µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmele. Rakukolooniate tekkimiseks inkubeeriti tardsöödet +37°C juures üleöö.

2.4.3. Plasmidi kontrollimine koloonia PCR meetodil

PCR-iks lüüsi üks *E. coli* koloonia LB plaadilt 95°C juures 10µl mQ vees 5 minuti jooksul. Peale inkubatsiooni lisati 2µl 25mM MgCl₂, 2,5µl 10x PCR puhvrit, 0,5µl 10 mM dNTP, 30pmol pQE-60 plasmidi spetsiifilisi primereid **Type III/IV primer** ja **Reverse primer**, 5U Taq polümeraasi (puhastatud TÜ MRI üldise- ja mikroobiokeemia õppetoolis). Reaktsiooni maht viidi mQ veega 25µl-ni. PCR programm kirjeldatud eelnevalt.

Peale PCR-i reaktsiooni lahutati DNA produktid 0,8%-lisel etiidiumbromiidi sisaldaval agarosgeelil, 1x TBE puhvril. Agarosgeelile kanti 1/5 reaktsioonisegust. PCR fragmendi pikkuse määramiseks kasutati GeneRuler 1kb DNA Ladder-it. Oodatavaks fragmendi pikkuseks oli ~1280bp.

2.4.4. Plasmidse DNA puhastamine minipreparatsiooni meetodil

Plasmidi puhastamiseks *E. coli* rakkudest inokuleeriti 2 ml 2x YT (100µg/ml Amp) 1 kolooniaga LB tassilt ja inkubeeriti üleöö. Rakud koguti tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugis 13 000 rpm 2 min +4°C. Supernatant eemaldati ja rakud resuspendeeriti 150µl lahuses P1 (Qiagen). Rakkude lüüsimiseks lisati 150 µl lahust P2 (Qiagen), segati ettevaatlikult ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Lüüsilahuse neutraliseerimiseks lisati 150µl lahust P3 (Qiagen), segati ettevaatlikult ning inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Lisati 300µl 4M NaClO₄, inkubeeriti toatemperatuuril 3 min, misjärel tsentrifuugiti +4°C lauatsentrifuugis 13 000 rpm 15 min. Supernatant tõsteti üle uude 2 ml reaktsioonituubi ja lisati 1300µl 5M GuCN-i. DNA sidumiseks lisati segule 15µl 50% ränisuspensiooni ning segati vortexil 5 min. Räni-DNA kompleks sadestati tsentrifuugimise teel 6000 rpm 30 sek ning supernatant eemaldati. Sadet pesti kaks korda 1ml 50%-lise etanooliga ja kuivatati +37°C juures 10 min. DNA elueerimiseks räni küljest lisati 40µl mQ vett, inkubeeriti 5 min +37°C juures. Ränist vabanemiseks tsentrifuugiti 13 000 rpm 3 min ning tõsteti puhas DNA

vesilahus uude 1,5ml reaktsioonituubi. DNA lahuse kontsentratsioon määrati NanoDrop-iga $A_{260\text{nm}}$.

2.4.5 Valguekspressiooni kontroll PAA-SDS geelis

Üks koloonia *E.coli* tüvest M15 ja tüvest PRC külvati 2ml 2x YT-sse (Amp 100 $\mu\text{g/ml}$) ja inkubeeriti üleöö +37°C. Üleöökuultuur külvati edasi 100ml 2x YT-sse (Amp 100 $\mu\text{g/ml}$). Proovid jagati pooleks ja poolel indutseeriti valgusüntees OD₆₀₀~0,2 juures IPTG-ga lõppkontsentratsioonis 1mM. Inkubeeriti +37°C juures 2h, misjärel koguti rakud tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugiga 13000 rpm 5 min +4°C. Kogutud rakud resuspendeeriti 400 μl mQ vees. PAA-SDS geelile kandmiseks lisati 80 μl 5x proovipuhvrit ning enne geelile kandmist inkubeeriti proov 96°C juures. 10 μl proovi kanti 10% PAA-SDS geelile, proovide kontsentreerimiseks kasutati 5% kontsentreerivat geeli. Valgud lahutati elektroforeesi teel 2h 100V juures 1X SDS foreesi puhvis. Markerina kasutai Naxo Protein Ladder-it. Valgud visualiseeriti Coomassie Blue värviga.

2.4.6. Rakkude kasvatamine ja indutseerimine

E.coli M15 tüve kompetentsed rakud transformeeriti 10ng plasmiidiga. Plasmidi sisaldavad rakud selekteeritiampitsilliini(Amp100 $\mu\text{g/ml}$) sisaldaval LB tardsöötmele+37°C juures üleöö. Seejärel inokuleeriti 2ml 2x YT (Amp100 $\mu\text{g/ml}$) ühe kolooniaga ja inkubeeriti inokuleeritud söödet üleöö +37°C.2ml üleöökuultuuri külvati ümber 400ml-sse 2YT (Amp100 $\mu\text{g/ml}$) söötmesse. Inkubeeriti +37°C juures kuni tiheduseni OD₆₀₀ ~0,3. Sööde jagati kaheks ja poolel kultuurist indutseeriti valgusüntees, lisades kultuurile 1mM lõppkontsentratsiooniga IPTGning inkubeeriti 2h +37°C juures. Rakud koguti tsentrifuugimise teel 6 min 4000rpm tsentrifuugis Sorvall RC5B Plus, misjärel resuspendeeriti rakuksade 4ml-s 1x LP-s (60 mM KCl, 60 mM NH₄Cl, 50mM Tris HCl pH 8, 6mM MgOAc, 6mM β -merkaptotetanol, 16% sahharoos). Proovile lisati DNAas ja lüsotsüüm lõppkontsentratsioonidega vastavalt 25U/ml ja 2mg/ml. Rakkude lüüsimiseks kasutati Bertin Precellys 24 homogeniseerijat vastavalt tootja poolt ette nähtud protokollile 3X60 min. Rakukestad eemaldati tsentrifuugimise teel 13 000 rpm 15 min. Klaaritud rakulüsaat kanti uude reaktsioonituubi.

2.4.7. Ribosoomi subühikute lahutamine sahharoosgradiendis

Ribosoomi subühikute lahutamiseks sahharoosi gradiendis valati ultratsentrifuugi rootori SW28 tuubidesse 36ml 15%-40% sahharoosgradient 1x LLP-s (60 mM KCl, 60 mM NH₄Cl, 10mM Tris HCl pH 8, 12mM MgOAc, 6mM β -ME). Gradiendile kanti 1ml (40U A_{260}) materjali lõppkontsentratsioonis A_{260} =40U. Ultratsentrifuugimine rootoriga SW28 viidi läbi Beckman L90 K ultratsentrifuugis järgmistel tingimustel: 21000 rpm, 16:05 h, $\omega^2t =$

$3,2 \times 10^{11}$. Subühikute visualiseerimiseks kasutati isekirjutajat, peristaatilist pumpa ja läbivooluspektrofotomeetrit (LKB). Gradiendist koguti 30S, 50S ja 70S ribosomaalsed subühikud.

2.4.8 Ribosoomi subühikute sadestamine

Sahharoosigradiendi fraktsioonidest ribosomaalsete subühikute sadestamiseks lisati 2,5 mahtu 96%-list etanooli ja 200µl 4M NaOAc-i ning inkubeeriti -20°C juures üleöö. Ribosomaalsed subühikud sadestati tsentrifuugimise teel +4°C juures 4000 rpm 1h tsentrifuugis Hettich Rotina 420R. Peale fuugimist kallati etanool pealt ära ning kuivatati sade +37°C juures 10 minutit. Sade resuspendeeriti 400µl 1x rRNA puhastamise lahuses (0,1M NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS, 10mM TrisHCl pH 8). Suspensioon kanti edasi 2ml reaktsioonituubidesse.

2.4.9. Fenool-kloroformtöötlus

rRNA puhastamiseks ribosomaalsetest subühikutest lisati 1x RNA puhastamise lahuses suspendeeritud ribosoomidele võrdne maht fenooli pH 5,5 ning segati vortexil 4 min. Seejärel tsentrifuugiti toasoojas lauatsentrifuugis 13 000 rpm 3 min ning kanti vesifaas – uude 2ml tuubi. Fenoolfaasile – lisati 100µl mQ vett, segati vortexil 4 min ning tsentrifuugiti 13 000 rpm 3 min. Vesifaasid segati kokku. Fenooltöötlust korrati 3 korda.

Peale kolme töötlust fenooliga lisati vesifaasile fenoolist vabanemiseks võrdne maht kloroformi (AppliChem) ning segati 4 min vortexil. Seejärel tsentrifuugiti 13 000 rpm 3 min ning kanti tekkinud vesifaas uude reaktsioonituubi. RNA sadestati 2,5 mahu 96%-lise etanooli ning 70µl 3M NaAc-iga inkubeerides -20°C juures üleöö. rRNA tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (Heraeus Fresco) 13 000 rpm 25 min ning supernatant eemaldati. Sade kuivatati +37°C juures 10 min ja lahustati 70µl mQ vees. rRNA kontsentratsioon määrati Nanodropi-ga A_{260nm} .

