

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**23S rRNA modifikatsioonide osa ribosoomide struktuuri stabiliseerimisel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Andres Reintam

Juhendaja PhD Aivar Liiv

TARTU 2025

## INFOLEHT

### **23S rRNA modifikatsioonide osa ribosoomide struktuuri stabiliseerimisel**

**Lühikokkuvõte:** Ribosoomid teostavad valgusünteesi ning nende rRNA modifikatsioonid on olulised ribosoomi korrektseks talitluseks ja struktuuriks. Käesolev töö keskendub 23S rRNA modifikatsioonide rollile 50S alaühiku struktuurses stabiliseerimises. Eesmärgiks oli luua *in vitro* testsüsteem, et hinnata 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide mõju peptidüültransferaasele aktiivsusele. Selleks analüüsiti metsiktüüpi ja modifikatsioonideta *E. coli* tüvedest (kus modifitseerivate ensüümide geenid olid inaktiveeritud) eraldatud 50S alaühikute stabiilsust ning aktiivsust. Tulemused näitasid, et 23S rRNA modifikatsioonid on kriitilised 50S alaühiku termostabiilsuse ja funktsionaalsuse säilitamiseks. Modifikatsioonide puudumine muutis ribosoomid temperatuuritundlikumaks, viidates nende panusele ribosoomi struktuuri kaitsmisel.

**Märksõnad:** bakteriaalne ribosoom, 23S rRNA, rRNA modifikatsioonid

**CERCS teaduseriala:** P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

### **The part of 23S rRNA modifications in the stabilization of ribosome structure**

**Abstract:** Ribosomes perform protein synthesis, and their rRNA modifications are important for ribosome function and structure. This work investigates the role of 23S rRNA modifications in the structural stabilization of the bacterial 50S subunit. An *in vitro* test system was developed to assess the impact of 23S rRNA V domain modifications on peptidyl transferase activity. Stability and activity of 50S subunits from wild-type *E. coli* and strains deficient in these modifications (with inactivated modifying enzyme genes) were analyzed. Results demonstrated that 23S rRNA modifications are critical for maintaining 50S subunit thermostability and functionality. Their absence rendered ribosomes more temperature-sensitive, indicating these modifications contribute to ribosome structural protection.

**Keywords:** bacterial ribosome, 23S rRNA, rRNA modifications

**CERCS research specialization:** P320 Nucleic acids, protein synthesis

# Sisukord

Sisukord .....	3
Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus .....	7
Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1. Ribosoom .....	8
1.2. Prokarüootse ribosoomi struktuur .....	11
1.3 Translatsioon.....	14
1.4 Ribosoomi RNA modifikatsioonid .....	16
2. Eksperimentaalosa.....	22
2.1. Töös kasutatud materjalid .....	23
2.1.1. Töös kasutatud söötmed, puhvrid ja lahused.....	23
2.1.2. Töös kasutatud tüved.....	23
2.2. Metoodika.....	24
2.2.1 70S ribosoomide ja alaühikute eraldamine .....	24
2.2.1.1. Rakkude kasvatamine .....	24
2.2.1.2. Rakkude lüüsimine .....	24
2.2.1.3. 70S ribosoomide eraldamine .....	24
2.2.1.4. 50S alaühikute eraldamine dissotsieerivates tingimustes .....	25
2.2.2. 50S alaühikute termostabiilsuse mõõtmine sahharoosi gradiendiga.....	25
2.2.3. Peptidüültransferaase aktiivsuse test .....	25
2.2.3.1. Optimaalse 50S hulga määramine.....	26
2.2.3.2. Optimaalse reaktsiooniaja määramine .....	27

2.2.3.3. Optimaalse [Mg <sup>2+</sup> ] kontsentratsiooni määramine .....	27
2.2.3.4. 50S alaühikute termostabiilsuse mõõtmine PTA testiga .....	27
2.3. Tulemused ja arutelu .....	28
2.3.1. Ribosoomide eraldamine ja profileerimine .....	29
2.3.2. 50S alaühikute termostabiilsus .....	33
2.3.3. PTA testi optimeerimine .....	37
2.3.3.1 Optimaalse 50S hulga määramine.....	39
2.3.3.2. Optimaalse reaktsiooniaja määramine .....	41
2.3.3.3. Optimaalse [Mg <sup>2+</sup> ] kontsentratsiooni määramine .....	41
2.3.3.4. Modifikatsioonide üldine mõju PTC aktiivsusele PTA testides .....	42
2.3.4. Termiliselt töödeldud 50S alaühikute aktiivsus .....	43
Kokkuvõte .....	47
Resümee .....	48
Kasutatud allikate loetelu .....	50
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	60

## Kasutatud lühendid

aa-tRNA – aminoatsüül-tRNA

DPM – langunemist minutis (*ingl k disintegrations per minute*)

EF-G – elongatsioonifaktor G

EF-T – elongatsioonifaktor T

EF-Tu – elongatsioonifaktor Tu

EM – elektronmikroskoopia

EtOAc – etüülatsetaat

IF1 – initsiatsioonifaktor 1

IF2 – initsiatsioonifaktor 2

IF3 – initsiatsioonifaktor 3

LB – Luria-Bertani sööde

ME – modifitseerivad ensüümid

NMR – tuumamagnetresonants (*ingl k nuclear magnetic resonance*)

OD – optiline tihedus

OV puhver – *overlay* puhver

PTA – peptidüültransferaase aktiivsuse test

PTC – peptidüültransferaanne keskus

RF1 – terminatsioonifaktor 1

RF2 – terminatsioonifaktor 2

RF3 – terminatsioonifaktor 3

RRF – ribosoomi taaskasutusfaktor

r-valk – ribosomaalne valk

S – Svedbergi ühik

smFRET – üksikmolekuli fluorestsents-resonantsenergiaülekanne (ingl k *single-molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

snoRNP – väike tuumakese ribonukleoproteiin (*small nucleolar ribonucleoprotein*)

U – optilise neelduvuse ühik 260 nm juures (ing. k unit)

WT – metsiktüüp (ingl k *wild type*)

Ψ – pseudouridiin

2xYT – kahekordne pärmiekstrakti ja trüptooni sööde

## Sissejuhatus

Ribosoomid on universaalsed makromolekulaarsed masinad, mis vastutavad valgusünteesi eest kõikides elusorganismides. Nende täpne ja efektiivne toimimine on rakkude eluvõime seisukohalt kriitilise tähtsusega. Ribosoomid koosnevad ribosomaalsest RNA-st (rRNA) ja valkudest ning nende struktuur ja funktsioon on evolutsiooniliselt kõrgelt konserveerunud. rRNA molekulid ei ole osale ainult ribosoomi struktuurses toetuses, vaid osalevad aktiivselt ka ribosoomi katalüütilistes funktsioonides. Pärast transkriptsiooni läbivad rRNA molekulid mitmeid posttranskriptsioonilisi modifikatsioone, nagu 2'-O-metülatsioonid ja pseudouridüleerimised. Need modifikatsioonid on olulised ribosoomi korrektseks biogeneesiks, struktuuri stabiliseerimiseks, funktsionaalsete keskuste, nagu peptidüültransferaasi keskus (PTC), õigeks talitluseks ning ribosoomi üldise funktsiooni peenhäälestamiseks. Modifikatsioonid on lokaliseerunud funktsionaalselt tähtsatesse piirkondadesse, näiteks 23S rRNA V domeeni, mis moodustab suure osa PTC-st (Watson *et al.*, 2020). Vigased või puuduvad modifikatsioonid võivad põhjustada häireid valgusünteesis, ribosoomi ebastabiilsust ja tundlikkust erinevatele stressitingimustele, sealhulgas temperatuurimuutustele. Hoolimata rRNA modifikatsioonide rohkusest ja nende fundamentaalsest tähtsusest on paljude üksikute modifikatsioonide täpne roll ja nende koosmõju ribosoomi struktuuri stabiliseerimisel ning funktsioneerimisel sageli veel ebaselge. Sellealased puuduvad teadmised piiravad arusaamist ribosoomi bioloogiast ning raskendab näiteks uute antibiootikumide väljatöötamist, mis mille sihtmärgiks on ribosoomi funktsionaalselt olulised ribosoomi.

Käesoleva bakalaureusetöö üldeesmärk on välja töötada ja optimeerida *in vitro* testsüsteem, mis võimaldaks hinnata 23S rRNA V domeeni spetsiifiliste modifikatsioonide mõju *Escherichia coli* 50S ribosoomi alaühiku peptidüültransferaasse keskuse funktsionaalsele aktiivsusele ja struktuursele stabiilsusele.

# Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Ribosoom

Ribosoomid on nukleoproteiinsed kompleksid, mis koosnevad rRNA-st ja ribosoomi valkudest (r-valgud) (Traub & Nomura, 1968). Ribosoomi komponendid tagavad koos ribosoomi täpse struktuuri ja funktsiooni, mis on evolutsiooniliselt konserveerunud. Nende ülesanne on toota valke matriits-RNA-lt (mRNA) ehk viia läbi translatsioon. Lisaks mõjutavad ribosoomid ka sünteesitavate valkude voltumisprotsessi, mille mehhanismid pole veel täielikult teada (Streit *et al.*, 2024).

Ribosoomide struktuur ja funktsioon on kõigis kolmes elu domeenis (bakterid, arhed, ja eukarüoodid) sarnane ehk evolutsiooniliselt konserveerunud (Petrov *et al.*, 2014). Siiski esineb ka erinevusi: eukarüootide ribosoom moodustub 60S (suur) ja 40S (väike) alaühikust, samas kui bakterite ja arhede ribosoom moodustub 50S (suur) ja 30S (väike) alaühikust.

Ribosomaalsete partiklite suurust tähistatakse Svedbergi ühikutes (S), mis näitab kui kiiresti osake raskusväljas liigub. (Svedberg & Nichols, 1923). Kuigi Svedbergi ühikud ei ole aditiivsed, peegeldavad need erinevusi alaühikute suuruses ja koostises. Erinevused ribosoomi partiklite suuruses taksonite vahel on põhjustatud rRNA molekulide suuruse ning ribosomaalsete valkude (r-valkude) hulga ja tüübi varieerumisest. Ribosoomide võrdlusel leiduvate sarnasuste ja erinevuste abil on võimalik mõista nii evolutsioonilisi seoseid kui ka antibiootikumide tundlikust.

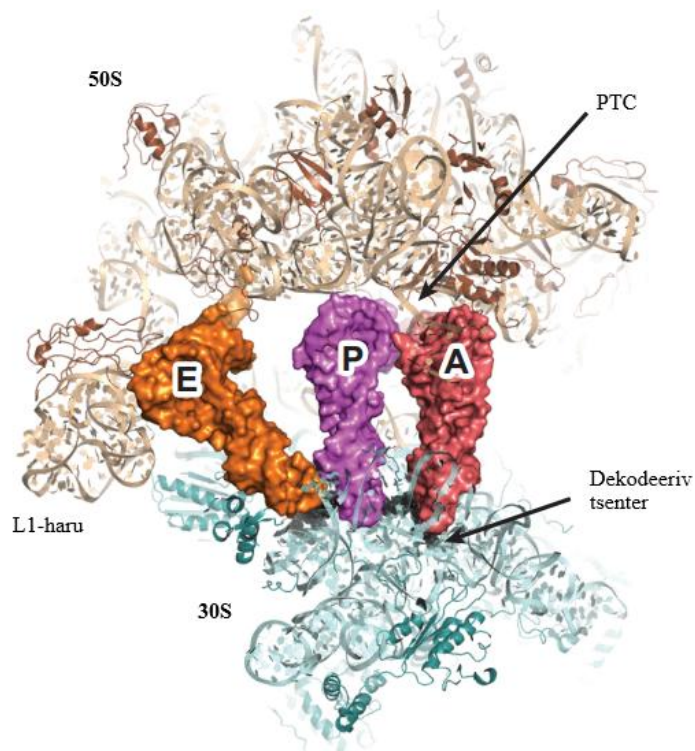
Ribosoomide struktuuri uurimisel kasutatakse röntgenkiirte difraktsiooni ja elektronmikroskoopiat (EM). Väiksemate molekulide uurimisel aatomite tasandil on võimalik kasutada ka tuuma magnet resonantsi (NMR). Meetodite arenedes on paranenud lahutusvõime, mille tulemusena on kirjeldatud järjest väiksemaid struktuurseid üksusi ribosoomides. EM ja röntgendifraktsiooni kaudu saadud tulemuste lahutusvõimet kirjeldatakse mittesüsteemse pikkusühikuna ongström (Å), mis võrdub ühekümnendikuga nanomeetrist ehk  $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ . Võrdluseks C – H kovalentse sideme pikkus on keskmiselt 1,09 Å. Tänapäeval on NMR-i kasutatud 240 kilodaltoni suurusel valgul (Rößler *et al.*, 2020) ning

ka ribosoomide uurimisel (Streit *et al.*, 2024), krüo-EMiga on saavutatud 1,22 Å ehk aatomite tasandiline lahutusvõime (Nakane *et al.*, 2020) ja röntgendifraktsiooni puhul on lahutusvõime teoorias piiratud 1 Å-ni röntgenkiirguse lainepikkuse tõttu. Struktuuribioloogiliste meetodite, eriti krüo-elektronmikroskoopia (krüo-EM) lahutusvõime pidev paranemine on olnud võtmetähtsusega ribosoomi dünaamiliste olekute ja funktsionaalsete keskuste detailseks kirjeldamiseks. Siiski jääb väljakutseks ribosoomi kui terviku ajalis-ruumilise dünaamika täielik mõistmine translatsiooni eri etappidel. Selleks on paljulubavad näiteks üksikmolekuli meetodid (nagu smFRET) (Ha *et al.*, 1996), mis võimaldavad jälgida konformatsioonilisi muutusi reaajas, kombineerituna arvutusliku modelleerimisega, et luua terviklik pilt ribosoomi tööst.

Sageli transleerivad mitu ribosoomi samaaegselt ühte mRNA molekuli. Selliseid struktuure nimetatakse polüsoomideks ehk polüribosoomideks. Kiiresti kasvavates bakterirakkudes võib umbes 90% ribosoomidest olla seotud polüsoomidesse (Flessel *et al.*, 1967).

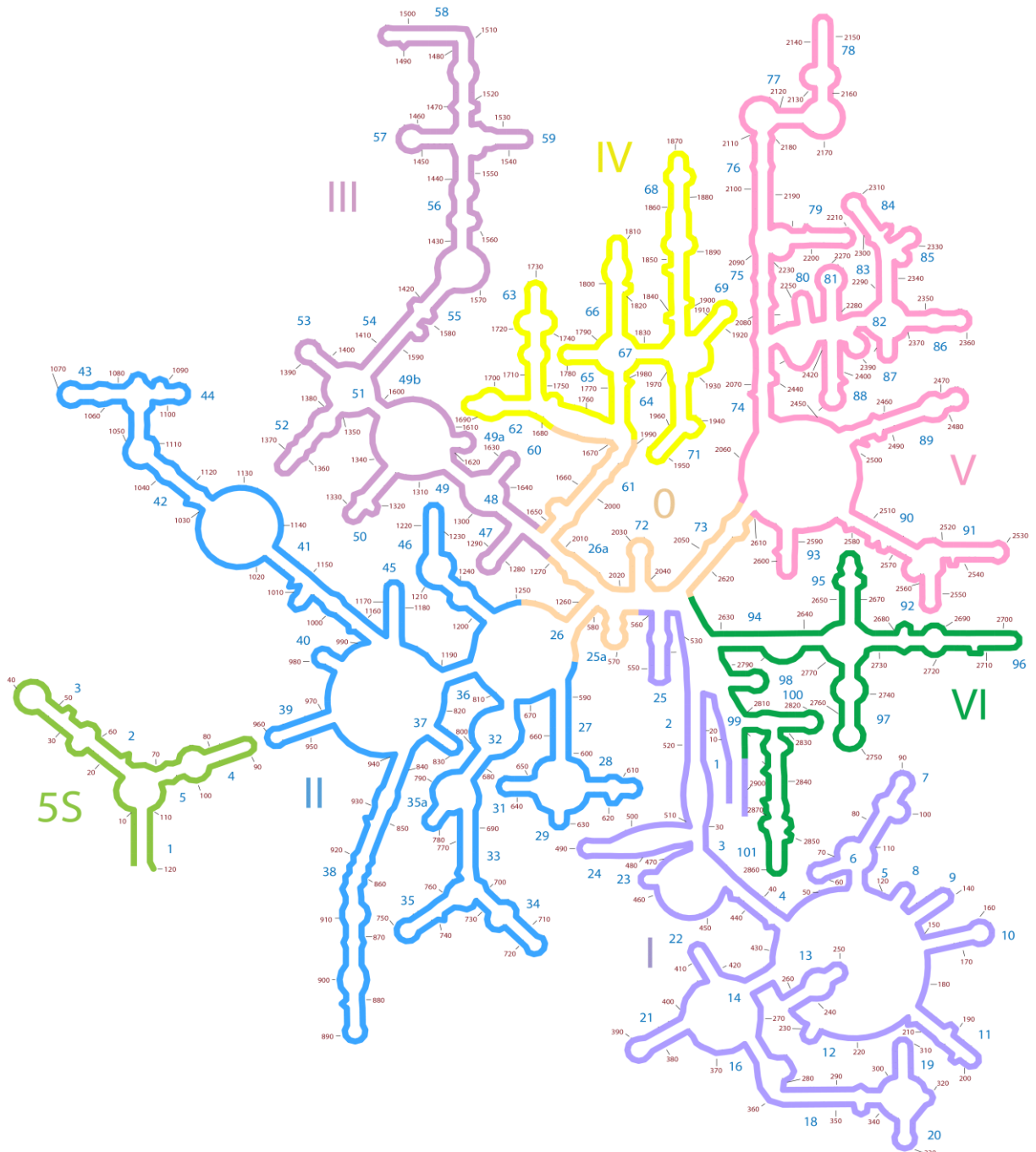
Väikse alaühiku funktsionaalne eesmärk on mRNA dekodeerimine, vahendades mRNA ja koodon-antikoodon interaktsiooni dekodeerivas keskuses (Green & Noller, 1997).

