

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
Molekulaarbioloogia õppetool

Kaspar Reier

**VABANEMISFAKTORITE RF1 JA RF2 LÜLITI LINGU INTERAKTSIOONID
PSEUDOURIDIINIDEGA RIBOSOOMI 23S rRNA HEELIKSIS 69**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Vanemteadur Aivar Liiv

Tartu 2014

1 Sisukord

1	Sisukord	2
2	Kasutatud lühendid	4
3	Sissejuhatus.....	5
4	Valdkonna ülevaade.....	6
4.1	Polüpeptiidi vabanemistegurid.....	6
4.2	Pseudouridiinid.....	9
5	Ekspereimendaalne osa	12
5.1	Töö eesmärgid	12
5.2	Materjal ja meetoodika.....	13
5.2.1	Kasutatud tüved, plasmiidid ja reagendid.....	13
5.3	PCR-i praimerid	14
5.4	Kompetentsete rakkude valmistamine ja transformatsioon	15
5.4.1	Kompetentsete rakkude valmistamine	15
5.4.2	Transformatsioon	15
5.4.3	Rakukultuuride säilitussegude tegemine.....	15
5.5	Preparatiivne PCR	16
5.6	Plasmiidse DNA eraldamine rakkudest (Miniprep).....	17
5.7	Bradfordi kalibreergraafiku tegemine	17
5.8	Valgu ekspressioon ning puhastamine	18
5.8.1	Kasutatud lahused ning puhvrid.....	18
5.8.2	Rakumassi kasvatamine	18
5.8.3	Rakkude lüüs.....	18
5.8.4	Ni-NTA affiinsuskromatograafia.....	19
5.9	S100 eraldamine ja kontroll	19
5.9.1	Kasutatud lahused ja puhvrid:.....	19
5.9.2	Rakkude lüüs.....	19

5.9.3	<i>DEAE-sepharose</i> ioonvahetuskromatograafia	20
5.10	[³⁵ S]fMet-tRNA süntees	20
5.10.1	Fenool-kloroform töötlus	21
5.10.2	Konsentreerimine	21
5.11	Vabanemistegurite aktiivsuse mõõtmine	22
6	Tulemused.....	23
6.1	Homoloogia modelleerimine.....	23
6.2	vabanemistegurite mutagenees ja eraldamine.....	26
6.2.1	prfA ja prfB konstrueerimismalli tegemine	28
6.2.2	D3RF1 geeni konstrueerimine	28
6.2.3	D3RF2 geeni konstrueerimine	31
6.2.4	D3RF1 ja D3RF2 valgu eraldamine	33
6.3	RF-de aktiivsuse mõõtmine.....	35
7	Arutelu	40
8	Kokkuvõte.....	42
9	Summary.....	43
10	Tänuavaldused	44
11	Kasutatud kirjanduse loetelu.....	45
12	Lisa 1.....	47
13	Lisa 2.....	48
14	Lisa 3.....	49

2 Kasutatud lühendid

RF1- (*Release Factor 1*) vabanemisfaktor 1

RF2- (*Release Factor 2*) vabanemisfaktor 2

RF- (*Release Factor*) vabanemisfaktor

BSA- (Bovine serum albumin)

ap - aluspaar (nukleotiidi)

PVT- proliin, valiin, treoniin

SPF- (seriin, proliin, fenüülalaniin)

PTC- *peptidyl transferase center* peptidüültransferaasne tsenter

H69- Heeliks 69

3 Sissejuhatus

Ribosoom on valgust ning ribonukleiinhapest koosnev nanomasin, mis katalüüsib aminohapete järjestikust lülitamist polüpeptiididesse, mRNA nukleotiidses järjestuses alusel. Ribosomaalse valgusünteesi käigus toimub geeni nukleotiidses järjestuses nõ. „tõlkimine“ aminohapete järjestuseks valgumolekulis, selle tõttu nimetatakse seda protsessi sageli ka translatsiooniks. Translatsioon jagatakse laias laastus initsiatsiooni-, elongatsiooni- ja terminatsioonifaasiks, kusjuures igas faasis osalevad spetsiifilised valgud – nn. translatsioonifaktorid. Initsiatsioonifaasis toimub initsiatsiooni kompleksi moodustumine väiksest ja suurest alaühikust, mRNAst ja initsiaator-tRNAst. Elongatsioonifaasis toimub aminohapete lülitamine polüpeptiidahelasse. Valgusünteesi viimaseks etapiks on terminatsioon, mille käigus valmis sünteesitud valgu molekul vabaneb ribosoomist. Valgu vabanemist ribosoomist katalüüsib klass I polüpeptiidi vabanemisfaktor (RF). Prokarüootides on klass I vabanemisfaktoreid kaks – RF1 ja RF2, eukarüootides ja arhedes aga ainult üks (vastavalt eRF1 ja aRF1). Prokarüootsed klass I vabanemisfaktorid omavad sarnast struktuuri ning katalüüsi mehhanismi, kuid tunnevad ära erinevaid stopkoodoneid. Klass I RF-d interakteeruvad erinevate ribosoomi piirkondadega, sealhulgas 23S rRNA-s asuva heeliks 69ga(H69). Heeliks 69 on ribosoomi RNA struktuur, mille osaleb mitmetes ribosoomi töötukli etappides. Klass I vabanemisfaktorite interaktsioon H69-ga on oluline faktorite üleminekuks aktiivsesse konfirmatsiooni. Heeliks 69 on üks rRNA piirkondadest, mis sisaldab modifitseeritud nukleotiide – 3 pseudouridiini(Ψ). Biokeemiliste ja geneetiliste katsetega on näidanud, et Ψ -d on vajalikud RF2-, aga mitte RF1-sõltuvaks terminatsiooniks. Ribosoom-RF1/2 kokristallstruktuuride analüüs osutab, et RF1 ja RF2 erinevad oma interaktsioonimustrilt H69-ga. Teiselt poolt on hiljuti näidatud, et pseudouridiinid mõjutavad H69 konformatsiooni ja dünaamikat. Järelikult on võimalik püstitada hüpotees, et RF1- ja RF2-sõltuva terminatsiooni erinev tundlikkus pseudouridiinide olemasolu või puudumise suhtes heeliksis 69 tuleneb erinevustest nende valkude interaktsioonimustris H69-ga. Üheks võimaluseks seda hüpoteesi kontrollida on vahetada omavahel heeliksiga 69 spetsiifiliselt interakteeruvad piirkonnad kummagis faktoris ja jälgida selliste kimäärsete valkude aktiivsusi sõltuvalt H69 pseudouridüleeritusest. Nimetatud lähenemisel käesoleva töö eksperimentaalne osa põhinebki.