2.4.10. Töötlus aluselise fosfataasi ja nukleaasiga

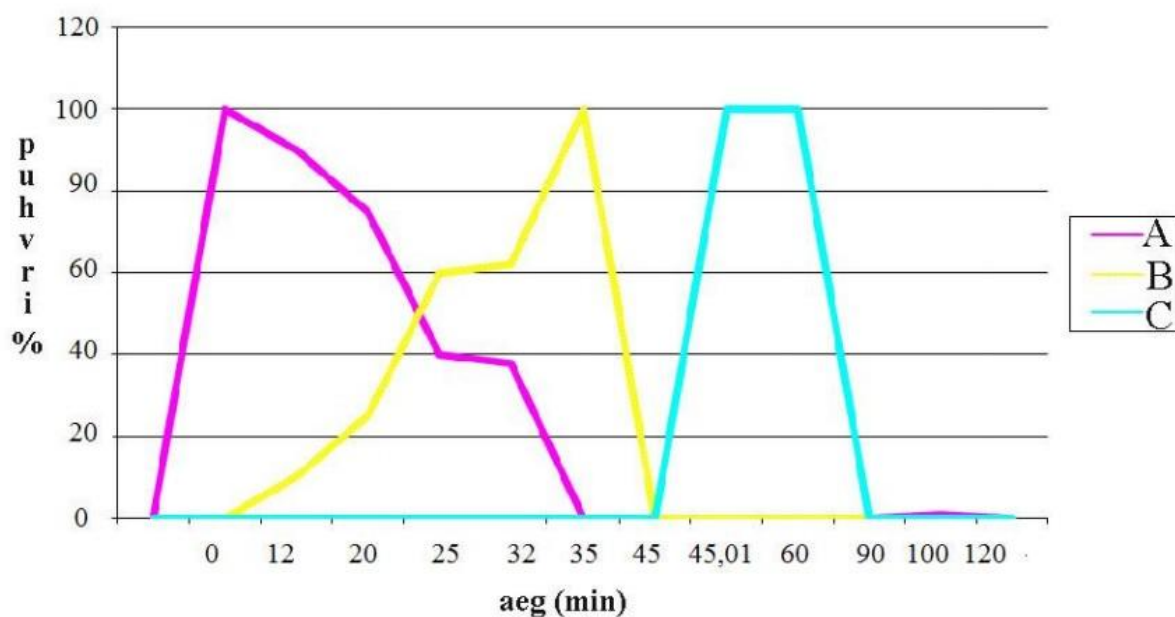
~2U rRNA-d kanti puhtasse 1,5ml reaktsioonituubi. Maht viidi mQ veega 80µl- ni. Lisati 10µl 10mM ZnSO₄ ja RNA lahust kuumutati rRNA denatureerimiseks 95°C 1 min. RNA nukleotiididevaheliste fosfodiester sidemete lagundamiseks lisati 10µl P1 nukleaasi (200U/mg) ning inkubeeriti +37°C juures üleöö. Seejärel lisati 1µl aluselist fosfataasi FastAP (Thermo Scientific), 12µl 10x tootja poolt ette nähtud puhvrit ning viidi mQ veega maht 100µl-ni. Inkubeeriti 3h +37°C juures.

Proovid filtreeriti enne HPLC-d. HPLC-l kasutati puhvreid A (0,01M NH₄H₂PO₄, 2,5% metanool), B (0,01M NH₄H₂PO₄, 20% metanool) ja C (0,01M NH₄H₂PO₄, 35% atsetonitriil).

Nukleosiidide määramiseks kasutati Shimadzu Prominence HPLC Supelcosil™ süsteemi, LC-18-S kolonni (25 x 4,6 mm, 5µm) ning 120 minutist nukleosiidide analüüsimise programmi (Joonis 6). HPLC analüüsi gradiendi tingimused olid vastavalt Gehrke ja Kuo (1989) poolt esitatud tingimustele. Nukleosiidide neelduvus mõõdeti lainepikkusel 260 ja 280 nm.

HPLC kromatogrammi (Lisa 1-2) piikide pindalade järgi arvutati välja modifitseeritud nukleotiidide hulk 16S rRNA ja 5S+23S rRNA kohta vastavalt valemile (Valem 1).

HPLC gradiendi tingimused



Joonis 6. HPLC tingimused. Programmi pikkus 120 min . Värvidega märgitud kasutatud puhvrid A, B ja C. Programm põhineb Gehrke ja Kuo (1989) artiklil ning pilt Ränder (2009).

$$\Psi (\text{arv}) = \frac{U (\text{arv}) \times \Psi (\text{mol})}{[\Psi (\text{mol}) + U (\text{mol})]}$$

$$\Psi (\text{mol}) = \Psi (\text{koefits}) \times \Psi \text{ pindala}$$

$$U (\text{mol}) = U (\text{koefits}) \times U \text{ pindala}$$

Valem 1. Valem summarse pseudouridiinide hulga määramiseks RNA ahelas. U (arv) on uridiinide arv vastavas ribosomaalses RNA-s, kust on välja arvatud kõik modifitseeritud uridiinid peale pseudouridiini. Ψ (mol) ja U (mol) on vastavalt pseudouridiini ja uridiini moolide arv. Ψ pindala ja U pindala on vastavalt

pseudouridiini ja uridiini piigi pindala HPLC kromatogrammis. Ψ (koefits) ja U (koefits) on pseudouridiini ja uridiini ekstinktsiooni koefitsiendid (määratud Christy Chow poolt).

2.4.11. *E.coli* tüve Q13 kasvatamine, indutseerimine ja MS2 bakteriofaagiga inokuleerimine

E.coli tüve Q13 keemiliselt kompetentseks muudetud rakke transformeeriti plasmidi pQE-60 ja RluMSD plasmiidiga. Külvati LB tassile (Amp 100 μ g/ml) ja inkubeeriti üleöö +37°C juures. Seejärel külvati üks koloonia 2ml 2x YT (Amp 100 μ g/ml) ning inkubeeriti +37°C juures üleöö. 1ml bakterikultuur külvati 100ml 2x YT (Amp 100 μ g/ml) ja inkubeeriti +37°C juures tiheduseni OD₆₀₀~0,1 ning seejärel indutseeriti valgusüntees IPTG-ga lõppkontsentratsioonis 1mM. 30 minutit hiljem inokuleeriti bakterikultuuri bakteriofaag MS2-ga ning inkubeeriti +37°C juures 2h. Lüüsunud rakud tsentrifugeeriti põhja SS34 rootoriga 11000 rpm juures 20 min jooksul. Supernatant tõsteti mõõtekolbi ning MS2 bakteriofaagi partiklite sadestamiseks lisati küllastavad koguses (52 g/100 ml) ammooniumsulfaati. Sool lahustati ning proov inkubeeriti +4°C juures üleöö. Üleöö külmas olnud proovid pandi ultratsentrifuugi sadenema 25000 rpm 1h. Sade lahustati 5 ml 1x LLP-s (1mM Mg).

2.4.12. Viiruspartiklite eraldamine sahharoosgradiendis

Viiruspartiklite eraldamiseks formeeriti ultratsentrifuugi rootori SW28 tuubidesse külmutamis-sulatamis meetodiga sahharoosigradiend 22% sahharoosist 1x LLP-s (1mM Mg). Gradiendile kanti 1ml proovi. Ultratsentrifuugimine SW28 rootoris viidi läbi 14:58 h jooksul 22900 rpm juures ($\omega^2t=3,1 \times 10^{11}$).

Subühikute visualiseerimiseks kasutati isekirjutajat, peristaatilist pumpa ja läbivooluspektrofotomeetrit ning gradiendist koguti 80S viiruspartiklid.

Partiklid sadestati 2,5 mahu 96% etanooli ja 100 μ l 4M NaOAc-ga inkubeerides -20°C üleöö.

rRNA puhastati fenool-kloroform töötusega, töödeldi P1 nukleaasi ja aluselise fosfataasiga nagu kirjeldatud eelnevalt. Proovid filtreeriti ja nukleosiidide määramiseks kasutati Shimadzu Prominence HPLC SupelcosilTM süsteemi, LC-18-S kolonni (25 x 4,6 mm, 5 μ m). Kasutatud programm joonisel 6. HPLC kromatogrammi (Lisa 1-2) piikide pindalade järgi arvutati välja pseudouridiinide hulk bakteriofaagi RNA kohta vastavalt valemile (Valem 1).