Kui ribosoomi alaühikud translatsiooniks ühinevad, moodustuvad kolm olulist funktsionaalset saiti: aminoatsüül- (A-), peptidüül- (P-) ja väljumis- (E-) saidi. Need saidid tagavad, et mRNA ja transport RNA-d (tRNA) liiguvad ribosoomis täpselt ajastatult ning ruumiliselt organiseeritult translatsiooni ajal (vt joonis 1). (Rheinberger *et al.*, 1981) Nende saitide dünaamika on translatsiooni täpsuse ja efektiivsuse seisukohalt kriitilise tähtsusega. Edasised uuringud võiksid keskenduda sellele, kuidas ribosoomi modifikatsioonid või seostuvad faktorid mõjutavad tRNA-de liikumist ja paiknemist nendes saitides, kasutades näiteks kõrglahutuslikku struktuurianalüüsi ja kineetilisi meetodeid. Lisaks on oluline mõista, kuidas erinevad tRNA isovormid või nende modifikatsioonid interakteeruvad nende saitidega erineva afiinsusega.



**Joonis 1. Bakteri 70S ribosoomi üldstruktuur.** Joonisel on eristatud suur (50S, beež) ja väike (30S, roheline) alaühik, A (aminoatsüül-), P (peptidüül-) ja E (väljumis-) sait. Veel on välja toodud peptidüültrasnferaasi keskus (PTC), dekodeeriv tsester (DC) ja L1-haru (Kohandatud allikast: Liu & Fredrick, 2016).

## 1.2. Prokarüootse ribosoomi struktuur



**Joonis 2. *E. coli* 50S ribosoomi 23S rRNA sekundaarstruktuur.** Joonisel on kujutatud 23S rRNA seitse struktuurset domeeni (nummerdatud 0-VI) ja 5S rRNA (heleroheline). Helesiniste numbritega on tähistatud rRNA heeliksiste asukohad ja pruunide numbritega nukleotiidide positsioonid rRNA ahelas. (Allikas: Petrov *et al.*, 2014).

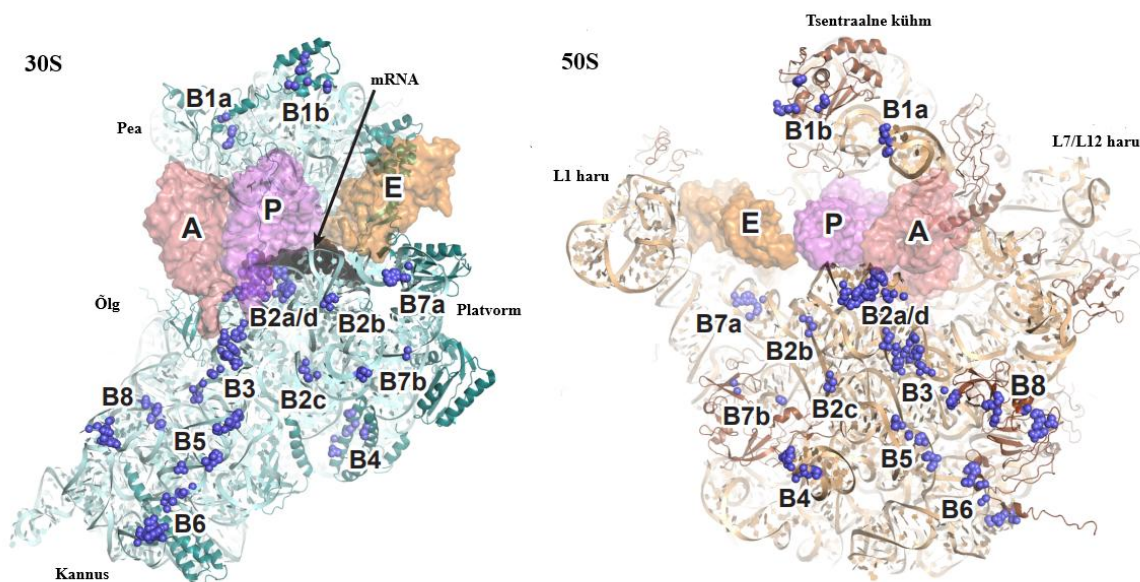
*E. coli* ribosoom on ligikaudu 2,5 megadaltonit. Sellest massist moodustavad umbes kolmandiku 54 erinevat r-valku ja kaks kolmandiku rRNA. (Kaltschmidt & Wittmann, 1970; Wada & Sako, 1987) Väike 30S alaühik koosneb 1542 nukleotiidi pikkusest 16S rRNA molekulist (Carbon *et al.*, 1978) ja 21 r-valgust (Kaltschmidt & Wittmann, 1970). Suur 50S alaühik koosneb 120 nukleotiidi pikkusest 5S rRNA-st (Brownlee *et al.*, 1967), 2904 nukleotiidi pikkusest 23S rRNA-st (Brosius *et al.*, 1980), mis omakorda moodustub 101 heeliksist ja koosneb domeenidest 0-VI (Petrov *et al.*, 2014) (vt joonis 2) ja 33 r-valgust (Hindennach *et al.*, 1971).

50S alaühiku 23S rRNA V domeen moodustab peptidüültransferaase keskuse (PTC), mille peamised komponendid on A-loop heeliks 92, P-loop heeliks 80 ja nukleotiidid sünteesitava peptiidi väljumiskanali ümbruses (Nissen *et al.*, 2000). PTC-s on tähtis nukleotiid A2451, mida peetakse katalüütiliseks algeks (Muth *et al.*, 2000). Ribosoomi katalüütiline keskus sünteesib kasvava valguahela kasutades substraadina aminoatsüül-tRNA-d (aa-tRNA), mille CCA otsas (3' ots) on estersidemega seotud aminohape. (Lang *et al.*, 2008) On näidatud, et PTC struktuur eraldatud 50S alaühikus on sarnane selle struktuuriga terves 70S ribosoomis. (Monro, 1967; Noller *et al.*, 1992, Nissen *et al.*, 2000)

Ribosoomis on väike ja suur alaühik omavahel ühendatud mitmete kontaktide ehk sildadega. Need sillad koosnevad peamiselt RNA-RNA interaktsioonidest, aga ka RNA-valgu ja valk valku kontaktidest. Ribosoomi sildades on tuvastatud 12 kanoonilist silda: B1a, B1b, B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B6, B7a, B7b, B8 (vt joonis 3). Sild B2a omakorda moodustub 50S-is asuva heeliks 69 (H69) ja 30S-is asuva heeliks 44, 24 ja 45 interaktsioonide tulemusena. (Yusupov *et al.*, 2001)

A. Spirin oli esimene kes pakkus välja, et alaühikute liikumine üksteise suhtes toimub kontaktide paindlikkuse tõttu (Spirin, 1969). Ribosoomi sillad võimaldavad alaühikutel translatsiooni käigus üksteise suhtes keeruda ligikaudu 10 kraadi pööratasliikumise (ingl „ratcheting motion“) abil. See liikumine aitab mRNA-l ja tRNA-l ribosoomist läbi liikuda. Lisaks alaühikute kooshoidmisele on sildadel seega oluline roll ka translatsiooni dünaamika reguleerimisel. (Frank & Agrawal, 2000; Shasmal *et al.*, 2010) Alaühikutevaheliste sildade

dünaamika on seega translatsioonil oluline ja et paremini selgitada nende eesmärki on tarvis edasi uurida sildade paindlikust ning stabiilsust mõjutavate molekulaarseid faktoreid.



**Joonis 3. Ribosoomi 30S ja 50S alaühikute sillad ja peamised struktuursed tunnused *E. coli* ribosoomis.** Näidatud on alaühikute kokkupuutepind koos oluliste alaühikutevaheliste sildadega (B1a, B1b, B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B6, B7a, B7b, B8). Joonisel on tähistatud tRNA sidumissaidid (A, P, E) ja mRNA asukoht (mRNA). Lisaks on esile toodud suuremad struktuursed piirkonnad: 30S alaühikul pea (Pea), platvorm (Platvorm) ja kannus (Kannus) ning 50S alaühikul L1 haru (L1 haru), L7/L12 haru ja tsentraalne kühm. (Kohandatud allikast: Liu & Fredrick, 2016).

Ribosoomi alaühikutel eristatakse ka suuremaid struktuurseid piirkondi: 30S alaühikul pead, platvormi, õlga ja kannust ning 50S alaühikul L1 haru, L7/L12 haru ja tsentraalset kühmu (Liu & Fredrick, 2016). (vt joonis 3).

Monovalent ja divalentsed ioonid, eriti kaalium ( $K^+$ ) ja magneesium ( $Mg^{2+}$ ), on ribosoomide struktuuri, stabiilsuse ja funktsiooni seisukohalt olulised. Magneesiumioonid on hädavajalikud ribosoomi alaühikute korrektseks assotsiatsiooniks (Ron *et al.*, 1968; Zitomer & Flaks, 1972) ning nende puudus võib viia ribosoomide lagunemiseni (McCarthy, 1962). Nii  $K^+$  kui ka  $Mg^{2+}$  on ribosoomide struktuurse terviklikkuse säilitamiseks kriitilise tähtsusega, näiteks kaaliumipuudus võib põhjustada imetaja ribosoomi monomeeride transformeerumist, aktiivsuse kadu ja suurenenud tundlikkust ribonukleasidelle (Näslund & Hultin, 1970). Need

ioonid seonduvad rRNA-ga, vahendades interaktsioone nii struktuursete domeenide siseselt kui ka nende vahel, ning on kontsentreeritud funktsionaalsetes keskustes rõhutades nende rolli keeruka RNA arhitektuuri stabiliseerimisel (Klein *et al.*, 2004; Draper, 2004). Kuigi mõlemat tüüpi ioonid on vajalikud, on neil sageli erinevad rollid ja toimimiskohad, kusjuures ka difuussed ioonid mängivad olulist osa üldises RNA stabiliseerimises (Näslund & Hultin, 1970; Draper, 2004)

### 1.3 Translatsioon

Valgusünteesi ehk translatsiooni tsükli võib jagada nelja põhietappi: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosoomi taaskasutus. Ühe translatsiooni tsükli tulemusena tekib valgu molekul. Sünteesitava valgu aminohappeline järjestus määratakse mRNA-s kolme nukleotiidilise triplettide ehk koodonite põhjal. Ribosoom loeb mRNA-d alati 5' otsast 3' otsa suunas ning valk sünteesitakse N-terminusest C-terminuse suunas.

Bakterite mRNA saab olla kas monotsistoorne või polütsistoorne, enamasti polütsistiroone (Yanofsky & Ito, 1966). Eukarüootide mRNA on tavaliselt monotsistiroone.

Kiiresti toimuva initsiatsiooni käigus alaühikud moodustavad initsiatsiooni kompleksi, kus initsiaator-tRNA seostatakse start koodoniga (tavaliselt AUG), millega leitakse lugemisraam üles. Prokarüootide initsiaator-tRNA (fMet-tRNA) erineb elongaator-tRNAst blokeeritud aminorühma tõttu, mis takistab tal elongaator-tRNA-na funktsioneerimast. (Adams & Capecchi, 1966) Selle tõttu on vaja metioniini ja tema koodoni jaoks eraldi initsiaator- ja elongaator tRNA-d. Translatsiooni initsiatsioon on rangelt reguleeritud etapp, tagades korrektse lugemisraami. Aktiivselt uuritakse, kuidas spetsiifilised mRNA struktuurid (nt IRES elemendid eukarüootides) või rRNA modifikatsioonid seda mõjutavad.

Initsiatsiooniks prokarüootides on vaja kolme initsiatsioonifaktorit (IF1, IF2, IF3) (Wahba *et al.*, 1969). IF1 takistab tRNA sisenemist A-saiti. IF3 takistab 50S alaühiku liiga varajast liitumist 30S alaühikuga (Subramanian & Davis, 1970). mRNA-s olev Shine-Dalgarno, mis on start koodonist ülesvoolu, järjestus aitab 30S alaühikul mRNA-le õigesti seonduda, interakteerudes 16S rRNA-ga (Shine & Dalgarno, 1974). IF2 koos GTP-ga aitab esimesel tRNA-l (fmet-tRNA<sub>fmet</sub>) seonduda

P-saiti startkoodonile ja soodustab ribosoomi subühikute seondumist (Milón & Rodnina, 2012). Lisanduv tRNA eemaldab IF3 kompleksist, võimaldades 50S alaühikul liituda (Grigoriadou *et al.*, 2007). 50S alaühiku liitumine aktiveerib IF2 GTPaasi aktiivsuse, mis viib GTP hüdroolüüsini ning IF2 ja IF1 vabanemiseni (Antoun *et al.*, 2003).

Initsiatsioon läheb üle elongatsiooniks kasutades elongatsioonifaktoreid EF-Tu, EF-T ja EF-G. EF-Tu koos GTP ja aa-tRNA seonduvad A-saiti, kus tRNA antikoodon paardub mRNA koodoniga (Nissen *et al.*, 1995). EF-Tu hüdroolüüsib GTP GDP-ks ja mõlemad vabanevad (Rodnina *et al.*, 1995). Tekkinud peptiidsidemega tRNA lükatakse A-saidist P-saiti EF-G ja GTP toimel ning enne P-saidis olnud tRNA on nüüd E-saidis ja vabaneb (Rodnina *et al.*, 1997). EF-G GDP-d taaskasutatakse asendades GDP uue GTP vastu EF-Ts (Gromadski *et al.*, 2002). Ühes sekundis sünteesitakse tavaliselt 10-20 peptiidsidet (Young & Bremer, 1976) ning mille moduleerimisel võivad tekkida probleemid nagu näiteks lugemisraami nihked või stop-koodoni ülelugemised.

Bakteritel on kaks I klassi terminatsioonifaktorit: RF1 tunneb ära UAA ja UAG koodonid, RF2 tunneb ära UAA ja UGA koodonid (Scholnick *et al.*, 1968). Klass I faktorid, kannavad Glütsiin-glütsiin-glutamiin (G-G-Q) motiivi, mis katalüüsib P-saidis olevat peptidüül-tRNA estersidet lahti (Frolova *et al.*, 1999).

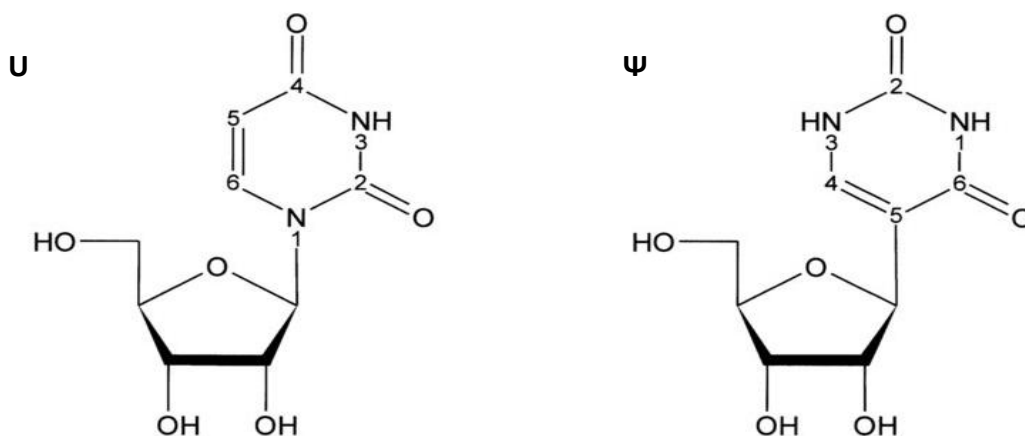
Kui ribosoom jõuab mRNA-l stoppkoodonini (UAA, UAG või UGA), seondub A-saiti klass I terminatsioonifaktor (RF1 ja RF2) (Scholnick *et al.*, 1968; Poole & Tate, 2000). Seejärel seondub suurele alaühikule II klassi terminatsioonifaktor RF3 koos GDP-ga, mis aitab RF1/RF2 vabaneda (Freistroffer *et al.*, 1997).

Pärast valguahela vabanemist peavad ribosoomi alaühikud, mRNA ja tRNA eralduma, et neid saaks uuesti kasutada. Selleks seondub ribosoomi taaskasutusfaktor (RRF) koos EF-G-GTP-ga ribosoomi A saidile, mis viib alaühikute lahknemiseni (Hirashima & Kaji, 1972; Kaji & Hirokawa, 2000). IF3 aitab seejärel eemaldada vabanenud 30S alaühikult deatsüül tRNA ja mRNA (Karimi *et al.*, 1999; Peske *et al.*, 2005).

## 1.4 Ribosoomi RNA modifikatsioonid

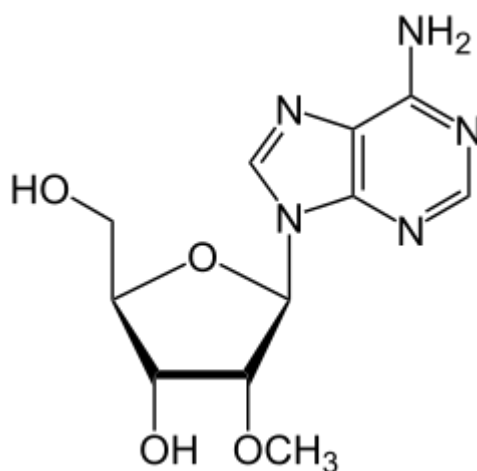
Tänapäevaks on teada 335 erinevat looduses esinevat keemilist RNA modifikatsiooni (Cappannini *et al.*, 2024) ning neid võib jagada kolme laia klassi: pseudouridüleerimised, metülatsioonid ja lämmastiku aluse modifikatsioonid. RNA modifikatsioone lisavaid ensüüme on nimetatud ka kirjutajateks (ingl k *writer*) ja modifikatsioone eemaldavaid ensüüme on nimetatud kustutajateks (ingl k *eraser*) (Ohira & Suzuki, 2024). Eukarüootides suunavad väikesed tuuma RNP kompleksid (snoRNP-d) saidispetsiifiliselt 2'-O-metülatsioonide ja pseudouridiinide sünteesi, samas kui teisi RNA modifikatsioone, sealhulgas kõiki aluste modifikatsioone, teostavad valgulised ensüümid (Kiss, 2002). Bakterites modifitseerivad RNA-d samuti valgulised ensüümid. Modifikatsioonid mõjutavad ka antibiootikumiresistentsust. Näiteks A2503 C-8 metülatsioon ( $m^8$  A2503) põhjustab resistentsust mitme antibiootikumi vastu, nende hulgas klooramfenikool, klindamütsiin ja linesoliid (Giessing *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2022).

Transkriptsiooni järgsed modifikatsioonid, millest suure osa moodustavad mitmesugused metüleerimised ja uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks ( $\Psi$ ), on oluline aspekt ribosoomide ja valkude sünteesimiseks. Valdav osa rRNA modifikatsioone asuvad funktsionaalsetes piirkondades. (Taoka *et al.*, 2018)



**Joonis 4. Uridiini (U) ja Pseudouridiini ( $\Psi$ ) struktuurid.** Tavapärasel uridiinis on uratsiili alus seotud riboosi suhkruga N1 asendi kaudu C1' glükosiidsideme kaudu.  $\Psi$  moodustumisel see side katkestatakse ning U pöörduv ümber oma C6-N1 telje. Moodustub uus side uratsiili aluse C5-asendi ja riboosi C1'-asendi vahel ehk tekib C5-C1' süsinik-süsinik side. (Joonis kohandatud allikast: Mengel-Jørgensen & Kirpekar, 2002).

$\Psi$  modifikatsiooni kirjeldati esimest korda üle 70 aasta tagasi (Cohn & Volkin, 1951; Davis & Allen, 1957).  $\Psi$  moodustub uridiini (U) isomerisatsiooni käigus, mida nimetatakse pseudouridüleerimiseks (vt joonis 4). Tekkinud isomeer võimaldab luua täiendava vesiniksideme, mis võivad lokaalselt stabiliseerida RNA struktuuri ja mõjutada selle interaktsioone teiste molekulidega. Seega  $\Psi$  on funktsionaalselt oluline RNA biogeneesiks, stabiilsuseks ja funktsiooniks ning kasutatud ka COVID-19 mRNA vaktsiinides kasutades m<sup>1</sup> $\Psi$  kaitset ensümaatilise lagunemise eest (Nance & Meier, 2021).



**Joonis 5. 2'-O-metülatsiooni struktuur.** Riboosi teise hapnikule on liitunud metüülrühm (-CH<sub>3</sub>).

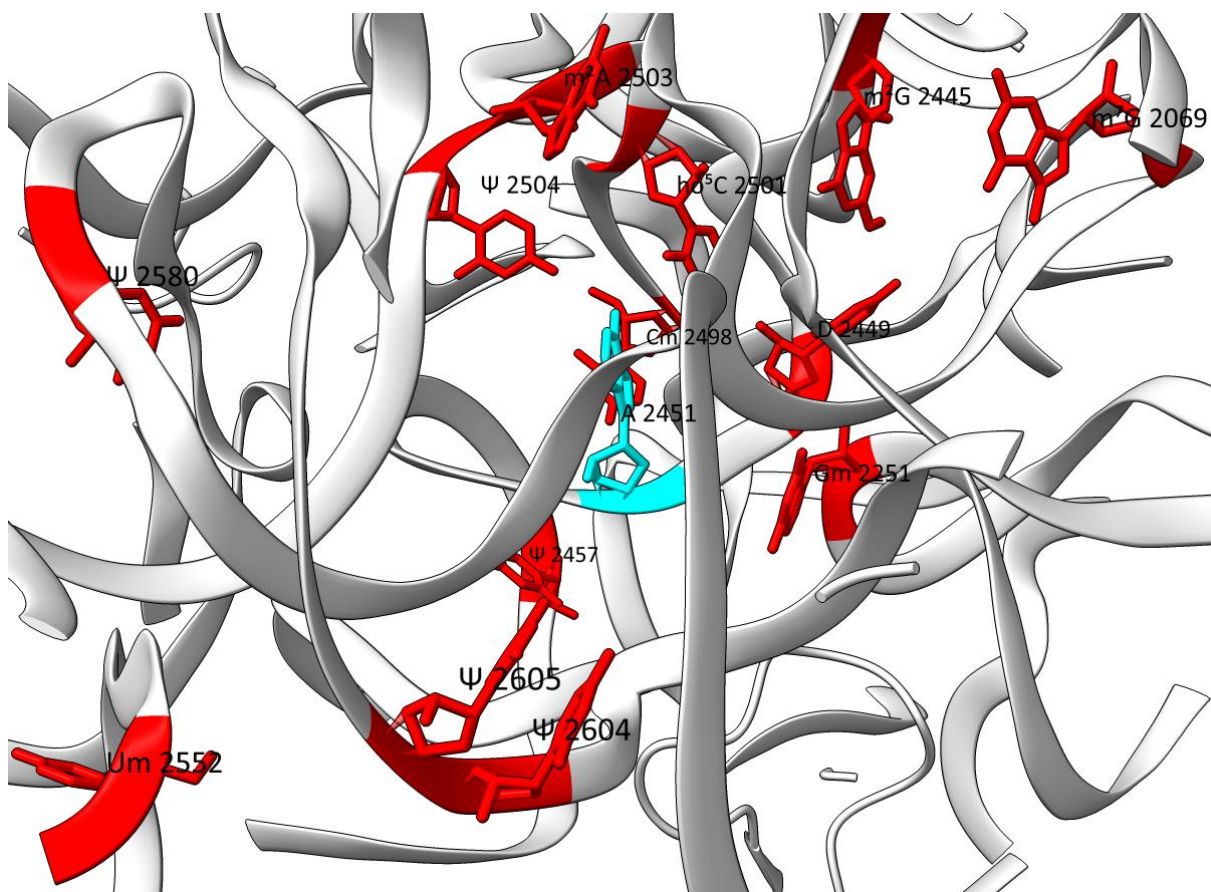
2'-O-metüülatsioon (ka Nm või 2'-O-Me) on üks levinumaid posttranskriptsioonilisi RNA modifikatsioone, mille käigus lisatakse metüülrühm (-CH<sub>3</sub>) riboosi jäägi 2' hüdrosüülrühmale (vt joonis 5) (Ayadi *et al.*, 2019). See modifikatsioon võib esineda igal nukleotiidil (N) ja seda leidub sageli erinevates RNA tüüpides, sealhulgas rRNA-s, tRNA-s ja väikestes tuuma RNA-des (snRNA) (Maden, 1990; Krogh *et al.*, 2017; Marchand *et al.*, 2017). Erinevalt aluse modifikatsioonidest ei mõjuta 2'-O-metüülatsioon otseselt Watson-Cricki aluspaaride moodustumist (Höfler & Carlomagno, 2020). Siiski stabiliseerib 2'-O-metüülrühm riboosi C3'-endo konformatsiooni, mis on iseloomulik A-vormi RNA heeliksitele ja pakitud nukleotiididele, suurendades seeläbi RNA duplekside stabiilsust (Yildirim *et al.*, 2014; Abou Assi *et al.*, 2020). Lisaks kaitseb 2'-O-metüülatsioon RNA-d ensümaatilise hüdrolüüsi eest ja muudab RNA ahela paindlikkust (Monaco *et al.*, 2018). Eukarüootides viivad rRNA 2'-O-metüülatsiooni läbi C/D box

snoRNP kompleksid, kus snoRNA juhib modifikatsiooni spetsiifilistesse kohtadesse rRNA-s komplementaarsuse alusel (Kiss-László *et al.*, 1996; Galardi *et al.*, 2002). 2'-O-metülatsioonidel on oluline roll ribosoomi biogeneesis, struktuuri stabiliseerimisel ja funktsioneerimisel, mõjutades translatsiooni täpsust ja efektiivsust (Liang *et al.*, 2007; Eralles *et al.*, 2017). Samuti on näidatud, et 2'-O-metülatsioonid mRNA-s võivad suurendada mRNA stabiilsust ja mõjutada geeniekspressiooni (Li, 2024).

Lisaks küpse ribosoomi funktsionaalsete osade mõjutamisele on rRNA modifikatsioonidel ning neid sünteesivatel ensüümidel oluline roll ka ribosoomi biogeneesis. Ero *et al.* (2024) töö tõi esile *E. coli* 23S rRNA-d modifitseerivate ensüümide (ME) kahetise rolli. Esiteks, need ensüümid lisavad modifikatsioone. Teiseks, nad stimuleerivad ka aktiivselt 50S alaühiku korrektset kokkupanekut. Sellistes tüvedes ilmsid defektid 50S alaühiku biogeneesis, näiteks aeglustunud küpsemine, ebaküpsete eelasosakeste kuhjumine ja funktsionaalsete 50S alaühikute vähenenud hulk. Ka katalüütiliselt inaktiivsed ensüümid, mis ei sünteesi modifikatsioone, olid võimelised ribosoomide kokkupanemist soodustama. See viitab, et lisaks katalüütilisele rollile võivad need ensüümid toimida ka spetsiifiliste assambleerimisfaktoritena, aidates kaasa rRNA voltumisele või stabiliseerides kokkupaneku vaheetappe. Hoolimata nende ensüümide olulisusest ribosoomi valmimisel, on sageli ainult ühe modifikatsiooni puudumisel tekkiv kasvu-, biogeneesi- ja translatsioonidefekti mõju minimaalne. See viitab modifikatsioonide summaarsele koosmõjule nii ribosoomi küpsemises kui ka funktsioonis. (Ero *et al.*, 2024)

*Saccharomyces cerevisiae* põhjal on näidatud, et kõikide universaalselt konserveerunud H69-s modifikatsioonide eemaldamine mõjub rakkude kasvule pärssivalt ning suurendab vastuvõtlikkust ribosoomide sihtivate antibiootikumide vastu. Defekt on põhjustatud halvema tRNA-ribosoomi interaktsiooni ning muutunud ribosoomi struktuuri tõttu, mis vähendab translatsiooni efektiivsust. (Liang *et al.*, 2007) Samuti on pärmis näidatud, et konserveerunud rRNA modifikatsioonide kadumine peptidüültransferaasi keskuses pärsib valgusünteesi ja rakkude kasvu. (Leppik *et al.*, 2024)

Liiv *et al.* (2005), kasutas *Escherichia coli* mudelorganismina, et uurida H69-s asuvate nukleotiidide olulisust modifitseerides rRNA primaarjärjestust. Ka *E. coli* puhul kinnitati H69  $\Psi$ 1917 mutatsioonil ( $\Psi$ 1917C) negatiivset mõju kasvule ning vähenenud polüsoomide hulka. (Liiv *et al.*, 2005)



**Joonis 6. Peptidüültransferaasi keskuse (PTC) piirkond *E. coli* 23S rRNA V domeenis.** Punasega on tähistatud nukleotiidipositsioonid, mis on *in vivo* modifitseeritud ja mille mõju termostabiilsusele käesolevas töös uuriti. Helesinisega on esile toodud katalüütiliselt oluline nukleotiid A2451, mis osaleb peptiidsideme sünteesis. Struktuur illustreerib modifitseeritavate jääkide paiknemist PTC funktsionaalses keskses. (Joonis loodud programmiga ChimeraX (Meng *et al.*, 2023) ja kohandatud struktuurist PDB ID: 4YBB) *E. coli* 36-st modifitseeritud nukleosiidist asub 13 A2451 järgist kuni 25 Å kaugusel. Watson *et al.* (2020) kirjeldavad neid 13 modifikatsiooni kui viit pseudouridiini ( $\Psi$ 2457,  $\Psi$ 2504,  $\Psi$ 2580,  $\Psi$ 2604,  $\Psi$ 2605), kolme 2'-O-metüülriboosi (Gm2251, Cm2498, Um2552), kolme metüleeritud alust ( $m^7$ G2069,  $m^2$ G2445,  $m^2$ A2503), ühte dihydrouridiini (D2449) ja ühte 5-hüdrosütsütidiini ( $ho^5$ C2501), kusjuures numeratsioon järgib standardset 23S rRNA

järjestust. (vt joonis 4). Loetletud modifikatsioonide ja neid katalüüsivad valgud on kokku võetud tabelis 1.

**Tabel 1. PTC läheduses asuvad 23S rRNA modifikatsioonid *E. coli*'s ja neid katalüüsivad ensüümid (Ero *et al.*, 2024)**

Ensüüm	Modifikatsioon	Positsioon	Märkused
RluE	Pseudouridiin ( $\Psi$ )	2457	
RluC	Pseudouridiin ( $\Psi$ )	2504	
RluC	Pseudouridiin ( $\Psi$ )	2580	
RluF	Pseudouridiin ( $\Psi$ )	2604	N1 pole seotud H <sub>2</sub> O-ga (Noeske <i>et al.</i> , 2015)
RluB	Pseudouridiin ( $\Psi$ )	2605	
RlmB	2'-O-metüülguanosiin (Gm)	2251	P-lingus
RlmM	2'-O-metüülsütidiin (Cm)	2498	
RlmE	2'-O-metüüluridiin (Um)	2552	
RlmN	2-metüüladenosiin (m <sup>2</sup> A)	2503	A-lingus
RlmKL (K domeen)	N7-metüülguanosiin (m <sup>7</sup> G)	2069	
RlmKL (L domeen)	2-metüülguanosiin (m <sup>2</sup> G)	2445	
RlhA	5-hüdrosütsütidiin (ho <sup>5</sup> C)	2501	
RldA	Dihüdrouridiin (D)	2449	

Uuringud on näidanud, et termofiilspetsiifilised modifikatsioonid on olulised nii tRNA kui ka rRNA struktuuri stabiliseerimisel, mis omakorda aitab kaasa nende organismide üldisele termotolerantsusele (Ohira *et al.*, 2022; Hori *et al.*, 2018; Sas-Chen *et al.*, 2020). Näiteks tRNA-s on m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U54 modifikatsioon, 2-tiouridiini derivaat, mida leidub paljude termofiilide T-ahelas,

näidanud, et see tõstab tRNA sulamistemperatuuri ligikaudu 3°C võrra võrreldes selle m<sup>5</sup>U54 analoogiga, otseselt suurendades selle termilist stabiilsust (Yokoyama et al., 1987; Horie et al., 1985). Ka rRNA-s leitav N<sup>4</sup>-atsetüültsütidiin (ac<sup>4</sup>C) aitab kaasa RNA kaksikahelate stabiilsusele kõrgetel temperatuuridel termofiilsetes rühedes (Sas-Chen *et al.*, 2020). Seega, RNA modifikatsioonid aitavad termilise stressiga toime tulla.

Kokkuvõttes rRNA modifikatsioonid osalevad mitte ainult ribosoomi biogeneesis ja funktsionis, vaid ka struktuurseks stabiliseerimiseks. Et tuvastada 23S rRNA PTC läheduses asuvate modifikatsioonide mõju selle termostabiilsusele ja seeläbi ka efektiivsusele, viiakse käesolevas töös läbi biokeemilised katsed ning määratakse ribosoomi profiilid.

## 2. Eksperimentaalosa

Kuigi on teada, et rRNA posttranskriptsioonilised modifikatsioonid mõjutavad ribosoomi, on nende täpsem toimemehhanism ja koosmõju ribosoomi talitlusele veel jäänud ebaselgeks.

**Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada ja optimeerida *in vitro* testsüsteem, mis võimaldaks uurida spetsiifiliste 23S rRNA modifikatsioonide mõju ribosoomi funktsioonile.**

Selle eesmärgi saavutamiseks teostati järgmised etapid:

- Kasutati laboris konstrueeritud 23S rRNA modifikatsioone katalüüsivate ensüümi defektsed ning WT *E. coli* tüvesid. Rakkudest eraldati 70S ribosoomid, millest saadi 50S alaühikud dissotsieerivates tingimustes.
- Optimeeriti 50S alaühiku peptidüültransferaase (PTA) aktiivsuse määramise tingimusi (50S kontsentratsioon, reaktsiooniaeg, magneesiumioonide kontsentratsioon).
- Hinnati 23S rRNA V domeeni modifikatsioonideta ( $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$ ) ja metsiktüüpi 50S alaühikute termilist stabiilsust kasutades sahharoosigradiendis profileerimise abil.
- Analüüsiti modifikatsioonide puudumise ja termilise stressi mõju 50S alaühikute peptidüültransferaasele aktiivsusele.

## 2.1. Töös kasutatud materjalid

### 2.1.1. Töös kasutatud söötmed, puhvrid ja lahused.

LB sööde: 1,0% (w/v) trüpton, 0,5% (w/v) pärmiekstrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) agar (Bertani, 1951)

2xYT sööde: 1,6% (w/v) trüpton, 1% (w/v) pärmiekstrakt, 0,5% (w/v) NaCl ( Sambrook et al., 1989)

OV puhvrid: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 6 mM  $\beta$ -merkaptotoetanool, mQ vesi. Puhvrid erinesid  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  kontsentratsiooni poolest, mis on näidatud puhvri nimes ( $[\text{Mg}^{2+}]$  mM): OV-10 10 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , OV-8: 8 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , OV-6: 6 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , OV-4: 4 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , OV-1: 1 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , OV-0:  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  puudus.

10-25% (w/v) sahharoosi gradiendi lahused: 50% (w/v) sahharoos, valmistatud vastavas OV puhvris (OV-10 puhul 10 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$ , OV-8 puhul 8 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$ , OV-6 puhul 6 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$ , OV-4 puhul 4 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$ , OV-1 puhul 1 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$ ).

### 2.1.2. Töös kasutatud tüved

WT: *E. coli* MG1655 metsiktüüpi tüvi, mida kasutati kontrollina.

$\Delta 9$ : *E. coli* MG1655 derivaattüvi, mille genomist on eemaldatud üheksa 23S rRNA modifikatsiooni eest vastutavat geeni ( $\Delta rluC$ ,  $\Delta rlmKL$ ,  $\Delta rlmN$ ,  $\Delta rlmM$ ,  $\Delta rluE$ ,  $\Delta rluB$ ,  $\Delta rluF$ ,  $\Delta rlmB$ ,  $\Delta rlhA$ ) (Ero et al., 2024).

$\Delta 10$ : *E. coli* MG1655 derivaattüvi, millel on lisaks  $\Delta 9$  tüve deletsioonidele eemaldatud ka *rlmE* geen ( $\Delta rluC$ ,  $\Delta rlmKL$ ,  $\Delta rlmN$ ,  $\Delta rlmM$ ,  $\Delta rluE$ ,  $\Delta rluB$ ,  $\Delta rluF$ ,  $\Delta rlmB$ ,  $\Delta rlhA$ ,  $\Delta rlmE$ ) (Ero et al., 2024). RlmE ensüüm vastutab Um2552 modifikatsiooni eest 23S rRNA-s.

## 2.2. Metoodika

### 2.2.1 70S ribosoomide ja alaühikute eraldamine

#### 2.2.1.1. Rakkude kasvatamine

WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  väljakülvid tehti LB tardsöötmele, millele oli lisatud deletsioonitüvede puhul kanamütsiini (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Bakterikultuure inkubeeriti 37°C juures üleöö. Üks koloonia kasvatati eelkultuurina 2xYT (100 ml), millele oli deletsioonitüvede puhul lisatud kanamütsiini (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), üleöö loksutil (180 rpm, 37°C). Üleöökuultuuri optilise tiheduse ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) põhjal tehti lahjendus 2xYT-sse (2000 ml), et bakterikultuuri algtihedus oleks  $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0,05$ . Kultuure kasvatati loksutil (37°C, 180 RPM) kuni hilise eksponensiaalse faasini ( $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 1,5$ ) ning rakud koguti kokku ROTINA lauatsentrifuugis (4500 rpm, 20 min, 4°C, rootor Hettich 4723).