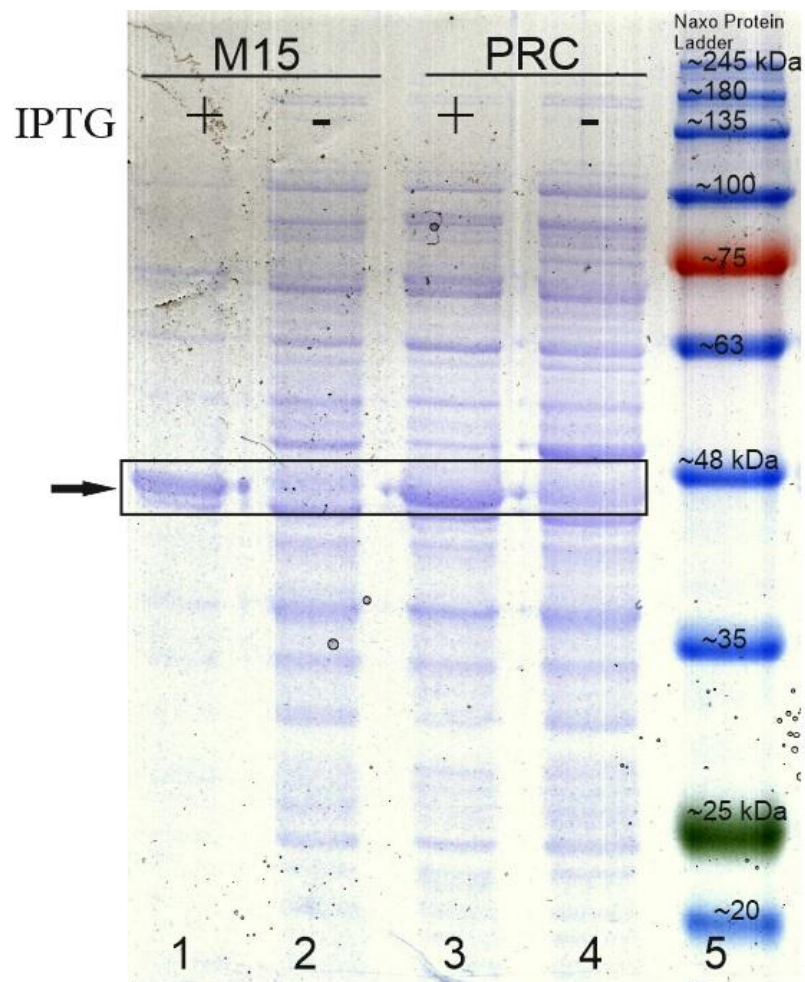
3 Tulemused ja arutelu

3.1.1. Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD konstrueerimine ja kloneerimine

Käesoleva töö raames konstrueeriti kimäärne pseudouridiini süntaas RluMSD, mille N-terminaalses otsas asub MS2 bakteriofaagi kattevalk ja C-terminaalses RluD katalüütiline domään. Sarnaselt metsiktüüp RluD-ga ühendab ka konstrueeritud RluMSD valgu N- ja C-terminaalseid domääne omavahel kolmest glutamaadist koosnev linker. Kimäärse RluMSD valgu geen kloneeriti IPTG-ga indutseeritava lac promootori alla ekspressioonivektorisse pQE-60 (Qiagen). Erinevate valgu geenide ühendamiseks ja ekspressioonivektorisse kloneerimiseks kasutati mitmeetapilist kloneerimise strateegiat nagu kirjeldatud meetodites. Kloneeritud ekspressioonivektori RluMSD pQE-60 esmaseks kontrollimiseks kasutati koloonia PCR-i meetodit nagu kirjeldatud meetodite osas. Koloonia PCR-i positiivsed plasmiidid puhastati *E.coli* rakkudest välja ning plasmidi intaktsust kontrolliti restriksioonanalüüsil ja kimäärse RluMSD geeni järjestust sekveneerimisega (tulemused ei ole näidatud).

Valguekspressiooni RluMSD pQE-60 plasmiidilt kontrolliti *E.coli* tüvedes M15 ja PRC (Joonis 7). PAA-SDS geelis on selgelt näha, et IPTG lisamisel toimub valgu, mille molekulmass jääb vahemikku 35kDa ja 48kDa, üleekspressioon (Joonis 7, rajad 1, 3), mida ei ole märgata IPTG-ga mitteindutseeritud bakterikultuuri puhul (Joonis 7, rajad 2 ja 4). Konstrueeritud kimäärse valgu RluMSD arvutuslik molekulmass on 43,78 kDa, seega ekspresseerub mõlemas (M15 ja PRC) bakteritüves efektiivselt pQE-60 plasmidi kloneeritud kimäärne RluMSD valk.

Võrreldes kõiki valgu bände PAA-SDS geelis (Joonis 7) selgub, et RluMSD spetsiifiline bänd on M15 tüves ülejäänud valkude bändidega võrreldes oluliselt tugevam (Joonis 7, rada 1 ja 3). Antud tulemusest saame järeldada, et IPTG indutseerib kimäärse RluMSD sünteesi oluliselt tugevamalt M15 tüves.



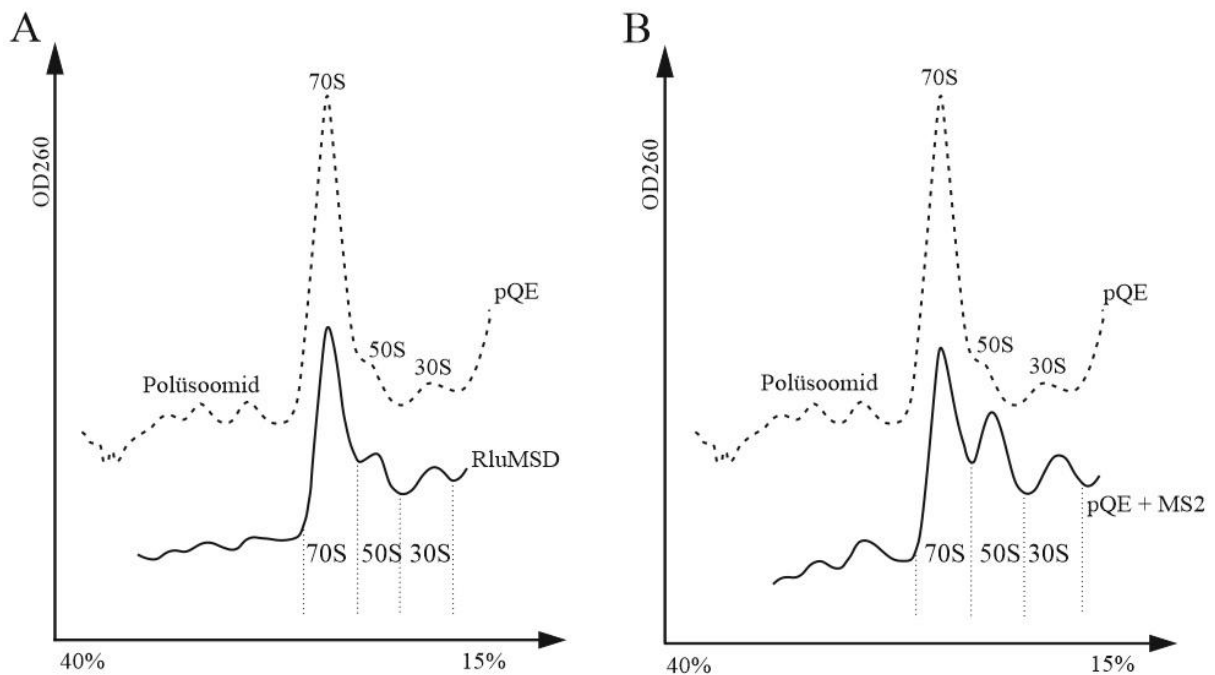
Joonis 7. Valgu RluMSD ekspressiooni kontroll 10%-lisel PAA-SDS geelil. Valguekspressiooni kontrolliti M15 (rajad 1 ja 2) ja PRC (rajad 2 ja 3) bakteritüvedes. Valgu suurusmarkerina kasutati Naxo Protein Ladder-it (rada 5) ja kontroll-alkude suurused on märgitud (kDa). 1. ja 3. real on näidatud rakulüsaadi alkude sisaldus, kui rakukultuur on indutseeritud IPTG-ga. 2. ja 4. real on kontrolliks indutseerimata rakukultuuri lüsaadid. Noolega on näidatud valk, mis ilmub rakkusesse peale lac promotori induksiooni. IPTG lisamisel toimub valgu, mille molekulmass on ~44 kDa, üleekspressioon (rajad 1 ja 3). RluMSD kalkuleeritud molekulmass on 43,74 kDa, seega ekspresseerub kimäärne RluMSD valk.

3.1.2. RluMSD ekspressioon mõjutab ribosoomi subühikute assotsiatsiooni

Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD ekspressioon plasmiidilt pQE-60indutseeriti *E.coli* tüves M15 IPTG lisamisega kaheks tunniks, kui $OD_{600}=0,3$. Peale kahte tundi induksiooni rakud lüüsiiti ning ribosoomide lahutamiseks ülejäänud raku tsütoplasma komponentidest ultratsentrifuugiti rakulüsaat läbi sahharoosi gradiendi ja ribosoomi gradiendiprofiil visualiseeriti nagu kirjeldatud meetodites. Jooniselt 8A on näha, et vabade 50S ja 30S ribosomaalsete subühikute hulk on 70S ribosoomide suhtes oluliselt tõusnudvõrreldes ribosoomide profiiliga M15 rakkudest, milles ei ekspresseeritud RluMSD valku. Vabade ribosomaalsete subühikute suurem hulk viitab defektidele ribosoomi subühikute omavahelises interakteerumises ehk assotsieerumises. Et kontrollida, kas subühikute assotsiatsiooni defekt

on põhjustatud konstrueeritud kimäärsest pseudouridiini süntaasi RluMSD katalüütilisest aktiivsusest või MS2 kattevalgu ekspressioonist bakteri rakkudes, ekspresseeriti kontrollikssamadel tingimustel M15 bakteritüves ka pQE-60 plasmidi kloonitud MS2 kattevalku. MS2 bakteriofaagi kattevalgu ekspressioon põhjustab ribosoomiprofiilides suurema vabade subühikute ülehulga, kui kimäärne RluMSD valk (Joonis 8B).