#### 2.2.1.2. Rakkude lüüsimine

Rakud suspendeeriti 15 ml *overlay*-10 (OV-10) puhvris (vt. 2.1.), millele lisati DNase I (lõppkontsentratsioon 40 U/ml). Rakkude lüüsiks lisati klaaskuule ( $\varnothing$  0,01 mm) ja need lüüsi kolme tsükliga (3 x 60 sekundit, 4000 RPM, 4°C, Precellys 24 homogenisaator). Lüsaat sadestati lauatsentrifuugis (13000 RPM, 15-20 min, 4°C). Nukleiinhapete hulk määrati supernatandi optilise tiheduse ( $A_{260\text{nm}}$ ) põhjal.

#### 2.2.1.3. 70S ribosoomide eraldamine

Ühele 38 ml 10–25% (w/v) 10 mM [ $\text{Mg}^{2+}$ ] sahharoosi gradiendile (vt 2.1) kanti  $\approx 100$  U lüsaati (vt 2.1). Sahharoosigradiende ultratsentrifuugiti ( $\omega^2t = 2,8 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 4 °C, rootor SW-28). Lüsaadi gradienti analüüsi UVis 920 ( $A_{260\text{nm}}$ ) läbivooluspektrofotomeetriga ning ribosoomi profiil visualiseeriti REC112 isekirjutajaga. Saadud ribosoomide profiilide kvantitatiivne analüüs viidi läbi ImageJ tarkvaraga 70S ribosoomile vastav gradiendi fraktsioon koguti kokku ja ultratsentrifuugiti ( $\omega^2t = 1,2 \cdot 10^{12} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 4 °C rootor Ti-50.2). Ribosoomide sade lahustati 500  $\mu\text{l}$  OV-1 (vt 2.1) dissotsieerivas puhvris (4 h, 4 °C). 70S ribosoomide hulk määrati supernatandi optilise tiheduse ( $A_{260\text{nm}}$ ) põhjal.

#### 2.2.1.4. 50S alaühikute eraldamine dissotsieerivates tingimustes

Ühele 38 ml 10–25% (w/v) 1 mM [Mg<sup>2+</sup>] dissotsieeruvale sahharoosi gradiendile (vt 2.1) kanti ≈ 100 U 70S ribosome. Sahharoosi gradiente ultratsentrifuugiti ( $\omega^2t = 2,8 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 4 °C, rootor SW-28). 70S alaühikuid dissotsieeruvad gradienti analüüsiti UVis 920 ( $A_{260\text{nm}}$ ) läbivooluspektrofotomeetriga ning 50S alaühikud visualiseeriti REC112 isekirjutajaga. Eraldatud 50S fraktsiooni [Mg<sup>2+</sup>] tõsteti 1 mM-ilt 10 mM-le magneesiumatsetaadi (Mg(OAc)<sub>2</sub>) lisamisega. 50S alaühikud ultratsentrifuugiti ( $\omega^2t = 1,2 \cdot 10^{12} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 4 °C, rootor Ti-50.2). 50S alaühikute sade lahustati 500 µl OV-10 puhvril (4 h, 4 °C). 50S alaühikute kontsentratsioon määrati fotospektromeetriga ( $A_{260\text{nm}}$ ).

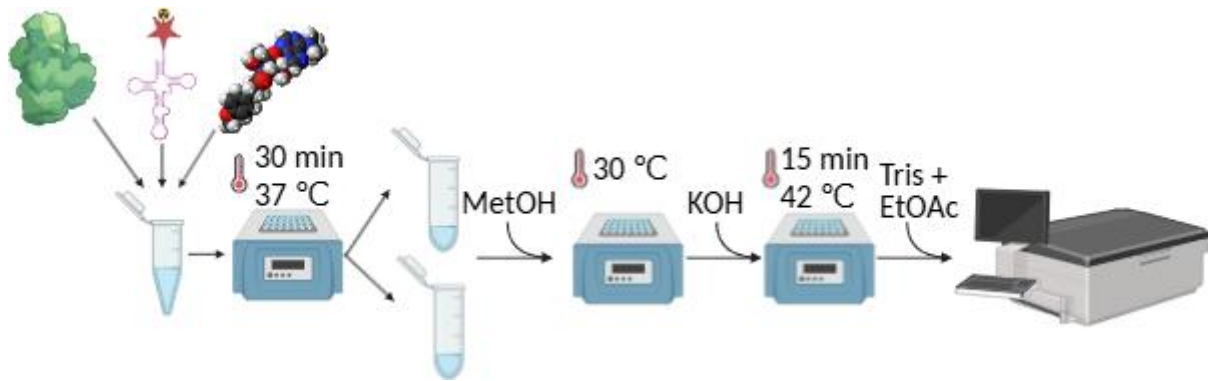
#### 2.2.2. 50S alaühikute termostabiilsuse mõõtmine sahharoosi gradiendiga

50S alaühikutest (5 U) valmistati proovid lõppmahuga 100 µl, milles [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioon oli kas 4 mM või 10 mM. Selleks lisati alaühikutele esmalt vastav kogus OV-0 puhvrit ning seejärel viidi proovid lõppmahuni vastavalt kas OV-4 või OV-10 puhvriga (vt 2.1). 50S alaühikuid inkubeeriti termotsükleris 30 min temperatuuridel 37 °C, 49 °C ja 60 °C.

Inkubeeritud 50S alaühikute maht viidi 500 µl-ni vastava OV puhvriga ning kanti 10–25% (w/v) vastava [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooniga sahharoosi gradiendile (vt 2.1). Proovid tsentrifuugiti ( $\omega^2t = 2,8 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ , 4 °C, rootor SW-28). Termilise stressi läbinud 50S alaühikute gradienti analüüsiti UVis 920 ( $A_{260\text{nm}}$ ) läbivooluspektrofotomeetriga ning ribosoomi profiil visualiseeriti REC112 isekirjutajaga.

#### 2.2.3. Peptidüültransferaase aktiivsuse test

Ribosoomi 50S subühiku peptiidsideme sünteesivõimet määrati faktor sõltumatu puromütsiinireaktsiooniga (Traut & Monro, 1964). PTA testi üldine skeem on kujutatud joonisel 7.



**Joonis 7. PTA test.** Testi põhietapid on järgmised: (1) 50S ribosoomi alaühikute eelinkubeerimine radioaktiivselt märgistatud doonorsubstraadi ( $[^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_{\text{fMet}}$ ) ja aktseptorsubstraadi (puromütsiin) juuresolekul (joonisel 30 min,  $37^\circ\text{C}$ ); (2) peptiidsideme sünteesi reaktsiooni käivitamine metanooli (MetOH) lisamisega ja inkubeerimine (joonisel  $30^\circ\text{C}$ ); (3) reaktsiooni peatamine kaaliumhüdroksiidi (KOH) lisamisega ja inkubeerimine (joonisel 15 min,  $42^\circ\text{C}$ ); (4) moodustunud radioaktiivse produkti ( $[^{35}\text{S}]\text{fMet-puromütsiin}$ ) ekstraheerimine etüülatsetaati (EtOAc) pärast pH neutraliseerimist Tris-HCl-ga; (5) ekstraheeritud  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-puromütsiini}$  koguse kvantifitseerimine stsintillatsiooniloenduriga, mis peegeldab 50S alaühikute PTA aktiivsust.

#### 2.2.3.1. Optimaalse 50S hulga määramine

Optimaalse 50S ribosoomi alaühikute kontsentratsiooni määramiseks varieeriti nende kogust PTA testi reaktsioonisegus. PTA testis kasutati 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 ja 10 pmol WT ribosoomi ning 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ja 6 pmol  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  ribosoomi. Ühe tehnilise replikaadi lõppmaht oli 80  $\mu\text{l}$ . Reaktsioonisegu sisaldas lisaks muudetavale kogusele 50S alaühikutele  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_{\text{fMet}}$  eriaktiivsusega 5000 cpm/pmol, 1 mM puromütsiini ning 37,5% (v/v) metanooli.

110  $\mu\text{l}$  reaktsioonisegu eelinkubeeriti (ilma metanoolita) 30 minutit  $37^\circ\text{C}$  juures ning jaotati kaheks alikvoodiks. Seejärel lisati 30  $\mu\text{l}$  metanool ning reaktsioon viidi läbi 30 min  $30^\circ\text{C}$ . Reaktsiooni peatati 10  $\mu\text{l}$  10 M KOH lisamisega ning inkubeeriti  $42^\circ\text{C}$  15 min. Segule lisati 200  $\mu\text{l}$  Tris-HCl (pH 7,5) ning puromütsiin- $[^{35}\text{S}]\text{fMet}$  ekstraheeriti segust 1 ml etüülatsetaadiga (EtOAc) segades vorteksil 2000 RPM 2 min. Lahuse faasid eraldati lauatsentrifuugis 2000 RPM 2 min. Etüülatsetaadi faasist pipeteeriti 0,5 ml lahust radioaktiivsuse loendaja tuubi ja lisati 5 ml stsintillatsiooni lahust. Produkti luminesents mõõdeti ühe minuti jooksul Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR-ga.

Edasisteks eksperimentideks valiti optimaalseks ribosoomi kontsentratsiooniks 4 pmol reaktsiooni kohta.

#### *2.2.3.2. Optimaalse reaktsiooniaja määramine*

Optimaalse reaktsiooniaja määramiseks kohandati esialgset PTA testi protokoll (vt 2.2.3.1.), varieerides reaktsiooniaega järgnevate ajapunktidega: 5, 15, 30, 45, 60 ja 120 min. Reaktsioon viidi läbi WT 50S alaühikutega. Edasisteks eksperimentideks valiti optimaalseks ajapunktiks 60 minutit.

#### *2.2.3.3. Optimaalse [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni määramine*

Optimaalse [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni määramiseks kohandati esialgset PTA testi protokoll (vt 2.2.3.1.), varieerides [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni järgnevate kontsentratsioonidega: 4, 6, 8 ja 10 mM. Reaktsioon viidi läbi WT, Δ9 ja Δ10 alaühikutega.

#### *2.2.3.4. 50S alaühikute termostabiilsuse mõõtmine PTA testiga*

Viimaks hinnati 50S alaühikute termostabiilsust varieeruva [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni tingimustes optimiseeritud PTA testiga. Ribosoomide 50S alaühikutele rakendati termilist stressi vastavalt meetodile 2.2.2 [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonidel 4, 6, 8 ja 10 mM. Reaktsioon viidi läbi WT, Δ9 ja Δ10 alaühikutega ning 10 mM [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonil.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

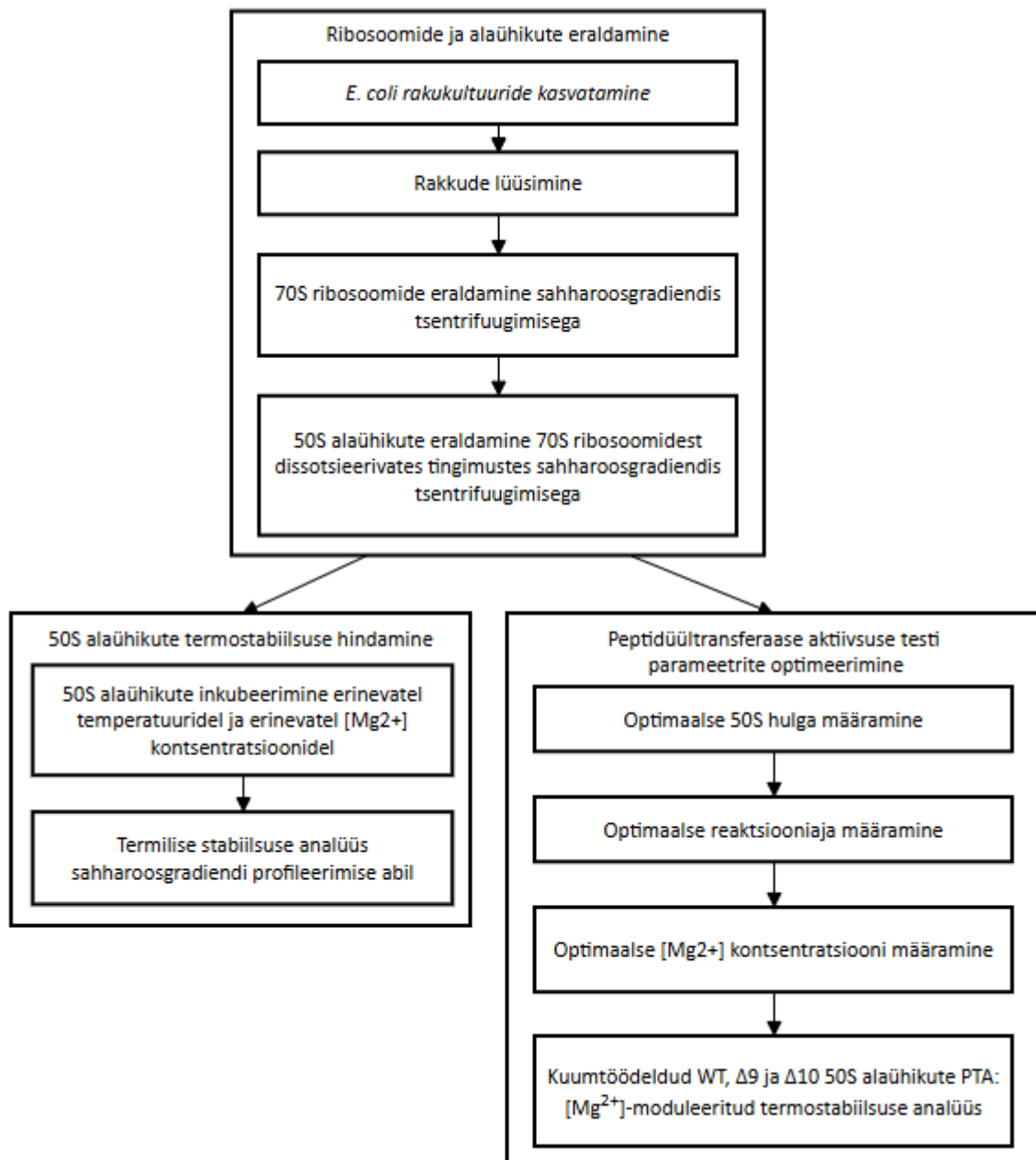
Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalse osa eesmärk oli välja töötada *in vitro* testsüsteem, mis võimaldaks hinnata spetsiifiliste 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide mõju peptidüültransferaase keskuse funktsionaalsele aktiivsusele ehk peptiidideme sünteesi efektiivsusele. Aktiivsust kvantifitseeriti peptidüültransferaase aktiivsuse käigus akumulunud [<sup>35</sup>S]fMet-puromütsiini produkti tekke mõõtmisega.

Töö käigus eraldati ja puhastati metsiktüüpi (WT) ning 23S rRNA V domeeni modifikatsioonideta ( $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$ ) *E. coli* tüvedest 70S ribosoomid ja nende 50S alaühikud. Eraldatud ribosoomide assambleerumist hinnati sahharoosigradiendi profileerimisega, mis visualiseerib ribosoomide ja alaühikute koguselist jaotumist vastavalt fraktsioonide profiilide suurusele ja kujule.

Seejärel uuriti 50S alaühikute struktuurset termostabiilsust füsioloogilistes (37 °C), kuumastressi (49 °C) ning denatureerivates (60 °C) tingimustes, varieerides magneesiumi kontsentratsiooni. Nendes tingimustes toimunud võimalikku lagunemist hinnati sahharoosigradiendi profileerimisega.

Järgnevalt viidi läbi PTA testi tingimuste optimeerimine. Selleks määrati optimaalsed 50S alaühikute kontsentratsioonid, reaktsiooniajad ja [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonid, et tagada maksimaalne tundlikus ja usaldusväärne testi tulemus.

Pärast testsüsteemi valideerimist ja optimeerimist uuriti PTC läheduses asuvate 23S rRNA modifikatsioonide puudumise mõju 50S alaühikute peptidüültransferaasele aktiivsusele. Peptidüültransferaasset aktiivsust analüüsiti tingimustes, kus termilist stressi oli eelnevalt moduleeritud erinevate [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonidega. (vt joonis 9)



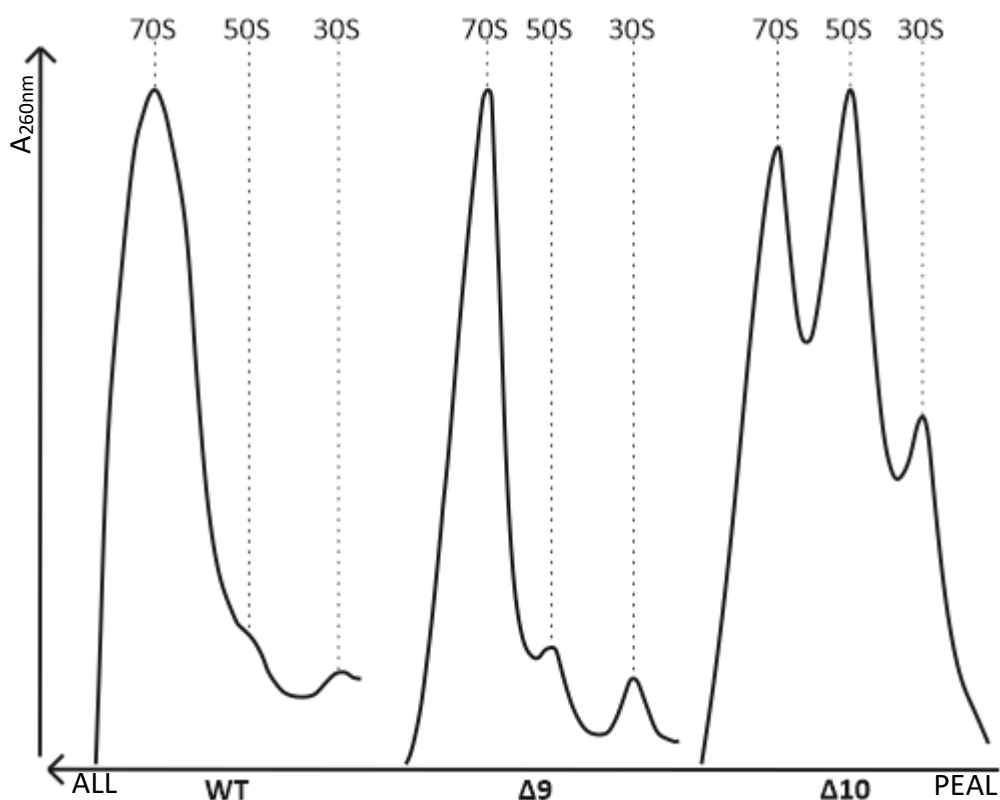
Joonis 8. Bakalaureusetöö eksperimentaalse osa skeem.