Tulemused viitavad, et ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni vähenemise põhjustab MS2 kattevalgu ekspressioon bakterirakkudes, mitte pseudouridiinide sünteesimine rRNA ebaspetsiifilistesse kohtadesse. Varasemalt on teada, et MS2 bakteriofaagi viirusepartiklitesse pakitakse väikese efektiivsusega ka 16S rRNA-d. Seega MS2 bakteriofaagi kattevalk on võimeline seonduma 16S rRNA-ga (Pickett & Peabody 1993). See seletab miks pQE-60 plasmiidilt ekspresseeritud MS2 kattevalk põhjustab vabade subühikute ülehulga bakterirakkudes (Joonis 8B). Ilmselt takistab 30S subühikuga seondunud MS2 bakteriofaagi kattevalk viimase seondumist 50S subühikuga. Kimäärne RluMSD põhjustab ribosoomide subühikute assotsieerumisele tagasihoidlikuma defekti kui MS2 bakteriofaagi kattevalgu ekspressioon (Joonis 8). Võimalik, et RluD katalüütilise domääni liitmine MS2 kattevalgu külge vähendab MS2 kattevalgu 16S rRNA-ga seondumise efektiivsust. Samas ei ole analüüsitud MS2 kattevalgu ekspressiooni efektiivsust M15 rakkudes. Seega ei saa välistada, et suurem efekt vabade ribosomaalsete subühikute esinemises gradiendiprofiilis on tingitud MS2 kattevalgu kõrgemast ekspressioonitasemest bakterirakkudes.



Joonis 8. 15%-40% gradiendiprofiilid *E.coli* tüves M15. (A) RluMSD ekspressioon põhjustab vabade subühikute hulga suurenemist sahharoosi gradiendis võrrelduna kontroll gradiendiprofiilidega. Kontrollina kasutatud ainult pQE-60-ga transforeeritud M15 rakke (märgitud joonisel katkendliku joonena). (B) MS2 kattevalgu ekspressioon põhjustab samuti vabade subühikute hulga suurenemist sahharoosigradiendis. Gradiendiprofiilid viitavad, et ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni vähenemise põhjustab MS2 kattevalgu ekspressioon bakterirakkudes, mitte pseudouridiinide sünteesimine rRNA ebaspetsiifilistesse kohtadesse. Gradiendilt koguti RluMSD-ga proovi 30S, 50S ja 70S subühikud paneelilt A.

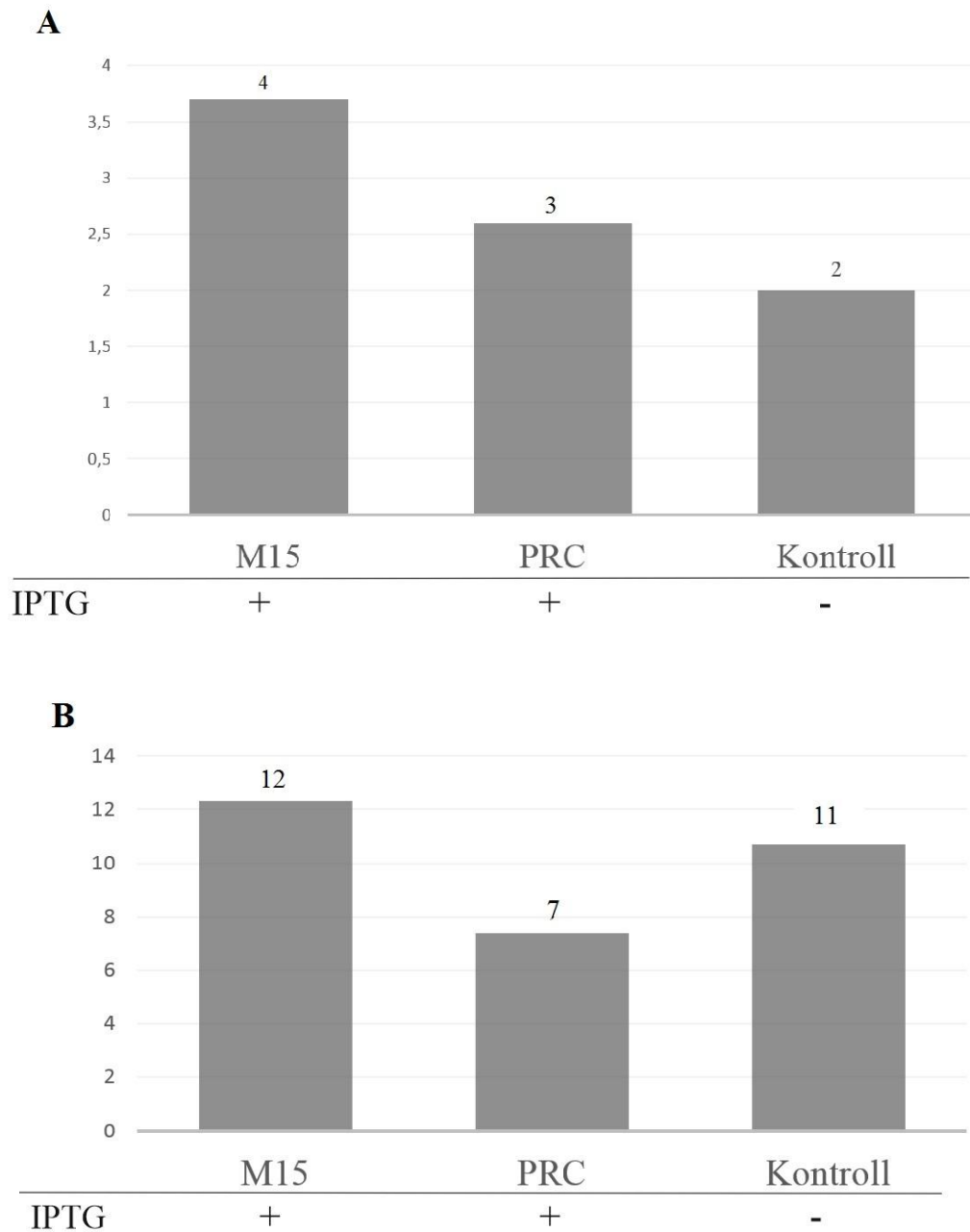
3.1.3. Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD mõju rRNA pseudouridiinidele

Sahharoosgradiendist kogutud 30S, 50S ja 70S ribosoomi subühikutest (Joonis 8A) eraldati ribosomaalne RNA fenool-kloroform töötusega vastavalt meetodikas kirjeldatud tingimustele. Kontrolliks puhastati rRNA ka metsiktüüpi *E.coli* tüvest MG1655 varem laborikaaslaste poolt puhastatud ribosomaalsetest subühikutest. rRNA nukleotiidide vahelised fosfodiester sidemed hüdrolyüsiti P1 nukleasiga ning aluselise fosfataasiga eemaldati fosfaatrühmad nagu kirjeldatud meetodites. Saadud rRNA nukleosiidid lahutati HPLC-ga nagu kirjeldatud meetodites. HPLC kromatogrammi (Lisa 1-2) piikide pindalade järgi arvutati välja pseudouridiinide hulk 16S rRNA ja 5S+23S rRNA kohta vastavalt valemile (Valem 1).

Kimäärne RluMSD valg modifitseerib M15 rakkudes pseudouridiiniks 1 - 2 uridiini nii väikese, kui suure ribosomaalse RNA-s (Joonis 9). Üllatuslikult sünteesitakse PRC rakkudes 16S rRNA-sse vähem pseudouridiine kui M15 rakkudes. Sellist tulemust seletab asjaolu, et kimäärse RluMSD ekspressioon PRC rakkudes oli oluliselt madalam kui M15 rakkudes.

Võimalik, et suurem RluMSD valgu hulk rakkudes põhjustab rRNA efektiivsemat modifitseerimist. Samas tuvastati kontroll 16S rRNA-s ühe pseudouridiini asemel kaks pseudouridiini (Joonis 9A). Selline erinevus võib olla põhjustatud mittetäielikust aluselise fosfataasi tööst, mis põhjustab ebaspetsiifiliste piikide tekkimise HPLC kromatogrammi algusesse, kus asub ka pseudouridiini piik. Samas võib olla põhjuseks ka vähene 23S rRNA või tRNA saastus analüüsitud proovides, mis võis tekkida ribosomaalsete partiklite kogumise käigus.

Ribosoomi suure subühiku RNA-dest leiti vastavalt 2 - 3 lisa pseudouridiini (Joonis 9B). Tuleb mainida, et PRC tüvest on deleteeritud kaks pseudouridiini süntaasi (RluC ja RluD), mis kumbki sünteesib kolm pseudouridiini. PRC rakkude 23S rRNA peaks seega sisaldama 6 pseudouridiini vähem kui 23S rRNA, mis on puhastatud M15 rakkudest, ehk siis vaid 4 Ψ-d. Antud katses tuvastati 7 pseudouridiini (Joonis 9B), mis tähendab seda, et kolm pseudouridiini on kimäärse RluMSD valgu poolt juurde sünteesitud. Tuleb märkida, et ribosoomi suure subühiku RNA puhul tuvastati PRC 25S+5S rRNA-des kaks pseudouridiini rohkem, kui M15 rRNA puhul (Joonis 9B). Sellist tulemust saaks seletada asjaoluga, et RluD katalüütiline osa on jätkuvalt spetsiifiline oma looduslike substraatide suhtes (23S rRNA positsioonid 1911, 1915 ja 1917) ja lisaks on modifitseeritud need positsioonid, kuid see väide vajab põhjalikumalt kontrolli. Eelnevast järeldub, et kimäärne pseudouridiini süntaas RluMSD on võimeline sünteesima vähesel määral pseudouridiini nii väikese kui ka suure ribosomaalse subühiku RNA-sse.