### 2.3.1. Ribosoomide eraldamine ja profileerimine

Selleks, et hinnata ribosoomi modifikatsioonide puudumise mõju 70S ribosoomide *in vivo* biogeneesile, analüüsiti rakkude ribosoomi populatsiooni partiklite jaotust. Visualiseeriti sahharoosgradiendis ultratsentrifuugimisel saadud 70S ribosoomide ning 50S ja 30S

alaühikute koguseid kirjeldavad profiilid. Nende andmete alusel hinnati ribosoomide assambleerumist ja biogeneesi.

Kõikide tüvede puhul olid eristatavad fraktsioonid, mis vastasid 70S ribosoomidele ning 50S ja 30S alaühikutele (vt joonis 9). WT tüve puhul oli 70S ribosoomide hulk suur ning vabu alaühikuid oli minimaalselt.  $\Delta 9$  tüve puhul oli täheldatav mõningane vabade 50S alaühikute hulga suurenemine võrreldes WT tüvega. Suurimad erinevused ilmsesid  $\Delta 10$  tüve puhul, kus 70S ribosoomide kogus oli oluliselt vähenenud ning vabade 50S ja 30S alaühikute hulk märkimisväärselt suurenenud (vt tabel 2). 70S/50S suhtarv langes WT puhul 13,95-lt,  $\Delta 9$  puhul 6,58-le ja  $\Delta 10$  puhul 0,81-le.



**Joonis 9. WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  ribosoomide analüüs *in vivo*.** *E. coli* tüvede WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  rakukultuure kasvatati 2xYT söötmes loksutil 37°C juures kuni hilise eksponentsiaalse faasini ( $OD_{600nm} \approx 1,5$ ). Rakud lüüsiiti ning  $\approx 100 A_{260nm}$  ühikut lüsaati kanti 10–25% (w/v) sahharoosgradiendile OV-10 puhvrtsis ning lahutati ultratsentrifuugimisel. Ribosoomide profiilid visualiseeriti  $A_{260nm}$  neelduvuse mõõtmisega. Kriipsjoontega on märgitud 70S, 50S ja 30S partiklite piikide asukohad. Y-teljel on optiline neelduvus 260 nm juures, X-teljel on sedimentatsiooni suund.

**Tabel 2. WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  ribosoomide analüüsil saadud fraktsioonide profiilide kvantitatiivsed väärtused ning 70S/50S suhtarvud.**

Tüvi	70S kogus*	50S kogus*	70S/50S suhtarv
WT	275442	19752	13,95
$\Delta 9$	119547	18171	6,58
$\Delta 10$	60455	74370	0,81

\*Partiklite kogused on saadud profiilide joonealuse pindala leidmisel ImageJ tarkvaraga. Kogused on suhtelised, põhinedes optilisel neeldumisel 260 nm juures.

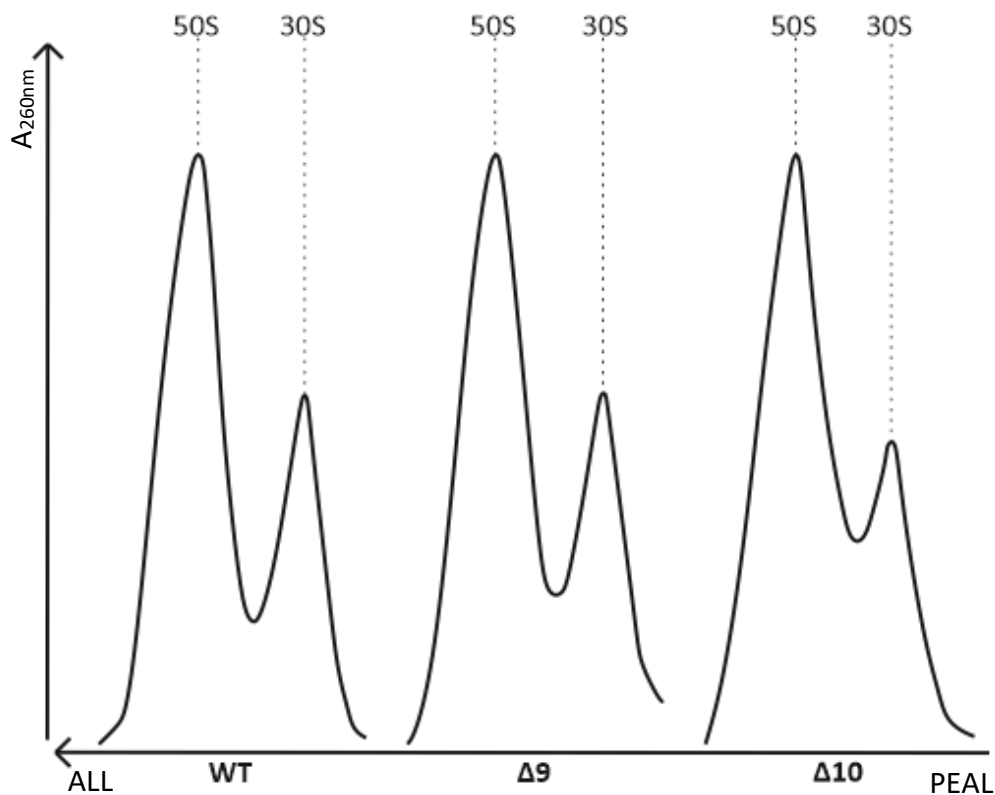
Ribosoomide profiilid viitavad sellele, et 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide puudumine mõjutab ribosoomide biogeneesi. WT tüve puhul vastas profiil ootuspärasele muustrile, kus valdav osa ribosoomide esines funktsionaalsete 70S partiklitena.  $\Delta 9$  tüve puhul täheldatud vabade alaühikute hulga vähenemine viitab teatud määral häiretele ribosoomide moodustumisel või 70S ribosoomide stabiilsuse vähenemisele. Seevastu  $\Delta 10$  tüve puhul, kus lisaks  $\Delta 9$  deletsioonidele on eemaldatud ka *rlmE* geen ja seega puudub Um2552 modifikatsioon 23S rRNA-s, ilmnemise ulatuslikud defektid ribosoomide assambleerumises.

See tulemus on kooskõlas varasemate uuringutega, mis on käsitlenud *RlmE* deletsiooni mõju. Näiteks on näidatud, et Um2552 metülatsiooni puudumisel akumulerevad vabad 50S ja 30S subühikud ning väheneb polüsoomide ja 70S ribosoomide hulk (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Lisaks on täheldatud, et  $\Delta rlmE$  tüvedes kuhjuvad ka 50S subühiku eellaspartiklid, nagu 45S partiklid (Bügl *et al.*, 2000), mis tugevat viitab hilistele defektidele 50S alaühiku küpsemisel. Arai *et al.* (2015) on näidanud, et just Um2552 modifikatsiooni olemasolu on kriitiline 50S assambleerumise hilisteks etappideks

Ka Ero *et al.* (2024) on kirjeldanud, et mitmete 23S rRNA modifitseerivate ensüümide, sealhulgas *RlmE*, geenide inaktiveerimine *E. coli*'s põhjustab 50S alaühiku biogeneesi defekte, sealhulgas ebaküpsete eelasosakeste kuhjumist.  $\Delta 10$  tüve puhul täheldatud fenotüüp, kus vabade alaühikute osakaal on suur ja funktsionaalsete 70S ribosoomide hulk väike, peegeldab seega modifikatsioonide kumulatiivset tähtsust ribosoomide efektiivsel moodustumisel. Võimalik seletus on, et 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide, eriti Um2552 puudumine

häirib rRNA korrektset voltumist ja/või interaktsioone ribosomaalsete valkudega. Modifikatsioonid ja interaktsioonid r-valkudega suunavad protsessi, stabiliseerides lokaalseid struktuure või luues spetsiifilisi kontakte, ning nende puudumisel võib rRNA valesti voltuda, mis takistab ribosoomi alaühikute korrektset kokkupanekut ja funktsioneerimist. See viib ebastabiilsete alaühikute tekkeni, mis ei suuda efektiivselt assotsieeruda 70S ribosoomideks. Sama on osutanud ka Wang *et al.* (2020), leides et  $\Delta$ rlmE tüves on 50S subühikute võime seonduda 30S subühikutega vähenenud.

Selleks, et edasi uurida modifikatsioonide mõju ribosoomi funktsioonile PTC aktiivsusele, oli vajalik eraldada 70S ribosoomidest funktsionaalsed 50S alaühikud. Esmalt puhastati 70S ribosoomid ning seejärel dissotsieeriti need madala magneesiumikontsentratsiooni tingimustes 50S ja 30S alaühikuteks. WT,  $\Delta$ 9 ja  $\Delta$ 10 tüvede eelnevalt eraldatud 70S ribosoomid dissotsieerusid 1 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsiooni juures ootuspäraselt 50S ja 30S alaühikuteks. Dissotsiatsiooniprofiilid on kõigi tüvede puhul suuremal määral sarnased ning olulisi erinevusi ei täheldatud 50S ja 30S fraktsioonide eraldumise efektiivsuses erinevate tüvede vahel. 50S alaühikuid koguti kokku edasisteks analüüsideks. (vt joonis 10)



**Joonis 10. WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  ribosoomi alaühikute preparatiivne eraldamine.**  $\approx 100 A_{260nm}$  ühikut WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  70S ribosoomi kanti 10–25% (w/v) dissotsieeruvale sahharoosgradiendile OV-1 puhvris ning lahutati ultratsentrifuugimisel. Ribosoomide profiilid visualiseeriti  $A_{260nm}$  neelduvuse mõõtmisega. Kriipsjoontega on märgitud 50S ja 30S partiklite piikide asukohad. Y-teljel on optiline neelduvus 260 nm juures, X-teljel on sedimentatsiooni suund.

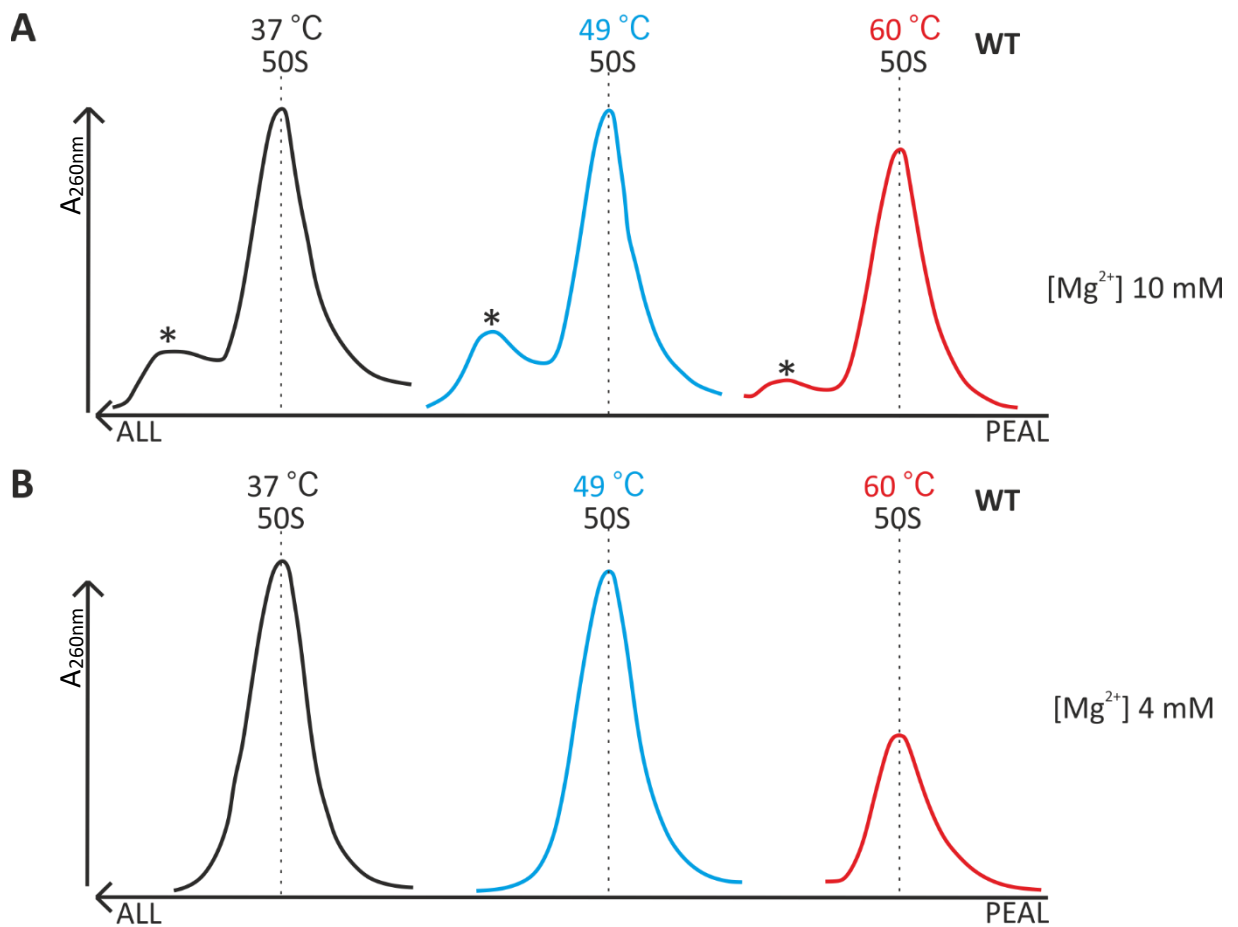
### 2.3.2. 50S alaühikute termostabiilsus

Selleks, et uurida, kuidas 23S rRNA modifikatsioonide puudumine mõjutab 50S alaühiku termostabiilsust, viidi läbi termilise stressi katsed. WT ja  $\Delta 9$  tüvedest eraldatud 50S alaühikuid inkubeeriti erinevatel temperatuuridel (37 °C, 49 °C, 60 °C) ja kahel erineval magneesiumioonide kontsentratsioonil (10 mM ja 4 mM [ $Mg^{2+}$ ]). Seejärel analüüsiti nende struktuurilist terviklikkust sahharoosigradiendi profileerimisega.

37 °C valiti füsioloogilise kontrolltingimusena, mis vastab *E. coli* optimaalsele kasvutemperatuurile (Farewell & Neidhardt, 1998). 49 °C on ribosoomide *in vitro* ribosoomi rekonstitutsiooni uuringutes kasutatud temperatuur ning käesolevas töös kasutati mõõduka kuumastressi rakendamiseks (Nierhaus & Dohme, 1974). 60 °C valiti tugeva

kuumastressi tingimusena, kuna varasemad uuringud on näidanud, et sellel temperatuuril algab 50S alaühikute denaturatsioon (Nissley *et al.*, 2023), võimaldades seeläbi esile tuua modifikatsioonide potentsiaalse stabiliseeriva efekti.

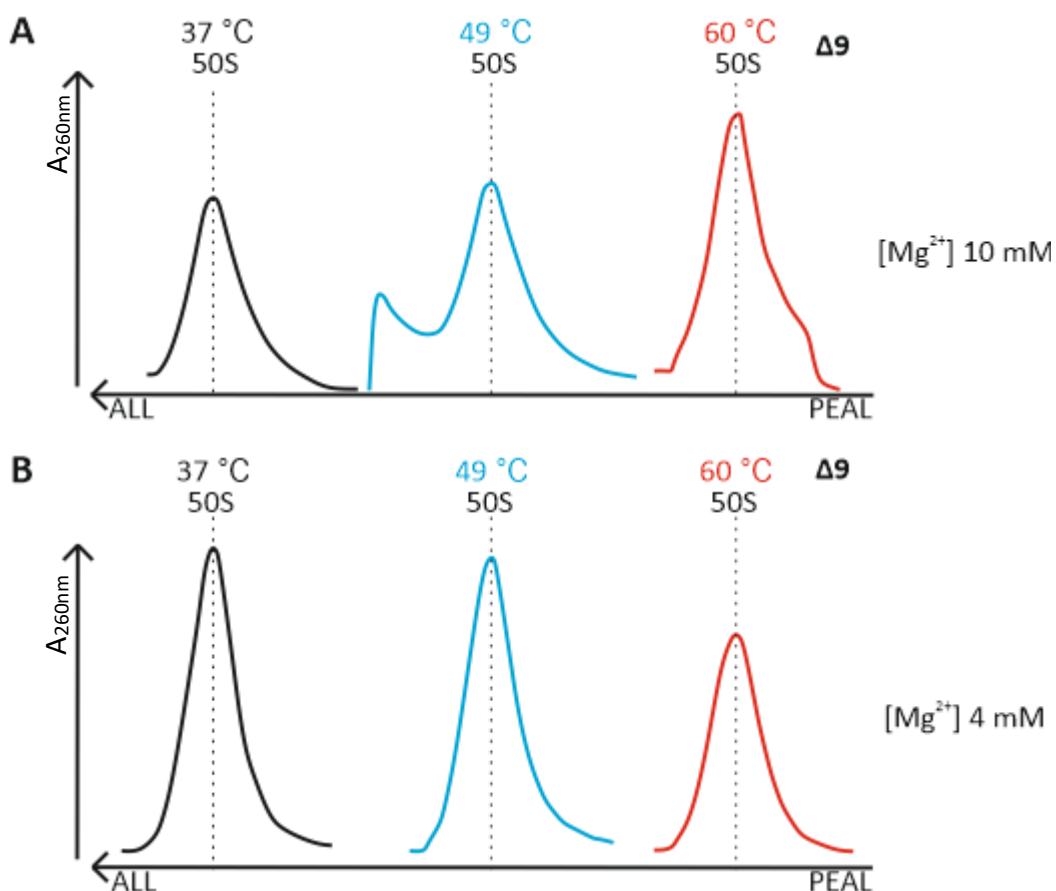
Magneesiumioonid on kriitilised rRNA negatiivselt laetud fosfaatidest koosneva selgroo elektrostaatiliselt varjestamiseks (Misra & Draper, 2001; Hsiao & Williams, 2009). 10 mM  $[Mg^{2+}]$  valiti kui *in vitro* katsetes sageli kasutatav optimaalne kontsentratsioon. 10 mM tagab ionide puuduse vältimise ja seega ribosoomide struktuurilise terviklikkuse ja maksimaalse stabiilsuse (Zitomer & Flaks, 1972). 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsiooni kasutati, et uurida RNA käitumist tingimustes, mis on endiselt RNA struktuuri stabiliseerivas millimolaarses vahemikus, kuid kus RNA võib avaldada suuremat tundlikkust teistele mõjuritele. (Draper, 2004) Seega, kasutades 10 ja 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsiooni on võimalik põhjalikumalt hinnata termilise stressi otsest mõju ja modifikatsioonide rolli RNA stabiilsusele erineva  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsiooni tingimustes.