Joonis 9. Summaarne pseudouridiinide hulk 30S (paneelil A) ja 50S (paneelil B) subühikus. Märgitud ka vastavalt millised proovid on indutseeritud RluMSD valku ekspresseerima (IPTG+). PRC tüves 30S subühikus (paneel A) on 1 pseudouridiin rohkem kui kontrolltüves ning M15 tüves tekkinud 2 korda rohkem pseudouridiine. Metsiktüve 23S rRNA-s 10 pseudouridiini. Tüves M15 on võrreldes kontrolltüvega tekkinud 2 pseudouridiini rohkem (paneel B). Tüves PRC tavapäraselt 4 pseudouridiini, antud katses tekkinud teadmata põhjustel 3 pseudouridiini rohkem.

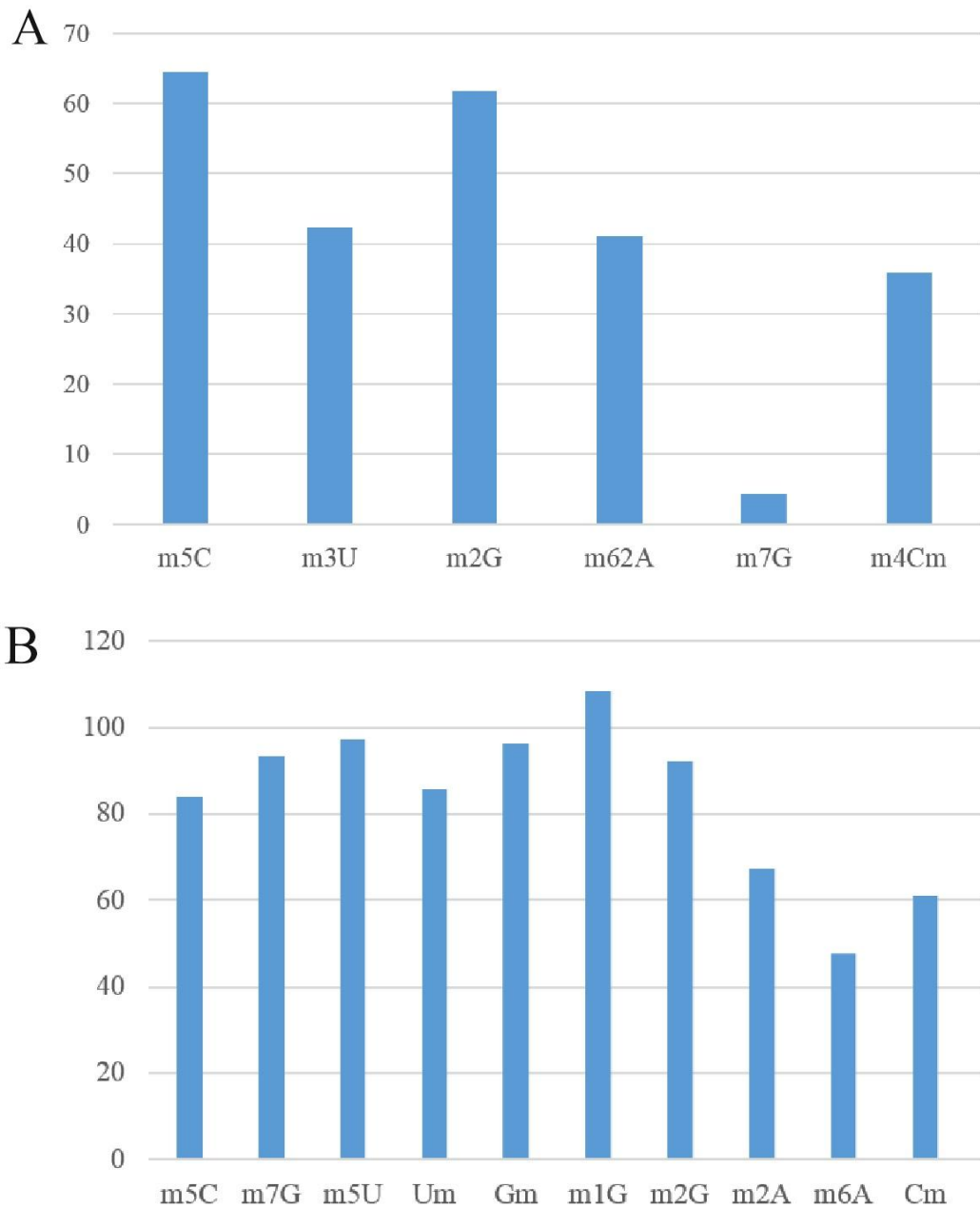
3.1.4. Kimäärse pseudouridiini süntaasi RluMSD mõju rRNA modifikatsioonidele

Eelnevas punktis analüüsitud proovide andmeid kasutati ka kõigi ülejäänud rRNA modifikatsioonide muustrit.

Joonisel 10A on graafikuna võrreldud M15 tüve 30S subühiku modifitseeritud nukleosiidide hulka MG1655 tüve 30S ribosomaalsetest subühikutest eraldatud modifitseeritud nukleosiidide hulga suhtes (protsentides). Modifikatsioonid m^3U , m^6_2A ja m^7G esineb vähem kui 50% võrreldes kontrolliga (Joonis 10A). Siibak ja Remme (2010) andmetel on modifikatsioonid m^3U ja m^6_2A puhul tegu ribosoomi assambleerumise hilises etapis tekkivate modifikatsioonidega. Seega võib m^3U ja m^6_2A modifikatsioonide vähesus 16S rRNA-s viidata 30S assambleerumise defektile.

Tuleb mainida, et 16S rRNA proovis esines modifikatsioon (m^5C) (Joonis 10A), mida looduslikult 16S rRNA-s ei esine. m^5C on 23S rRNA spetsiifiline modifikatsioon, mis viitab 23S rRNA saastusele 16S rRNA proovides. 23S rRNA saastus seletaks hästi ka suurenenud hulga pseudouridiinide esinemise kontroll 16S rRNA proovis (joonis 9A).

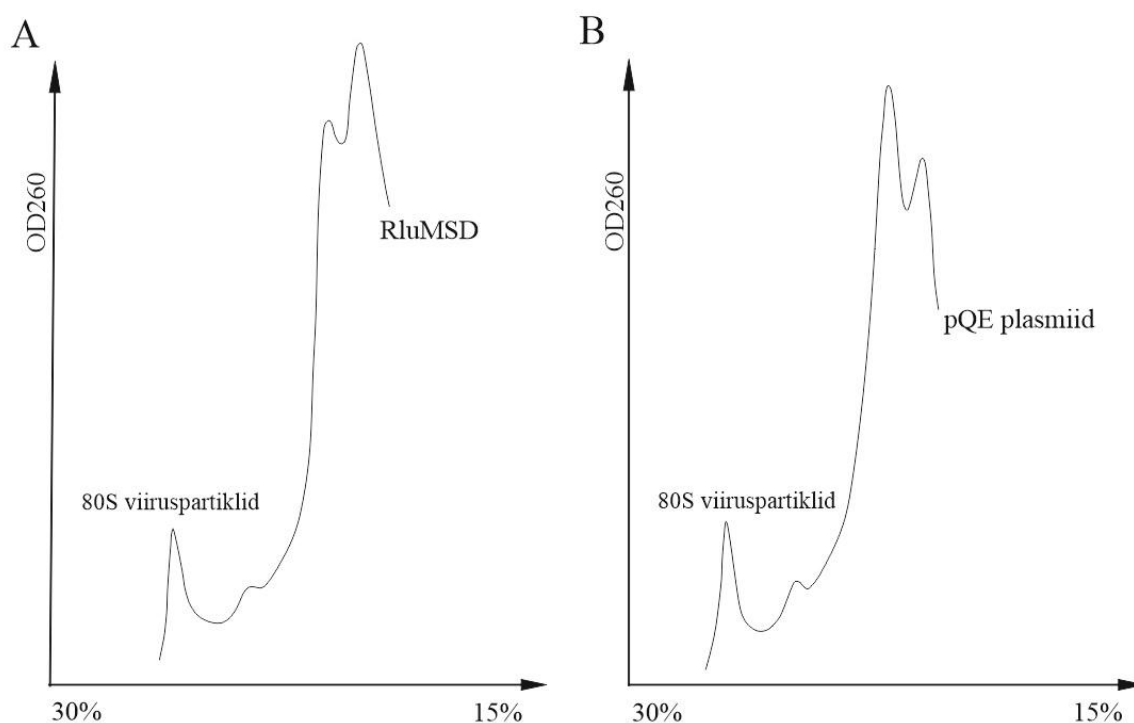
Joonisel 10B on M15 tüve 50S subühiku modifitseeritud nukleosiidide hulka võrreldud metsiktüve ehk MG1655 50S subühiku modifitseeritud nukleosiidide hulgaga (protsentides). 23S rRNA puhul on kõiki modifikatsioone üle 60% (Joonis 10B), väljaarvatud varajasel ribosoomi assambleerumise etapil tekkivat modifikatsiooni m^6A . Kuna hiliseid modifikatsioone on kõik sünteesitud, ei ole alust arvata, et 50S subühiku assambleerumine pole mõjutatud RluMSD valguga.



Joonis 10. M15 tüve modifitseeritud nukleosiidide hulka võrreldud MG1655 tüve ribosomaalsetest subühikutest eraldatud modifitseeritud nukleosiidide hulga suhtes protsentides. Paneelil A 30S subühiku modifikatsioonid. Nukleosiidid m³U, m²G ja m⁶₂A, mida modifitseeritakse <50% ulatuses võrreldes metsiktüübiga, isomeriseeritakse ribosoomi hilises assambleerumise etapis 16S rRNA-sse (paneel A), mis võib viitada ribosoomi assambleerumise defektile. Paneelil B suure subühiku modifikatsioonid. Enamus modifikatsioone, mida on võrrelduna kontroll rRNA-ga, on varase assembly modifikatsioonid. Katset on korratud kaks korda.

3.1.5. RluMSD modifitseerib MS2 bakteriofaagi RNA-d

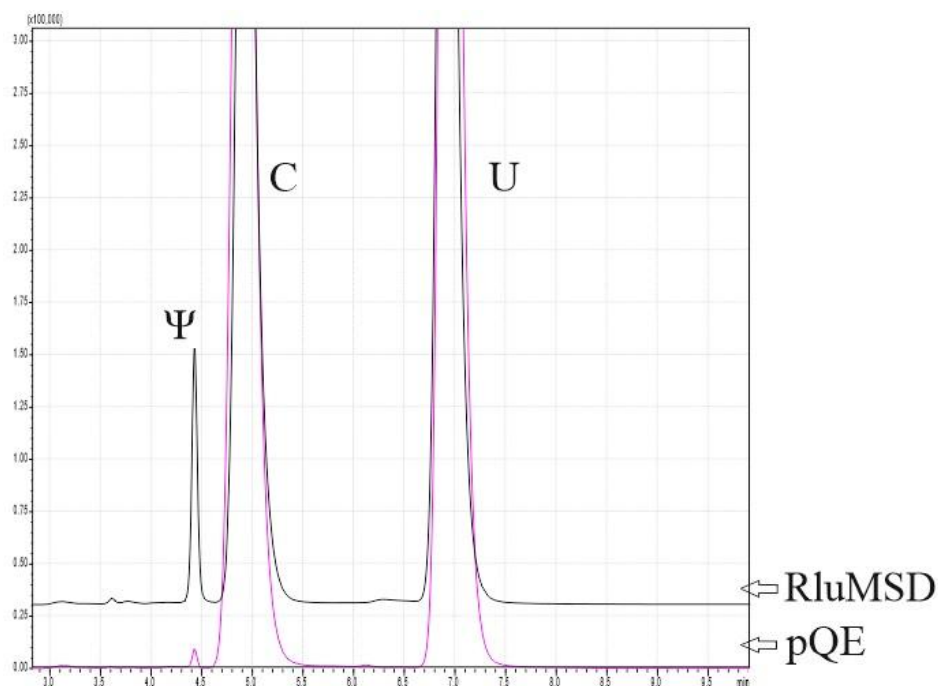
MS2 bakteriofaagiga nakatati E.coli Q13 tüve rakke, viirust paljundati ja MS2 bakteriofaagi partiklid lahutati ultratsentrifuugimise käigus muudest molekulidest nagu kirjeldatud meetodites. Q13 rakke kasutati, sest MS2 bakteriofaagi võime nakatada ja lüüsida E.coli tüve Q13 on hästi teada. Selleks, et efektiivsemalt lahutada viiruspartiklid bakteri ribosoomidest, kasutati ultratsentrifuugides sahharoosgradiendi, mis sisaldas LLP-puhvritmagneesiumi lõppkontsentratsiooniga 1mM. Sellistel tingimustel ei teki bakteri 70S ribosoomi. Viiruspartiklid sedimenteeruvad 80S ning keskkonnas, mis sisaldab 1mM Mg, 70S ribosoom dissotseerub ning on võimalik eraldada puhtad 80S viiruspartiklid (Joonis 11).



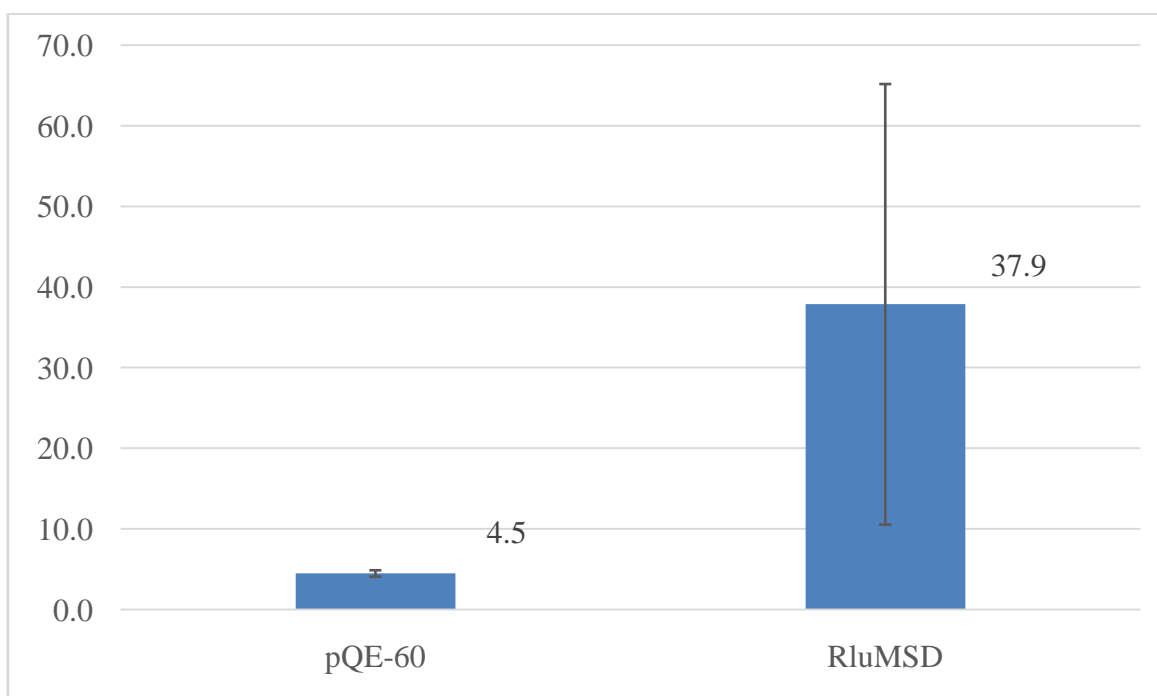
Joonis 11. 22% külmutus-sulatusgradiendi profiil Q13 tüves. Bakterirakud on nakatatud MS2 bakteriofaagiga, mis põhjustab rakkude lüüsi ja viiruspartiklite vabanemise söötmesse. Gradiendis on lahutatud bakterisöötimest ammoniumsulfaadiga sadestatud materjal, mis sisaldab MS2 bakteriofaagi partikleid. Paneelil A Q13 bakterikultuuri, milles ekspresseeritakse kimäärset RluMSD pseudouridiini süntaasi. Paneelil B on Q13 rakud transformeeritud tühja pQE-60 plasmiidiga ehk kontroll. Gradiendist korjati märgitud 80S viiruspartiklid.

Viiruspartiklitest puhastati RNA ja nukleosiidid lahutati HPLC-ga nagu kirjeldatud meetodites. Kontrolliks kasutati MS2 viiruse RNA-d, mis oli puhastatud ainult tühja pQE-60 plasmiidiga transformeeritud Q13 rakkude nakatamisest MS2 bakteriofaagiga saadud partiklitest (Joonis 11B).

Tulemused näitavad et RluMSD on võimeline modifitseerima MS2 bakteriofaagi RNA-d (Joonis 12). Seega MS2 kattevalk muudab MS2 faagi RNA RluD katalüütilisele domäänile substraadiks. Kontrollproovis detekteeriti 4 pseudouridiini (Joonis 13). Teadaoleval pole MS2 bakteriofaagi RNA-s pseudouridiine. On teada, et MS2 bakteriofaag pakib viiruspartiklisse vähese efektiivsusega 16S rRNA-d (Pickett & Peabody 1993) ning seega võib spekuloida, et kontrollproovis detekteeritud pseudouridiinid tulenevad ebaspetsiifiliselt viiruspartiklitesse pakitud RNA-st. MS2 bakteriofaagi HPLC kromatogrammi järgi ei sisalda MS2 bakteriofaagi RNA ribosomaalse RNA spetsiifilisi modifikatsioone (Lisa 4). Sellest lähtuvalt on alust arvata, et proovides pole tegu ribosomaalse RNA saastusega. Seega me ei saa välistada, et ka looduslikult modifitseeritakse MS2 RNA-d. Meie tulemuste põhjal võib väita, et MS2 bakteriofaagi kattevalgu lisamine RluD katalüütilise domääni N-terminaalsesse otsa võimaldab RluMSD valgul katalüüsida pseudouridiini sünteesi MS2 bakteriofaagi RNA-sse. Meie labori varasemad andmed näitavad, et RluCD (N-terminaalne RluC S4-sarnane domään ja RluD C-terminaalne katalüütiline domään) ei sünteesi pseudouridiine MS2 bakteriofaagi RNA-sse (Leppik ja Remme, avaldamata andmed). Eelnevast järeldub, et N-terminaalne domään mõjutab oluliselt RluD katalüütilise domääni substraadispetsiifikat.