**Joonis 11. Termiliselt töödeldud WT 50S alaühikute struktuurse terviklikkuse analüüsimine.** 5 U ( $A_{260nm}$ ) 50S alaühikuid inkubeeriti 30 minutit temperatuuridel 37 °C (must joon), 49 °C (sinine joon) ja 60 °C (punane joon). Termilise stressi läbinud ribosoomid ultratsentrifuugiti 10–25% (w/v) sahharoosigradiendis (vt 2.2.2.). **A:** Katse viidi läbi 10 mM  $[Mg^{2+}]$  juures. **B:** Katse viidi läbi 4 mM  $[Mg^{2+}]$  juures. Kriipsjoontega on märgitud 50S partiklite piikide asukohad. Tärniga on tähistatud 70S ribosoomid. Y-teljel on optiline neelduvus 260 nm juures, X-teljel on sedimentatsiooni suund.

WT 50S alaühikute hulk püsis 10 mM  $[Mg^{2+}]$  ühtlasena testitud temperatuuridel, näidates vaid marginaalset 50S alaühikute hulga vähenemist 60 °C juures (vt joonis 11, paneel A). Lisaks sisaldasid nad mõningal määral 70S ribosoomid. Seda võib seletada 50S fraktsiooni mittetäieliku homogeensusega ehk see sisaldas vähesel määral 30S alaühikuid, mis 10 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioonil reassoitsieerus 50S alaühikuga. 60 °C ja 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsiooni juures oli WT 50S alaühikute hulga vähenemine märgatavam (vt joonis 11,

paneel B).  $\Delta 9$  50S alaühikute hulk 10 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$  juures (vt joonis 12, paneel A) oli võrreldes WT tüvega sarnane, mis viitab sarnasele termostabiilsusele. See on põhjendatav sellega, et  $\Delta 9$  tüves on säilinud Um2552 modifikatsioon, mille puudumine on seotud ribosoomi biogeneesi olulise häirumisega (Ero *et al.*, 2024). Kuid 4 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$  tingimustes ilmnis  $\Delta 9$  alaühikute puhul ilmnes marginaalne alaühikute hulga vähenemine juba 49 °C juures 60 °C juures oli täheldav 50S piigi marginaalne laienemine (vt joonis 12, paneel B). Kuigi vähenenud 50S alaühikute hulk osutab nende lagunemisele, oli piisaval hulgal intaktsed alaühikuid.



**Joonis 12. Termiliselt töödeldud  $\Delta 9$  50S alaühikute struktuurse terviklikkuse analüüsimine.** 5 U ( $A_{260\text{nm}}$ ) 50S alaühikuid inkubeeriti 30 minutit temperatuuridel 37 °C (must joon), 49 °C (sinine joon) ja 60 °C (punane joon). Termilise stressi läbinud ribosoomid ultratsentrifuugiti 10–25% (w/v) sahharoosigradiendis (vt 2.2.2.). **A:** Katse viidi läbi 10 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$  juures. **B:** Katse viidi läbi 4 mM  $[\text{Mg}^{2+}]$  juures. Kriipsjoontega on märgitud 50S partiklite piikide asukohad. Tärniga on tähistatud 70S ribosoomid. Y-teljel on optiline neelduvus 260 nm juures, X-teljel on sedimentatsiooni suund.

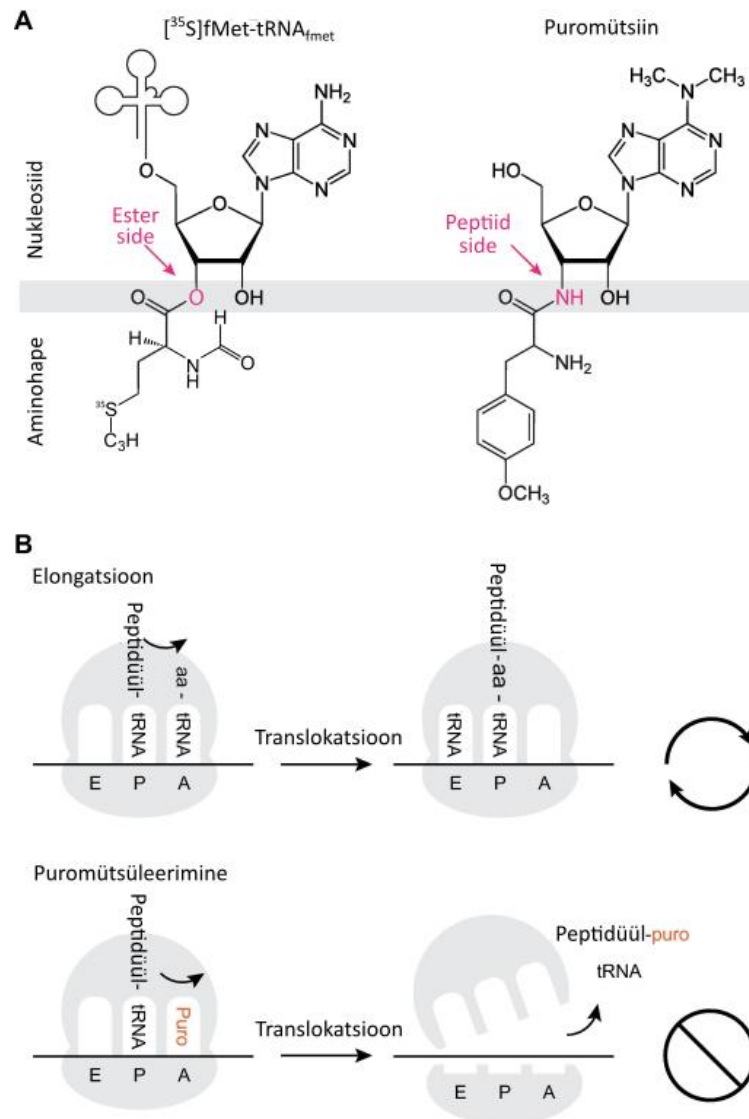
Samas on oluline märkida, et sahharoosigradiendi analüüsid peegeldavad 50S alaühiku üldist struktuurset stabiilsust ega pruugi täielikult kajastada lokaalseid muutusi PTC-s. Seega, kuigi

alaühikute üldine struktuur võib olla säilinud, ei anna see meetod täielikku pilti võimalikest muutustest PTC aktiivsuses, mida uuritakse järgnevatel katsetel.

### 2.3.3. PTA testi optimeerimine

Peptiidsideme süntees, mis toimub ribosoomi peptidüültransferaasi keskuses, on valgusünteesi fundamentaalne protsess. Selle katalüütilise aktiivsuse hindamiseks ja uurimaks, kuidas 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid seda mõjutavad, rakendati käesolevas töös *in vitro* peptidüültransferaasi aktiivsuse testi.

See test tugineb Robert Traut'i ja Robin Monro poolt 1964. aastal kirjeldatud translatsiooni faktoritest sõltumatule puromütsiinireaktsioonile ning on valitud meetodiks oma võimekuse tõttu otseselt mõõta PTC funktsionaalset aktiivsust. Testi seisneb radioaktiivselt märgistatud N-formüülmetioniini ( $[^{35}\text{S}]\text{fMet}$ ) ülekandmises doonorsubstraadilt, fMet-tRNA<sub>fmet</sub>-lt, aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) struktuurianaloogile puromütsiinile, mis seondub ribosoomi A-saiti. PTC katalüüsib seejärel peptiidsideme moodustumist P-saidis paikneva  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_{\text{fmet}}$  ja A-saiti seondunud puromütsiini vahel. Erinevalt normaalsest peptiidsidemest aa-tRNA-ga, ei ole tekkinud  $[^{35}\text{S}]\text{fMet}$ -puromütsiini produkt võimeline stabiilselt ribosoomiga seotuks jääma ning dissotsieerub, võimaldades selle ekstraheerimisel  $[^{35}\text{S}]$  signaali kvantitatiivset mõõtmist ja seeläbi PTC aktiivsuse hindamist. (vt joonis 13) (Traut & Monro, 1964, Monro 1967)



**Joonis 13. Puromütsiini struktuur ning selle funktsioon. A:** Vasakul on kujutatud  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_{\text{fmet}}$ , kus aminohape formülmetsioniin (märgistatud  $^{35}\text{S}$ -ga) on seotud tRNA terminaalse adensiini ribosijäägiga ester sideme kaudu. Paremalt on puromütsiin, mis on aminoatsüül-tRNA struktuurne analoog. Puromütsiinis on aminohappele sarnane O-metüültürosiini jääk seotud modifitseeritud adensiiniga amiidsideme (peptiidsideme) kaudu, mis on stabiilsem kui ester side. **B:** Normaalse valgusünteesi elongatsiooni käigus siseneb aa-tRNA ribosoomi A-saiti. Pärast peptiidsideme moodustumist, millega kasvav polüpeptiidahel kantakse P-saidi tRNA-lt A-saidi aa-tRNA-le, toimub translokatsioon. See protsess liigutab peptidüül-tRNA P-saiti ja vabastab A-saidi uueks aa-tRNA-ks. Puromütsüleerimise käigus seondub puromütsiin, ribosoomi A-saiti. Seal osaleb see peptiidsideme moodustumises, mille tulemusena kantakse P-saidi peptidüül-tRNA-lt kasvav polüpeptiidahel puromütsiinile, moodustades peptidüül-puromütsiini. Kuna puromütsiinil puudub translokatsiooniks ja edasiseks sidumiseks vajalik tRNA struktuur ning selle amiidsideme on stabiilne, ei saa peptidüül-puromütsiini osaleda

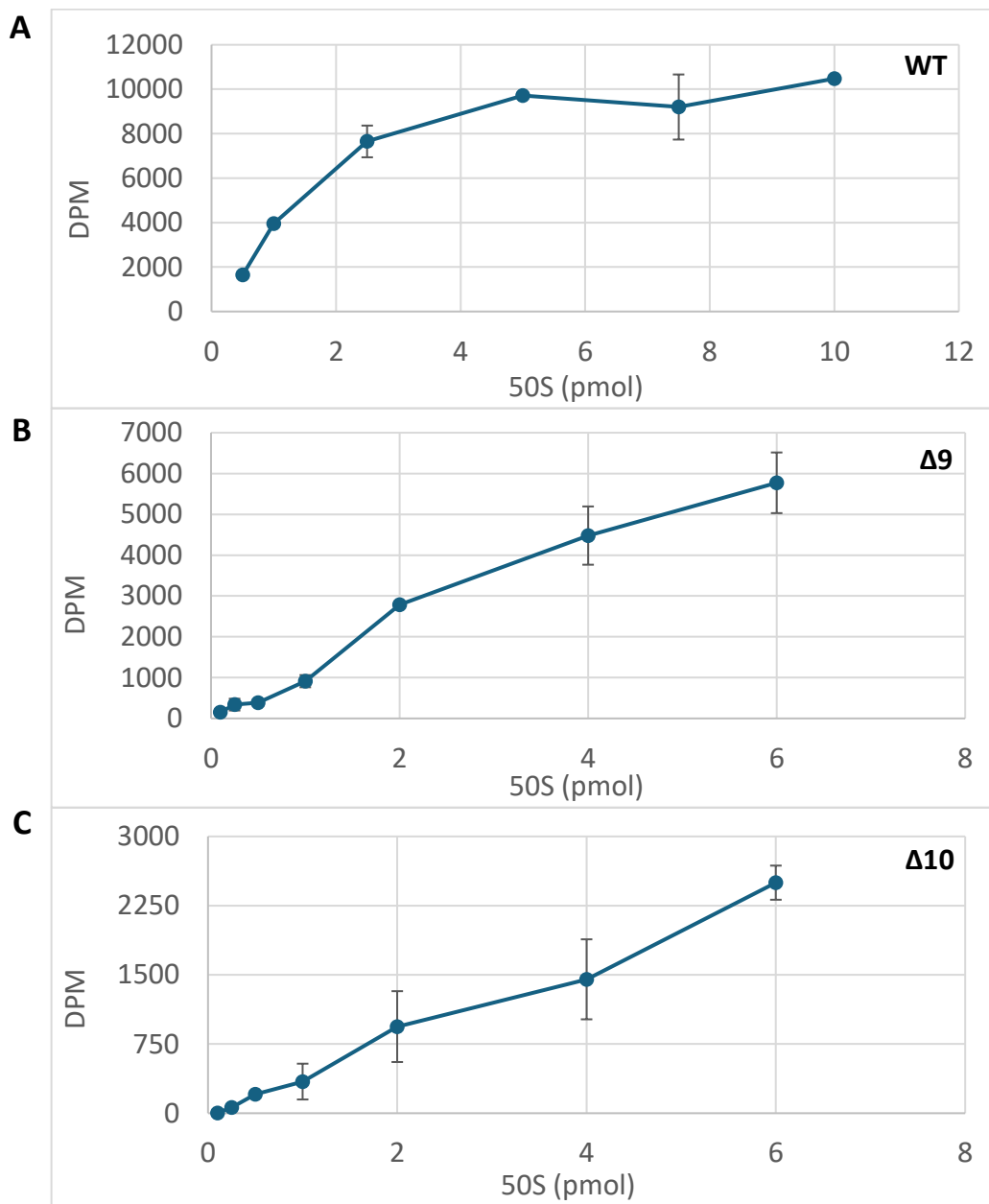
järgnevates elongatsiooni etappides. See põhjustab enneaegset translatsiooni termineerumist. (Kohandatud allikast: Aviner, 2020)

Selleks, et tagada testi maksimaalne tundlikkus ja tulemuste usaldusväärsus ning selgelt eristada modifikatsioonide võimalikku rolli PTC funktsioonis, viidi läbi PTA testi tingimuste optimeerimine. Optimeerimine keskendus kolmele olulisele reaktsiooni mõjutavale parameetrile: 50S ribosomaalse alaühiku kogus, reaktsiooniaeg ning  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioon, mis on teadaolevalt kriitilised ribosoomi struktuuri ja funktsiooni seisukohalt.

#### *2.3.3.1 Optimaalse 50S hulga määramine*

Esmalt määrati PTA testis kasutatav optimaalne WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  50S alaühikute hulk jaoks. Eesmärk oli leida kontsentratsioonivahemik, kus ensümaatiline aktiivsus on proportsionaalne 50S alaühikute hulgaga ja substraatide puromütsiini ning  $[^{35}S]fMet-tRNA_{fmet}$  kontsentratsioon ei oleks limiteerivad.

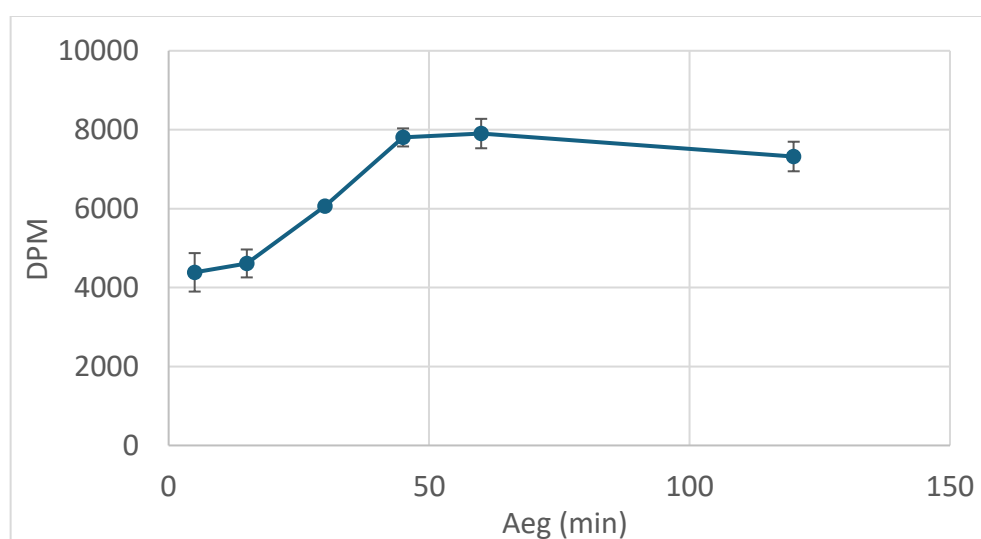
WT 50S alaühikute puhul täheldati produkti akumulierimist kuni kontsentratsioonini 5 pmol, misjärel produkti hulk jõudis platooni (vt joonis 14, paneel A).  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  mutanttüvede puhul oli produkti akumulierumine samuti kontsentratsioonist sõltuv, kuid oluliselt madalamal tasemel kui WT tüve puhul. Erinevalt WT tüvest ei jõudnud  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  tüvede produkti hulk testitud kontsentratsioonivahemikus platooni, vaid näitas jätkuvat kasvu ka kõige kõrgemate testitud 50S kontsentratsioonide juures (vt joonis 14, paneel B ja C). Edasisteks katseteks valiti 50S alaühikute kontsentratsiooniks 4 pmol reaktsiooni kohta. Valitud kontsentratsioon asub kõikide tüvede puhul lineaarses piirkonnas ja garanteerib, et signaal oleks võimalikult tugev ning substraatide puromütsiini ning  $[^{35}S]fMet-tRNA_{fmet}$  kontsentratsioon ei oleks limiteerivad. Oluline on märkida, et juba selles optimeerimise etapis ilmnes mutanttüvede ( $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$ ) väiksem aktiivsus võrreldes WT-ga, mis viitab modifikatsioonide rollile PTC funktsionaalsuses ka standardtingimustes.



**Joonis 14. PTA testi sõltuvus 50S alaühikute kogusest.** Peptidüültransferaase aktiivsuse määramiseks varieeriti 50S ribosoomi alaühikute kogust reaktsioonisegus. **A:** Reaktsioon viidi WT 50 alaühikutega kogustes 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 ja 10 pmol. **B:** Reaktsioon viidi läbi  $\Delta 9$  50S alaühikutega kogustes 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ja 6 pmol. **C:** Reaktsioon viidi läbi  $\Delta 10$  50S alaühikutega kogustes 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ja 6 pmol. Reaktsioonisegud sisaldasid lisaks varieeritavale 50S kogusele  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-tRNA}_{\text{fmet-i}}$  (5000 cpm/pmol) ja 1 mM puromütsiini. Pärast 30 minutilist eelinkubatsiooni 37°C juures (ilma metanoolita), käivitati reaktsioon 37,5% (v/v) metanooli lisamisega ja inkubeeriti 30 minutit 30°C juures. Reaktsioon peatati 10 M KOH-ga (inkubeeriti 15 min 42°C juures). Produkt,  $[^{35}\text{S}]\text{fMet-puromütsiin}$ , ekstraheeriti etüülatsetaati ja kvantifitseeriti vedeliktsintillatsiooniloenduriga. Y-teljel on radioaktiivse produkti teke (DPM), X-teljel on kasutatud 50S alaühikute kogus (pmol). n=2

### 2.3.3.2. Optimaalse reaktsiooniaja määramine

Järgmisena optimeeriti PTA reaktsiooniaeg, kasutades 4 pmol WT 50S alaühikuid (vt joonis 15). Tulemused näitasid, et peptidüültransferaasi aktiivsus kasvas ajas, saavutades maksimumi 45-60 minuti möödudes, misjärel aktiivsuse tõus saavutas platoo. Edasisteks katseteks valiti reaktsiooniajaks 60 minutit, sest see tagas ensüümi produkti piisava hulga usaldusväärseks kvantifitseerimiseks.

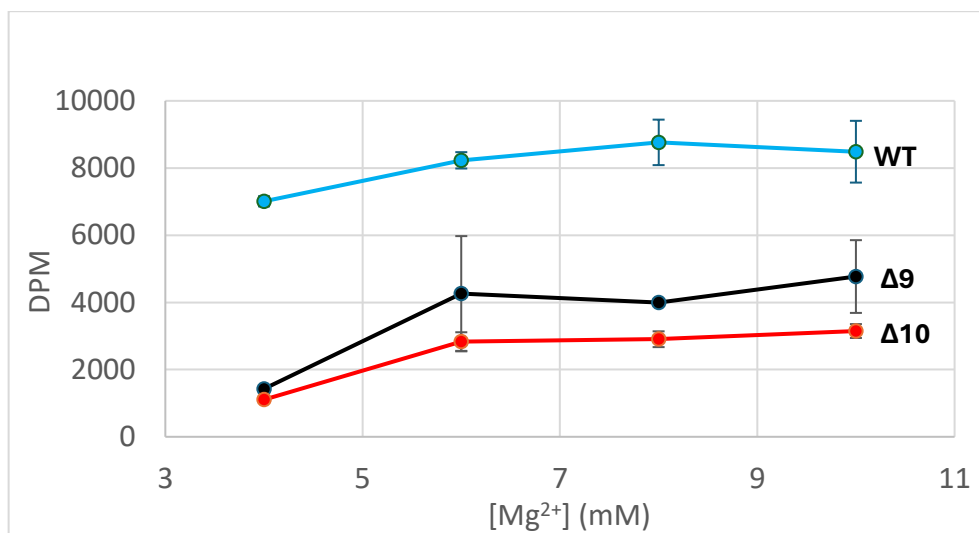


**Joonis 15. PTA testi sõltuvus reaktsiooniajast.** PTA test viidi läbi vastavalt meetodikale kirjeldatud joonise X (lk 34) juures, kasutades 4 pmol WT 50S alaühikuid. Reaktsiooni ajapunktideks oli 5, 15, 30, 45, 60 ja 120 minutit. Y-teljel on radioaktiivse produkti teke (DPM), X-teljel on reaktsiooniaeg (min). n=2

### 2.3.3.3. Optimaalse $[Mg^{2+}]$ kontsentratsiooni määramine

$[Mg^{2+}]$  kontsentratsioon on kriitilise tähtsusega ribosoomi struktuuri ja PTC funktsiooni jaoks. Seetõttu määrati optimaalne  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioon PTA testis WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  tüvede 50S alaühikutele. WT ribosoomide puhul täheldati optimaalset aktiivsust vahemikus 6-10 mM  $[Mg^{2+}]$  ja marginaalset langust 4 mM  $[Mg^{2+}]$  juures.  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  mutanttüvede ribosoomid näitasid üldiselt madalamat aktiivsust kõikidel testitud  $[Mg^{2+}]$  tasemetel, kuid nende aktiivsus oli samuti kõrgem 6-10 mM  $[Mg^{2+}]$  juures võrreldes 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioonil. (vt joonis 16) Tulemused on kooskõlas varasemate andmetega, et magneesiumioonid on kriitilised ribosoomi katalüütilise keskuse korrektse struktuuri ja funktsiooni tagamiseks (Klein *et al.*, 2004; Draper, 2004). Erinevused mutantide ja WT vahel võivad viidata sellele, et

modifikatsioonide puudumine mõjutab ribosoomi interaktsiooni magneesiumioonidega. Seega, PTA test ei ole uuritud tingimustes magneesiumist oluliselt sõltuv.



**Joonis 16. PTA testi sõltuvus [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonist.** PTA test viidi läbi vastavalt meetodikale kirjeldatud joonise X (lk 34) juures, kasutades 4 pmol WT (sinine), Δ9 (must) või Δ10 (must) 50S alaühikuid ja reaktsiooniajaks valiti 60 minutit. Katses varieeriti [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni (4, 6, 8 ja 10 mM). Y-teljel on radioaktiivse produkti teke (DPM), X-teljel on [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioon (mM). n=2

#### 2.3.3.4. Modifikatsioonide üldine mõju PTC aktiivsusele PTA testides

Võrreldes WT, Δ9 ja Δ10 tüvede 50S alaühikute PTC aktiivsust erinevates reaktsiooni tingimustes ilmnes selge trend. Δ9 tüve ribosoomide aktiivsus oli oluliselt madalam kui WT ribosoomidel. Δ10 tüve, millel on lisaks Δ9 deletsioonidele ka rlmE geeni deletsioon (mis kodeerib Um2552 metülaasi), aktiivsus oli omakorda veelgi madalam kui Δ9 tüvel. Need tulemused näitavad, et uuritavatel modifikatsioonidel on kumulatiivne positiivne mõju PTC aktiivsusele. Paljud neist modifikatsioonidest (vt tabel 1) asuvad PTC keskuse läheduses või on selle funktsioneerimisega seotud piirkondades. Nende puudumine võib otseselt häirida peptidüültransferaasi katalüütilist mehhanismi, substraatide (tRNA-de) korrektset seondumist või positsioneerimist A- ja P-saitidel, või mõjutada ribosoomi dünaamikat translatsioonil. Varasemad uuringud on samuti näidanud, et modifikatsioonide kadumine PTC-s pärsib valgusünteesi ja rakkude kasvu (Leppik *et al.*, 2024) ning mõjutab ribosoomi biogeneesi ja aktiivsust (Ero *et al.*, 2024). Seega kinnitavad saadud tulemused, et 23S rRNA

modifikatsioonide puudumine  $\Delta 9$  ja eriti  $\Delta 10$  tüvedes vähendab oluliselt 50S alaühikute PTC aktiivsust.

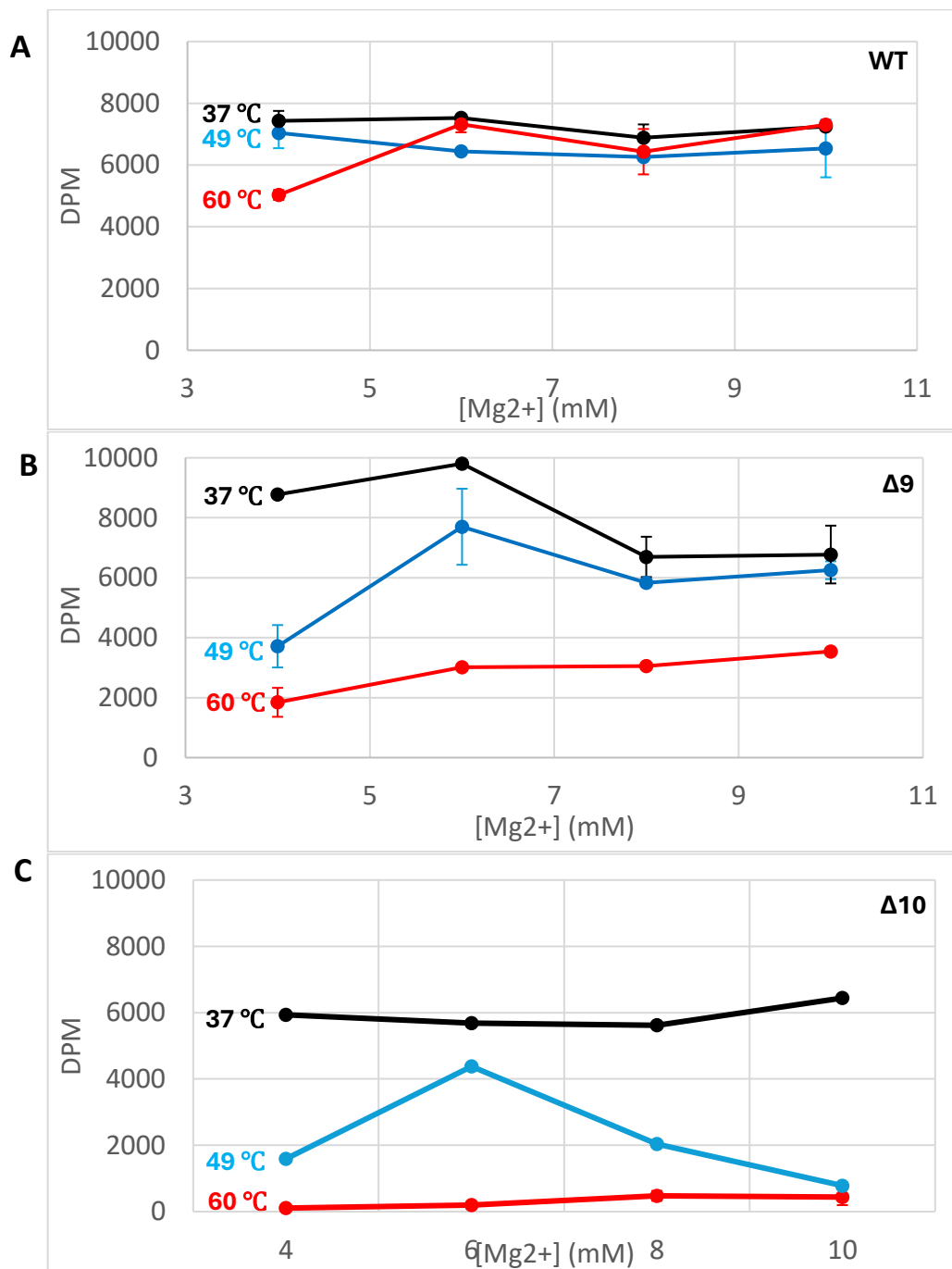
#### 2.3.4. Termiliselt töödeldud 50S alaühikute aktiivsus

Et hinnata modifikatsioonide rolli ribosoomi termostabiilsuses, uuriti erinevatel  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioonidel termilise stressi mõju WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  50S alaühikute PTC aktiivsusele PTA testis (vt joonis 17). Ribosoomi struktuuri ja funktsiooni stabiilsus, sealhulgas termiline stabiilsus, on valgusünteesi täpsuse ja efektiivsuse tagamiseks oluline. rRNA modifikatsioonid, mis on sageli koondunud ribosoomi funktsionaalselt olulistesse piirkondadesse nagu PTC, mängivad olulist rolli rRNA õiges voltumises, struktuuri stabiliseerimises ja ribosoomi biogeneesil (Decatur & Fournier, 2002). On näidatud, et RNA modifikatsioonid, nagu pseudouridüleerimine ja 2'-O-metüleerimine, võivad suurendada RNA termilist stabiilsust ja mõjutada ribosoomi konformatsioonilist paindlikkust (Davis, 1995; Kawai *et al.*, 1992). Magneesiumioonid on samuti olulised ribosoomi struktuuri stabiliseerimiseks, neutraliseerides rRNA negatiivselt laetud fosfaatrühmade tõukumist ja soodustades korrektset voltumist (Misra & Draper, 2001; Hsiao & Williams, 2009). Seetõttu võib modifikatsioonide puudumine muuta ribosoomid tundlikumaks magneesiumioonide kontsentratsiooni muutuste ja termilise stressi suhtes, mis omakorda võib mõjutada PTC katalüütilist aktiivsust (Ero *et al.*, 2024). Varasemad uuringud on näidanud, et mitmete 23S rRNA modifikatsioonide puudumine, eriti PTC piirkonnas, võib põhjustada ribosoomi koostamise defekte ja vähendada peptidüültransferaasi aktiivsust, eriti madalamatel temperatuuridel. (Ero *et al.*, 2024; Leppik *et al.*, 2024) Käesolevas töös uuritaksegi nende faktorite koosmõju, hinnates modifikatsioonide panust 50S alaühiku termostabiilsusesse ja funktsionaalsusesse erinevates magneesiumioonide kontsentratsioonides.

WT 50S alaühikud näitasid pärast inkubeerimist ootuspäraselt läbivalt kõrget aktiivsust. Siiski täheldati 60 °C juures ja 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioonil aktiivsuses marginaalset langust (vt joonis 17). See tähelepanek on kooskõlas termiliselt töödeldud WT ribosoomide varasema profiiliga (vt joonis 17, paneel A).  $\Delta 9$  tüve 50S alaühikud olid termilisele stressile oluliselt tundlikumad. 37 °C on aktiivsus võrreldav WT aktiivsusega. Pärast 49 °C inkubeerimist langes

$\Delta 9$  aktiivsus drastiliselt 4 mM  $[Mg^{2+}]$  kontsentratsioonil. 60 °C juures oli  $\Delta 9$  ribosoomide aktiivsus läbivalt madalam võrreldes teiste temperatuuridega ja 4 mM  $[Mg^{2+}]$  on mõju PTC aktiivsusele kõige suurem. (vt joonis 17, paneel B)

$\Delta 10$  tüve 50S alaühikud osutusid kõige termotundlikumaks. Nende aktiivsus 37 °C juures oli juba marginaalselt madalam võrreldes WT ja  $\Delta 9$ -ga. Pärast 49 °C ja 60 °C inkubeerimist oli aktiivsus oluliselt madal (vt joonis 17, paneel C). Need tulemused näitavad selgelt, et 23S rRNA modifikatsioonid on kriitilise tähtsusega mitte ainult ribosoomi struktuurilise stabiilsuse (nagu näidatud sahharoosiprofiilidega), vaid ka selle funktsionaalse aktiivsuse säilitamiseks termilise stressi tingimustes. WT ribosoomide puhul, kuid mutanttüvede puhul oli see efekt oluliselt väiksem, mis viitab modifikatsioonide otsesele rollile ribosoomi struktuuri stabiliseerimisel kõrgematel temperatuuridel. Modifikatsioonid võivad lokaalselt stabiliseerida rRNA struktuuri või mõjutada veemolekulide paiknemist RNA ümber, mis aitavad kaasa kõrgema struktuuri säilimisele kõrgematel temperatuuridel. Kokkuvõttes on modifitseerimata ribosoomid ( $\Delta 9$ ,  $\Delta 10$ ) oluliselt tundlikumad termilisest stressist tingitud PTC aktiivsuse kaotusele, mis rõhutab modifikatsioonide rolli ribosoomi termostabiilsuses.



**Joonis 17. Termilise stressi läbinud 50S alaühikute PTC aktiivsuse sõltuvus [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioonist.** WT (A), Δ9 (B) või Δ10 (C) 50S alaühikuid (4 pmol) eelinkubeeriti 30 minutit erinevatel temperatuuridel (37 °C – must joon; 49 °C – sinine joon; 60 °C – punane joon). Seejärel viidi läbi PTA test vastavalt meetodikale kirjeldatud joonise X (lk 34) juures, reaktsioonijaga 60 minutit ning varieerides [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsiooni (4, 6, 8 ja 10 mM). Y-teljel on radioaktiivse produkti teke (DPM), X-teljel on [Mg<sup>2+</sup>] kontsentratsioon (mM). n=2

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas selgusid mitmed olulised tulemused 23S rRNA modifikatsioonide rolli kohta. Esiteks, modifikatsioonide puudumine, eriti  $\Delta 10$  tüves, häiris oluliselt ribosoomide biogeneesi, mida näitas vabade alaühikute kuhjumine. Teiseks, modifikatsioonideta 50S alaühikud ( $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$ ) olid termiliselt vähem stabiilsed. Kolmandaks, optimeeritud *in vitro* PTA testid demonstreerisid, et modifikatsioonide puudumine vähendas märkimisväärselt 50S alaühikute peptidüültransferaasid aktiivsust, kusjuures  $\Delta 10$  tüvi oli kõige enam mõjutatud ning termiline stress süvendas aktiivsuse kadu. Need leiud viitavad modifikatsioonide tähtsusele ribosoomi struktuurse terviklikkuse ja funktsionaalse aktiivsuse säilitamisele.

Käesolev uurimistöö lõi *in vitro* süsteemi 23S rRNA modifikatsioonide rolli hindamiseks ribosoomi stabiilsuses ja funktsioonis. Edasised uuringud keskenduvad üksikute modifikatsioonide panuse uurimisele PTC-s, et selgitada nende spetsiifilisi mõju ribosoomi biogeneesis, struktuuri stabiliseerimisel ja katalüütilises aktiivsuses. Lisaks saab arendatud *in vitro* süsteemi laiendada rRNA modifikatsioonide ja ribosoomi sihtivate antibiootikumide koosmõju uurimiseks.

## Kokkuvõte

Ribosoomi rRNA modifikatsioonid mängivad olulist rolli ribosoomide struktuuri korrektusel voltumisel, stabiilsusel ja funktsioneerimisel. Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja töötada ja optimeerida *in vitro* testsüsteem, mis võimaldaks edaspidi uurida spetsiifiliste *E. coli* 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide mõju 50S ribosoomi alaühiku PTC funktsionaalsele aktiivsusele. Selle eesmärgi saavutamiseks analüüsiti WT,  $\Delta 9$  ja  $\Delta 10$  *E. coli* tüvedest eraldatud 50S alaühikuid.

Käesoleva töö olulisemad järeldused on järgmised:

- 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide puudumine, eelkõige  $\Delta 10$  puhul, põhjustab olulisi defekte ribosoomide biogeneesis. See väljendus vabade 50S ja 30S alaühikute akumulereerumises ning funktsionaalsete 70S ribosoomide hulga märkimisväärses vähenemises.
- Töötati välja ja optimeeriti *in vitro* PTA test edasiteks katseteks. Selleks määrati reaktsiooniks optimaalsed 50S alaühiku kogused, reaktsiooniajad ja magneesiumioonide kontsentratsioonid
- Sahharoosigradiendi profileerimisega hinnati 50S alaühikute termostabiilsust.
  - WT 50S alaühikud osutusid termiliselt stabiilseteks.
  - $\Delta 9$  ja eriti  $\Delta 10$  alaühikud näitasid suuremat tundlikust temperatuurile madalama magneesiumioonide kontsentratsiooni (4 mM) juures.
- 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide puudumine vähendas oluliselt 50S alaühikute peptidüültransferaasid aktiivsust võrreldes WT-ga.  $\Delta 10$  ribosoomide katalüütiline aktiivsus oli madalam kui  $\Delta 9$  tüvel.
- Termilise stressi läbinud  $\Delta 9$  ja eriti  $\Delta 10$  50S alaühikute PTA aktiivsus langes drastilisemalt kui WT alaühikutel, eriti madalamatel magneesiumioonide kontsentratsioonidel.