Joonis 12. 80S viiruspartiklitest eraldatud rRNA nukleosiidide HPLC kromatogramm suurendatult pseudouridiini piigi juurest. RluMSD proovis pseudouridiine piik suur, seega MS2 kattevalk muudab MS2 faagi RNA RluD katalüütilisele domäänile substraadiks.



Joonis 13. Summaarne pseudouridiinide arv ainult pQE-60 plasmiidiga ehk kontroll (vasakul) ja RluMSD-ga pQE-60 plasmiidiga (paremal) transformeeritud Q13 rakkudes. RluMSD ekspressioon bakterirakkudes põhjustab MS2 bakteriofaagi RNA-sse keskmiselt 38 pseudouridiini sünteesi, millest võib järeldada, et MS2 kattevalk muudab bakteriofaagi MS2 RNA RluD jaoks substraadiks. Antud katset on korratud 2 korda.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärk oli konstrueerida kontrollsüsteem pseudouridiini süntaasi RluD N-terminaalse domääni substraadi spetsiifilisuse uurimiseks. Selleks kloneriti RluD C-terminaalse katalüütilise domääni külge MS2 kattevalk, mis tunneb ära spetsiifilise heeliksi-lingu bakteriofaag MS2 RNA-s. Seega uuriti kas MS2 kattevalgu lisamine RluD katalüütilise domääni külge muudab bakteriofaagi MS2 RNA RluD katalüütilise domääni jaoks substraadiks. Kimäärse RluMSD valgu spetsiifilisust testiti nii ribosomaalse RNA kui ka bakteriofaag MS2 RNA suhtes *in vivo*.

Käesoleva töö põhilised tulemused olid järgmised:

- Kimäärne pseudouridiini süntaas RluMSD põhjustab ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni defekte
- RluMSD on rRNA-de suhtes väheaktiivne modifitseerides vaid kuni 3 uridiini pseudouridiiniks
- RluMSD omab märkimisväärset aktiivsust MS2 bakteriofaagi RNA suhtes, modifitseerides olulisel määral uridiine selles RNA-s.

Construction and characterization of chimeric pseudouridine synthase containing MS2 coat protein and RluD catalytic domain

Summary

Pseudouridine is the most abundant modification in RNA. Modifications in rRNA are found in functionally important positions and are highly conserved. Uridines in 23S rRNA stem-loop 69 are isomerized to pseudouridines by pseudouridine synthase RluD. RluD is very specific *in vivo*, but loses some of its specificity *in vitro*.

Formerly it was known that chimeric pseudouridine synthase C4DK (pseudouridine synthase RluDs' catalytic domain and RluCs' N-terminal domain) modifies more pseudouridines in rRNA than the wild-type RluD, which could imply that the N-terminal domain alters RluDs' substrate specificity.

The aim of the thesis was to construct and characterize chimeric pseudouridine synthase RluMSD, which consisted of C-terminal RluDs' catalytic domain connected with N-terminal bacteriophage MS2s' coat protein, to examine if the addition of MS2 coat protein to RluD catalytic domain would alter RluDs' specificity and turn bacteriophage MS2's RNA into substrate of the RluDs' catalytic domain. Chimeric RluMSDs' specificity was tested on both rRNA and MS2s' RNA.

Main results of current thesis are:

- Chimeric pseudouridine synthase RluMSD affects association defects of ribosomal subunits
- RluMSD synthesizes up to three pseudouridines into 16S and 23S rRNA
- RluMSD isomerizes several uridines to pseudouridines in MS2 bacteriophage RNA. Meaning that MS2 coat protein attached to N-terminus of the RluD catalytic domain causes specificity change toward the MS2 RNA

Tänuõnad

Autor tänab juhendajat Margus Leppikut ja TÜMRI molekulaarbioloogia õppetooli juhatajat Jaanus Remmet sisuka juhendamise, väärtuslike nõuannete ja kannatlikkuse eest. Tänamata ei jää ka TÜMRI molekulaarbioloogia ja üldise mikroobibiokeemia meeldiv seltskond.

Viited:

1. Andersen T.E., Porse B.T. & Kirpekar F. (2004). A novel partial modification at C2501 in Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *Rna*, 10, 907-13.
2. Anton S. Petrov C.R.B., Eli Hershkovits, Yuzhen Xue, Chris C. Waterbury, Chiaolong Hsiao, Victor G. Stepanov, Eric A. Gaucher, Martha A. Grover, Stephen C. Harvey, Nicholas V. Hud, Roger M. Wartell, George E. Fox, Loren Dean Williams (2013). *Nucleic Acids Research*, 2013, 1–14 doi:10.1093/nar/gkt513.
3. Arluison V., Hountondji C., Robert B. & Grosjean H. (1998). Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry*, 37, 7268-76.
4. Campo J.O.M.d. (2004). Modified Nucleoside of E.Coli Ribosomal RNA. In *Curtiss R, III, Kaper JB, Squires CL, Karp PD, Neidhardt FC, Slauch JM (ed.), EcoSal.ASM Press, Washington, DC.*
5. Carter A.P., Clemons W.M., Jr., Brodersen D.E., Morgan-Warren R.J., Hartsch T., Wimberly B.T. & Ramakrishnan V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science*, 291, 498-501.
6. Cate J.A.D.J.H.D. (2012). An introduction to the structure and function of the ribosome. *EcoSal Plus 2013; doi:10.1128/ecosal.2.5.2.*
7. Clemons W.M., Jr., May J.L., Wimberly B.T., McCutcheon J.P., Capel M.S. & Ramakrishnan V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, 400, 833-40.
8. Cooper G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, ISBN-10: 0-87893-106-6.*
9. Davis D.R. (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research*, 23, 5020-6.
10. Del Campo M., Kaya Y. & Ofengand J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *Rna*, 7, 1603-15.
11. Del Campo M., Ofengand J. & Malhotra A. (2004). Crystal structure of the catalytic domain of RluD, the only rRNA pseudouridine synthase required for normal growth of *Escherichia coli*. *Rna*, 10, 231-9.
12. Ericsson U.B., Nordlund P. & Hallberg B.M. (2004). X-ray structure of tRNA pseudouridine synthase TruD reveals an inserted domain with a novel fold. *FEBS letters*, 565, 59-64.

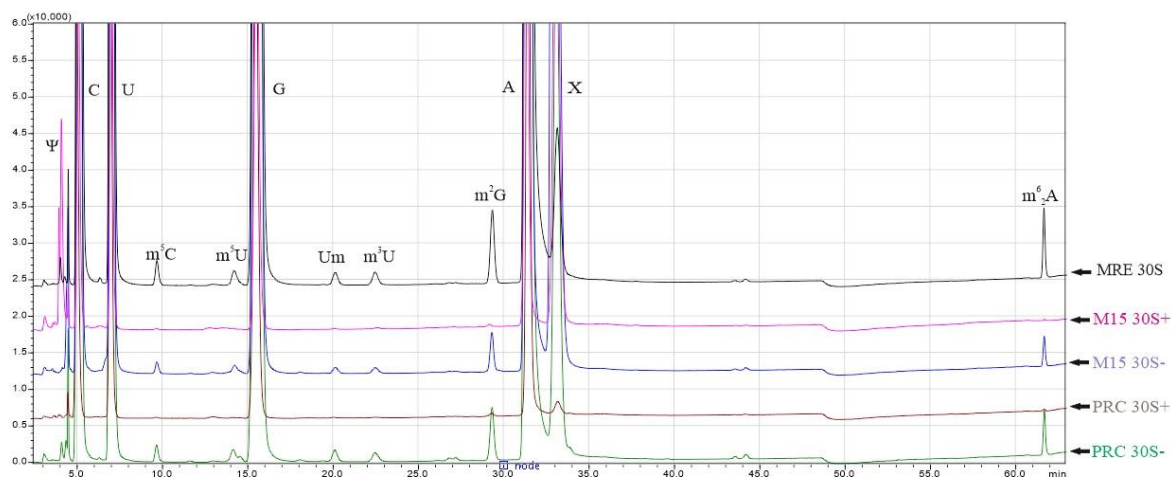
13. Foster P.G., Huang L., Santi D.V. & Stroud R.M. (2000). The structural basis for tRNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I. *Nature structural biology*, 7, 23-7.
14. Frank J. & Agrawal R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, 406, 318-22.
15. Gu X., Yu M., Ivanetich K.M. & Santi D.V. (1998). Molecular recognition of tRNA by tRNA pseudouridine 55 synthase. *Biochemistry*, 37, 339-43.
16. Hamma T. & Ferre-D'Amare A.R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & biology*, 13, 1125-35.
17. Havelund J.F., Giessing A.M., Hansen T., Rasmussen A., Scott L.G. & Kirpekar F. (2011). Identification of 5-hydroxycytidine at position 2501 concludes characterization of modified nucleotides in E. coli 23S rRNA. *Journal of molecular biology*, 411, 529-36.
18. Hirabayashi N., Sato N.S. & Suzuki T. (2006). Conserved loop sequence of helix 69 in Escherichia coli 23 S rRNA is involved in A-site tRNA binding and translational fidelity. *The Journal of biological chemistry*, 281, 17203-11.
19. Hoang C., Chen J., Vizthum C.A., Kandel J.M., Hamilton C.S., Mueller E.G. & Ferre-D'Amare A.R. (2006). Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure. *Molecular cell*, 24, 535-45.
20. Huang L., Ku J., Pookanjanatavip M., Gu X., Wang D., Greene P.J. & Santi D.V. (1998). Identification of two Escherichia coli pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry*, 37, 15951-7.
21. Hur S., Stroud R.M. & Finer-Moore J. (2006). Substrate recognition by RNA 5-methyluridine methyltransferases and pseudouridine synthases: a structural perspective. *The Journal of biological chemistry*, 281, 38969-73.
22. Johansson M., Jeong K.W., Trobro S., Strazewski P., Aqvist J., Pavlov M.Y. & Ehrenberg M. (2011). pH-sensitivity of the ribosomal peptidyl transfer reaction dependent on the identity of the A-site aminoacyl-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 79-84.
23. Kaczanowska M. & Ryden-Aulin M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71, 477-94.
24. Kaya Y. & Ofengand J. (2003). A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *Rna*, 9, 711-21.