Kokkuvõttes näitasid töö tulemused, et 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid aitavad säilitada *E. coli* 50S ribosoomi alaühiku struktuurilist ja funktsionaalset stabiilsust, eriti stressitingimustes. Väljatöötatud *in vitro* süsteem võimaldab edaspidi täpsemalt uurida üksikute rRNA modifikatsioonide panust ribosoomi funktsiooni.

# Resümee

## The part of 23S rRNA modifications in the stabilization of ribosome structure

Andres Reintam

### Summary

Ribosomes are essential macromolecular machines responsible for protein synthesis in all living organisms. Their precise function and structural integrity are crucial, and post-transcriptional modifications of rRNA play a significant role in these aspects. These modifications, particularly in functionally important regions like the peptidyl transferase center (PTC), can influence ribosome biogenesis, stability, and catalytic activity (Ero *et al.*, 2024; Leppik *et al.*, 2024; Liang *et al.*, 2007). The primary aim of this thesis was to develop and optimize an *in vitro* test system to assess the impact of 23S rRNA V domain modifications on the functional activity of the peptidyl transferase center in the *E. coli* 50S ribosomal subunit.

To investigate these aspects, wild-type (WT) *E. coli* strains and mutant strains ( $\Delta 9$  and  $\Delta 10$ ), the latter lacking multiple 23S rRNA modifications in domain V (Ero *et al.*, 2024), were used. 70S ribosomes and 50S subunits were isolated and purified from these strains. The biogenesis of ribosomes was initially assessed by sucrose gradient profiling.

This revealed that the absence of modifications, particularly in the  $\Delta 10$  strain (lacking an additional Um2552 modification compared to  $\Delta 9$ ), led to significant defects in ribosome assembly, characterized by an accumulation of free 30S and 50S subunits and a reduction in 70S ribosomes. These observations are consistent with previous studies highlighting the impact of specific modifications like Um2552 and the cumulative effect of multiple missing modifications on ribosome assembly and maturation (Bügl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2015; Ero *et al.*, 2024). The thermostability of isolated 50S subunits was then examined under different temperatures (37°C, 49°C, and 60°C) and magnesium ion concentrations (4 mM and 10 mM [Mg<sup>2+</sup>]) using sucrose gradient centrifugation. While WT 50S subunits remained relatively stable, the  $\Delta 9$  and particularly the  $\Delta 10$  subunits showed

increased sensitivity to thermal stress, especially at lower  $[Mg^{2+}]$  concentrations, indicating that these rRNA modifications contribute to the structural integrity of the 50S subunit.

Furthermore, the peptidyl transferase activity of the 50S subunits was assessed using the developed *in vitro* puromycin reaction (PTA test), a method established for measuring PTC functional activity independent of translation factors (Traut & Monro, 1964; Monro, 1967). The PTA test conditions, including 50S subunit concentration, reaction time, and  $[Mg^{2+}]$  concentration, were optimized. The results demonstrated that the absence of 23S rRNA modifications significantly impaired the catalytic activity of the PTC. The  $\Delta 9$  and  $\Delta 10$  mutant subunits exhibited considerably lower activity compared to WT. When subjected to heat stress prior to the PTA assay, the activity of modification-deficient 50S subunits ( $\Delta 9$  and especially  $\Delta 10$ ) decreased more dramatically than that of WT subunits, particularly at lower  $[Mg^{2+}]$  concentrations.

## Kasutatud allikate loetelu

Abou Assi, H., Rangadurai, A. K., Shi, H., Liu, B., Clay, M. C., Erharter, K., ... & Al-Hashimi, H. M. (2020). 2'-O-Methylation can increase the abundance and lifetime of alternative RNA conformational states. *Nucleic acids research*, *48*(21), 12365-12379.

Adams, J. M., & Capecchi, M. R. (1966). N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *55*(1), 147-155.

Antoun, A., Pavlov, M. Y., Andersson, K., Tenson, T., & Ehrenberg, M. (2003). The roles of initiation factor 2 and guanosine triphosphate in initiation of protein synthesis. *The EMBO journal*.

Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(34), E4707-E4716.

Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 1074-1083.

Ayadi, L., Galvanin, A., Pichot, F., Marchand, V., & Motorin, Y. (2019). RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(3), 253-269.

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

Brosius, J., Dull, T. J., & Noller, H. F. (1980). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(1), 201-204.

Brownlee, G. G., Sanger, F., & Barrell, B. G. (1967). Nucleotide sequence of 5 S-ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nature*, *215*(5102), 735-736.

- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., ... & Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Molecular cell*, 6(2), 349-360.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., & Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of Escherichia coli is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16414-16419.
- Cappannini, A., Ray, A., Purta, E., ... & Bujnicki, J. M. (2024). MODOMICS: a database of RNA modifications and related information. 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D239-D244.
- Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. Ja Ebel, J. P. (1978). Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and EBEL, J.P., 1979. „The Complete Nucleotide Sequence of the Ribosomal 16-S RNA from Escherichia coli: Experimental Details and Cistron Heterogeneities.“ *European Journal of Biochemistry*, 100(2), 1k 399-410.
- Cohn, W. E., & Volkin, E. (1951). Nucleoside-5'-phosphates from ribonucleic acid. *Nature*, 167(4247), 483-484.
- Davis, D. R. (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research*, 23(24), 5020-5026.
- Davis, F. F., & Allen, F. W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *J Biol Chem*, 227(2), 907-915.
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344-351.
- Draper, D. E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *Rna*, 10(3), 335-343.
- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S. E., ... & Diaz, J. J. (2017). Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(49), 12934-12939.

- Ero, R., Leppik, M., Reier, K., Liiv, A., & Remme, J. (2024). Ribosomal RNA modification enzymes stimulate large ribosome subunit assembly in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, *52*(11), 6614-6628.
- Farewell, A., & Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *180*(17), 4704-4710.
- Flessel, C. P., Ralph, P., & Rich, A. (1967). Polyribosomes of growing bacteria. *Science*, *158*(3801), 658-660.
- Frank, J., & Agrawal, R. K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, *406*(6793), 318-322.
- Freistoffer, D. V., Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., & Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *The EMBO journal*.
- Frolova, L. Y., Tsvikovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., ... & Kisselev, L. L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *Rna*, *5*(8), 1014-1020.
- Galardi, S., Fatica, A., Bachi, A., Scaloni, A., Presutti, C., & Bozzoni, I. (2002). Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. *Molecular and cellular biology*, *22*(19), 6663-6668.
- Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., ... & Kirpekar, F. (2009). Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria. *Rna*, *15*(2), 327-336.
- Green, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual review of biochemistry*, *66*(1), 679-716.
- Grigoriadou, C., Marzi, S., Pan, D., Gualerzi, C. O., & Cooperman, B. S. (2007). The translational fidelity function of IF3 during transition from the 30 S initiation complex to the 70 S initiation complex. *Journal of molecular biology*, *373*(3), 551-561.

Gromadski, K. B., Wieden, H. J., & Rodnina, M. V. (2002). Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry*, *41*(1), 162-169.

Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R., & Weiss, S. (1996). Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(13), 6264-6268.

Hindennach, I., Kaltschmidt, E., & Wittmann, H. G. (1971). Ribosomal Proteins: Isolation of Proteins from 50 S Ribosomal Subunits of Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, *23*(1), 12-16.

Hirashima, A., & Kaji, A. (1972). Factor-dependent release of ribosomes from messenger RNA: requirement for two heat-stable factors. *Journal of molecular biology*, *65*(1), 43-58.

Hori, H., Kawamura, T., Awai, T., Ochi, A., Yamagami, R., Tomikawa, C., & Hirata, A. (2018). Transfer RNA modification enzymes from thermophiles and their modified nucleosides in tRNA. *Microorganisms*, *6*(4), 110.

Horie, N., Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, K., Kuchino, Y., Nishimura, S., & Miyazawa, T. (1985). Two tRNA<sup>Ile</sup> species from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: Effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA. *Biochemistry*, *24*(21), 5711-5715.

Hsiao, C., & Williams, L. D. (2009). A recurrent magnesium-binding motif provides a framework for the ribosomal peptidyl transferase center. *Nucleic Acids Research*, *37*(10), 3134-3142.

Höfler, S., & Carlomagno, T. (2020). Structural and functional roles of 2'-O-ribose methylations and their enzymatic machinery across multiple classes of RNAs. *Current opinion in structural biology*, *65*, 42-50.

Kaji, A., & Hirokawa, G. (2000). Ribosome-recycling factor: an essential factor for protein synthesis. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*, 527-539.

- Kaltschmidt, E. T., & Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal proteins. VII: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Analytical biochemistry*, *36*(2), 401-412.
- Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H., & Ehrenberg, M. (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Molecular cell*, *3*(5), 601-609.
- Kawai, G., Yamamoto, Y., Kamimura, T., ... & Yokoyama, S. (1992). Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry*, *31*(4), 1040-1046.
- Kiss, T. (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *Journal of cell science*, *117*(25), 5949-5951.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M., & Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, *85*(7), 1077-1088.
- Klein, D. J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2004). The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *Rna*, *10*(9), 1366-1379.
- Krogh, N., Jansson, M. D., Häfner, S. J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., ... & Nielsen, H. (2016). Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic acids research*, *44*(16), 7884-7895.
- Lang, K., Erlacher, M., Wilson, D. N., Micura, R., & Polacek, N. (2008). The role of 23S ribosomal RNA residue A2451 in peptide bond synthesis revealed by atomic mutagenesis. *Chemistry & Biology*, *15*(5), 485-492.
- Leppik, M., Pomerants, L., Põldes, A., Mihkelson, P., Remme, J., & Tamm, T. (2024). Loss of Conserved rRNA Modifications in the Peptidyl Transferase Center Leads to Diminished Protein

Synthesis and Cell Growth in Budding Yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5194.

Li, Y., Yi, Y., Gao, X., Wang, X., Zhao, D., Wang, R., ... & Chen, K. (2024). 2'-O-methylation at internal sites on mRNA promotes mRNA stability. *Molecular cell*, 84(12), 2320-2336.

Liang, X. H., Liu, Q., & Fournier, M. J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular cell*, 28(6), 965-977.

Liu, Q., & Fredrick, K. (2016). Intersubunit bridges of the bacterial ribosome. *Journal of molecular biology*, 428(10), 2146-2164.

Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, Ü., & Remme, J. (2005). Analysis of the function of E. coli 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC molecular biology*, 6, 1-9.

Maden, B. E. H. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 39, 241-303.

Marchand, V., Blanloeil-Oillo, F., Helm, M., & Motorin, Y. (2016). Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA. *Nucleic acids research*, 44(16), e135-e135.

McCarthy, B. J. (1962). The effects of magnesium starvation on the ribosome content of Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*, 55(6), 880-889.

Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792.

Mengel-Jørgensen, J., & Kirpekar, F. (2002). Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry. *Nucleic acids research*, 30(23), e135-e135.

Milón, P., & Rodnina, M. V. (2012). Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 47(4), 334-348.

Misra, V. K., & Draper, D. E. (2001). A thermodynamic framework for Mg<sup>2+</sup> binding to RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(22), 12456-12461.

Monaco, P. L., Marcel, V., Diaz, J. J., & Catez, F. (2018). 2'-O-methylation of ribosomal RNA: towards an epitranscriptomic control of translation?. *Biomolecules*, *8*(4), 106.

Monro, R. E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, *26*(1), 147-151.

Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L., & Strobel, S. A. (2000). A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science*, *289*(5481), 947-950.

Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M., ... & Scheres, S. H. (2020). Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*, *587*(7832), 152-156.

Nance, K. D., & Meier, J. L. (2021). Modifications in an emergency: the role of N1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS central science*, *7*(5), 748-756.

Nierhaus, K. H., & Dohme, F. (1974). Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *71*(12), 4713-4717.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, *289*(5481), 920-930.

Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F., & Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, EF-Tu, and a GTP analog. *Science*, *270*(5241), 1464-1472.

Nissley, A. J., Penev, P. I., Watson, Z. L., Banfield, J. F., & Cate, J. H. (2023). Rare ribosomal RNA sequences from archaea stabilize the bacterial ribosome. *Nucleic Acids Research*, *51*(4), 1880-1894.

Noeske, J., Wasserman, M. R., Terry, D. S., Altman, R. B., Blanchard, S. C., & Cate, J. H. (2015). High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome. *Nature structural & molecular biology*, *22*(4), 336-341.

- Noller, H. F., Hoffarth, V., & Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256(5062), 1416-1419.
- Näslund, P. H., & Hultin, T. (1970). Effects of potassium deficiency on mammalian ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 204(1), 237-247.
- Ohira, T., Minowa, K., Sugiyama, K., Yamashita, S., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., ... & Suzuki, T. (2022). Reversible RNA phosphorylation stabilizes tRNA for cellular thermotolerance. *Nature*, 605(7909), 372-379.
- Ohira, T., & Suzuki, T. (2024). Transfer RNA modifications and cellular thermotolerance. *Molecular Cell*, 84(1), 94-106.
- Peske, F., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2005). Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Molecular cell*, 18(4), 403-412.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hsiao, C., ... Williams, L. D. (2014). Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10251-10256.
- Poole, E., & Tate, W. (2000). Release factors and their role as decoding proteins: specificity and fidelity for termination of protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1493(1-2), 1-11.
- Rheinberger, H. J., Sternbach, H., & Nierhaus, K. H. (1981). Three tRNA binding sites on Escherichia coli ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5310-5314.
- Rodnina, M. V., Fricke, R., Kuhn, L., & Wintermeyer, W. (1995). Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. *The EMBO journal*, 14(11), 2613.
- Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., & Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, 385(6611), 37-41.

- Ron, E. Z., Kohler, R. E., & Davis, B. D. (1968). Magnesium ion dependence of free and polysomal ribosomes from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 36(1), 83-89.
- Rößler, P., Mathieu, D., & Gossert, A. D. (2020). Enabling NMR Studies of High Molecular Weight Systems Without the Need for Deuteration: The XL-ALSOFAST Experiment with Delayed Decoupling. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(43), 19329-19337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2, pp. xxxviii+-1546).
- Sas-Chen, A., Thomas, J. M., Matzov, D., Taoka, M., Nance, K. D., Nir, R., ... & Schwartz, S. (2020). Dynamic RNA acetylation revealed by quantitative cross-evolutionary mapping. *Nature*, 583(7817), 638-643.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., & Nirenberg, M. (1968). Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 768-774.
- Shasmal, M., Chakraborty, B., & Sengupta, J. (2010). Intrinsic molecular properties of the protein-protein bridge facilitate ratchet-like motion of the ribosome. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(2), 192-197.
- 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*, 71(4), 1342-1346.
- Spirin, A. S. (1969). A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 34, pp. 197-207). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Streit, J. O., Bukvin, I. V., Chan, S. H. S., ... Christodoulou, J. (2024). The ribosome lowers the entropic penalty of protein folding. *Nature*, 633(8028), 232-239.
- Subramanian, A. R., & Davis, B. D. (1970). Activity of initiation factor F3 in dissociating *Escherichia coli* ribosomes. *Nature*, 228(5278), 1273-1275.

- Svedberg, T., & Nichols, J. B. (1923). Determination of size and distribution of size of particle by centrifugal methods. *Journal of the American Chemical Society*, 45(12), 2910-2917.
- Zitomer, R. S., & Flaks, J. G. (1972). Magnesium dependence and equilibrium of the Escherichia coli ribosomal subunit association. *Journal of Molecular Biology*, 71(2), 263-279.
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., ... & Isobe, T. (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic acids research*, 46(18), 9289-9298.
- Traub, P., & Nomura, M. (1968). Structure and function of E. coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(3), 777-784.
- Traut, R. R., & Monro, R. E. (1964). The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *Journal of molecular biology*, 10(1), 63-72.
- Tsai, K., Stojković, V., Noda-Garcia, L., Young, I. D., Myasnikov, A. G., Kleinman, J., ... & Fujimori, D. G. (2022). Directed evolution of the rRNA methylating enzyme Cfr reveals molecular basis of antibiotic resistance. *Elife*, 11, e70017.
- WADA, A., & SAKO, T. (1987). Primary structures of and genes for new ribosomal proteins A and B in Escherichia coli. *The Journal of Biochemistry*, 101(3), 817-820.
- Wang, W., Li, W., Ge, X., Yan, K., Mandava, C. S., Sanyal, S., & Gao, N. (2020). Loss of a single methylation in 23S rRNA delays 50S assembly at multiple late stages and impairs translation initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(27), 15609-15619.
- Watson, Z. L., Ward, F. R., Méheust, R., Ad, O., Schepartz, A., Banfield, J. F., & Cate, J. H. (2020). Structure of the bacterial ribosome at 2 Å resolution. *elife*, 9, e60482.
- Wahba, A. J., Iwasaki, K., Miller, M. J., Sabol, S., Sillero, M. A., & Vasquez, C. (1969, January). Initiation of Protein Synthesis in Escherichia coli, II. Role of the Initiation Factors in Polypeptide

Synthesis. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 34, pp. 291-299). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yanofsky, C., & Ito, J. (1966). Nonsense codons and polarity in the tryptophan operon. *Journal of Molecular Biology*, *21*(2), 313-334.

Yildirim, I., Kierzek, E., Kierzek, R., & Schatz, G. C. (2014). Interplay of LNA and 2'-O-methyl RNA in the structure and thermodynamics of RNA hybrid systems: a molecular dynamics study using the revised AMBER force field and comparison with experimental results. *The journal of physical chemistry B*, *118*(49), 14177-14187.

Yokoyama, S., Watanabe, K., & Miyazawa, T. (1987). Dynamic structures and functions of transfer ribonucleic acids from extreme thermophiles. *Advances in biophysics*, *23*, 115-147.

Young, R., & Bremer, H. (1976). Polypeptide-chain-elongation rate in *Escherichia coli* B/r as a function of growth rate. *Biochemical Journal*, *160*(2), 185-194.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *science*, *292*(5518), 883-896.

# Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Andres Reintam,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „23S rRNA modifikatsioonide osa ribosoomide struktuuri stabiliseerimisel“, mille juhendaja on PhD Aivar Liiv, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguste 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 intellektuaalomandit ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Andres Reintam 26.05.2025