25. King T.C., Sirdeshmukh R. & Schlessinger D. (1984). RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 185-8.
26. Koonin E.V. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic acids research*, 24, 2411-5.
27. Leppik M. (2013). Substrate specificity of the multisite specific pseudouridine synthase RluD. In: *Institute of Molecular and Cell Biology, Faculty of Science and Technology, University of Tartu, Estonia*.
28. Leppik M., Peil L., Kipper K., Liiv A. & Remme J. (2007). Substrate specificity of the pseudouridine synthase RluD in Escherichia coli. *The FEBS journal*, 274, 5759-66.
29. Liiv A. & O'Connor M. (2006). Mutations in the intersubunit bridge regions of 23 S rRNA. *The Journal of biological chemistry*, 281, 29850-62.
30. Mizutani K., Machida Y., Unzai S., Park S.Y. & Tame J.R. (2004). Crystal structures of the catalytic domains of pseudouridine synthases RluC and RluD from Escherichia coli. *Biochemistry*, 43, 4454-63.
31. Moore P.B. & Steitz T.A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annual review of biochemistry*, 72, 813-50.
32. O'Connor M. & Gregory S.T. (2011). Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type Escherichia coli and Salmonella enterica. *Journal of bacteriology*, 193, 154-62.
33. Ofengand J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS letters*, 514, 17-25.
34. Petry S., Weixlbaumer A. & Ramakrishnan V. (2008). The termination of translation. *Current opinion in structural biology*, 18, 70-7.
35. Pickett G.G. & Peabody D.S. (1993). Encapsidation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein. *Nucleic acids research*, 21, 4621-6.
36. Picking W.D., Odom O.W. & Hardesty B. (1992). Evidence for RNA in the peptidyl transferase center of Escherichia coli ribosomes as indicated by fluorescence. *Biochemistry*, 31, 12565-70.
37. Polacek N. & Mankin A.S. (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40, 285-311.

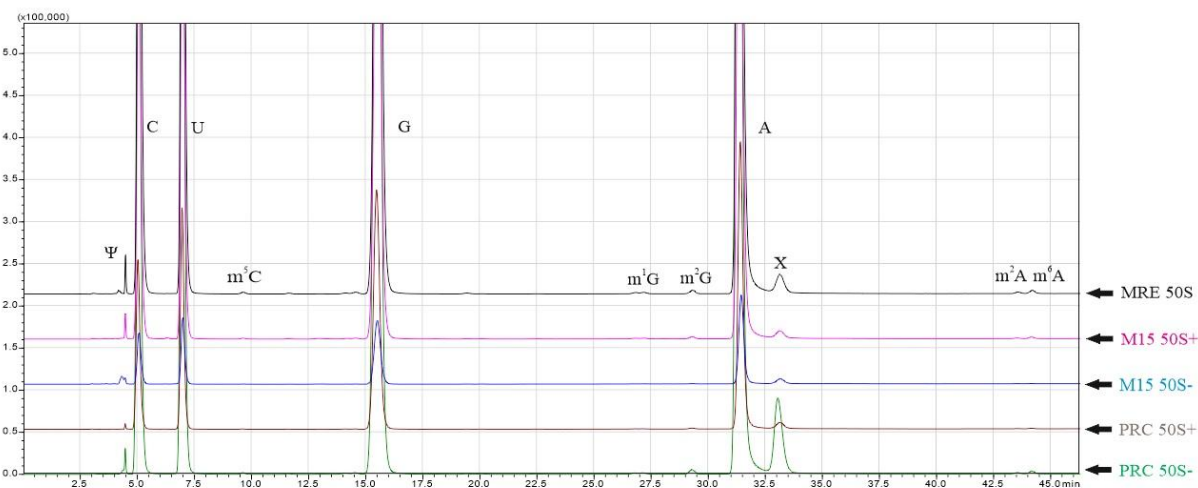
38. Raychaudhuri S., Conrad J., Hall B.G. & Ofengand J. (1998). A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *Rna*, 4, 1407-17.
39. Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M. & Cate J.H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310, 827-34.
40. Schwartz S., Bernstein D.A., Mumbach M.R., Jovanovic M., Herbst R.H., Leon-Ricardo B.X., Engreitz J.M., Guttman M., Satija R., Lander E.S., Fink G. & Regev A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 159, 148-62.
41. Shine J. & Dalgarno L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 1342-6.
42. Siibak T. & Remme J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *Rna*, 16, 2023-32.
43. Sivaraman J., Sauve V., Larocque R., Stura E.A., Schrag J.D., Cygler M. & Matte A. (2002). Structure of the 16S rRNA pseudouridine synthase RsuA bound to uracil and UMP. *Nature structural biology*, 9, 353-8.
44. Stagg S.M., Mears J.A. & Harvey S.C. (2003). A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 328, 49-61.
45. Steitz T.A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 242-53.
46. Vaidyanathan P.P., Deutscher M.P. & Malhotra A. (2007). RluD, a highly conserved pseudouridine synthase, modifies 50S subunits more specifically and efficiently than free 23S rRNA. *Rna*, 13, 1868-76.
47. Williamson J.R. (2003). After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *Rna*, 9, 165-7.
48. Wilson D.N. & Nierhaus K.H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40, 243-67.
49. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M., Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vornrhein C., Hartsch T. & Ramakrishnan V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407, 327-39.

50. Wrzesinski J., Bakin A., Ofengand J. & Lane B.G. (2000). Isolation and properties of Escherichia coli 23S-RNA pseudouridine 1911, 1915, 1917 synthase (RluD). *IUBMB life*, 50, 33-7.
51. Wrzesinski J., Nurse K., Bakin A., Lane B.G. & Ofengand J. (1995). A dual-specificity pseudouridine synthase: an Escherichia coli synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *Rna*, 1, 437-48.
52. Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H. & Noller H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292, 883-96.

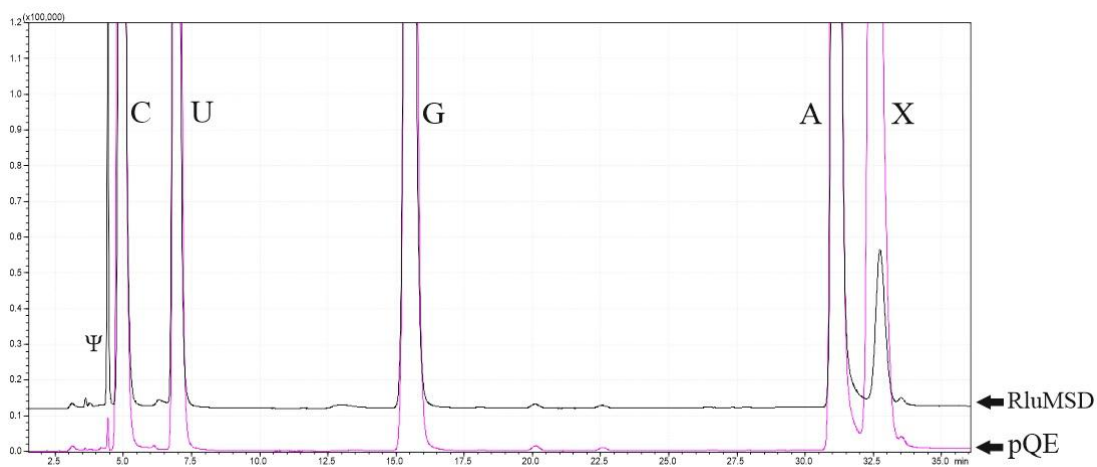
Lisad



Lisa 1. *E.coli* tüvede M15 ja PRC ning kontrolltüve (MRE-600) 30S subühiku modifikatsioonide HPLC kromatogramm indutseeritud (30S+) ja indutseerimata (30S-) proovidest.



Lisa 2. *E.coli* tüvede M15 ja PRC ning kontrolltüve (MRE-600) 50S subühiku modifikatsioonide HPLC kromatogramm indutseeritud (50S+) ja indutseerimata (50S-) proovidest.



Lisa 3. MS2-ga inokuleeritud *E.coli* tüve Q13HPLC kromatogrammplasmiidiga pQE ja RluMSD kimääriga.

Lihtlitsents

Mina _____ Birgit Marjak _____

(sünnikuupäev: _____ 28.07.1993 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
_____ Bakteriofaagi MS2 kattevalgu ja pseudouridiini süntaasi RluD
hübriidvalgu konstrueerimine ja iseloomustamine _____,

mille juhendaja on _____ Margus Leppik _____,

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 alates **01.09.2016**kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, _____ 25.05.2015 _____ (kuupäev)