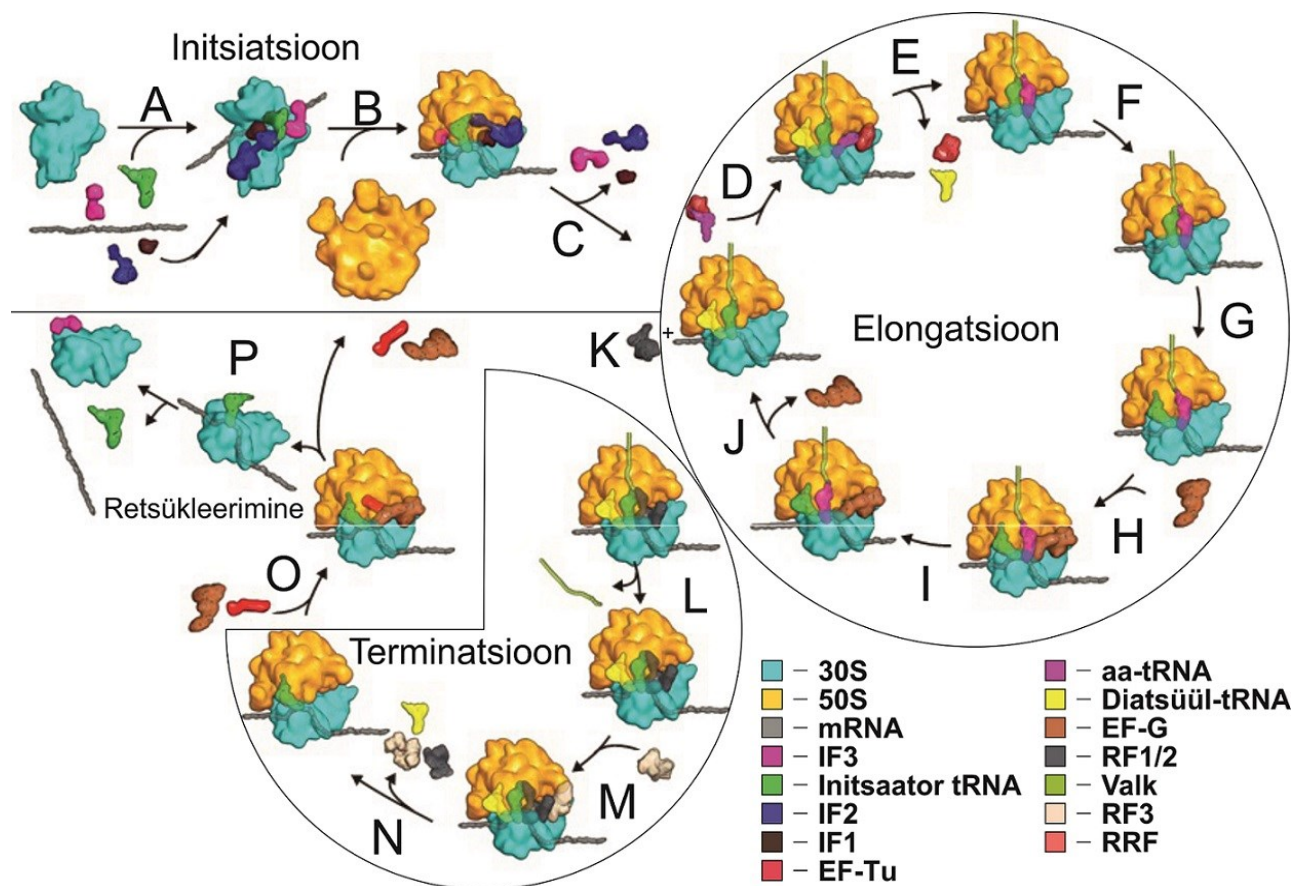
4 Valdkonna ülevaade

4.1 Polüpeptiidi vabanemisfaktorid

Polüpeptiidi sünteesil eristatakse kolme faasi: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon.

Initsiatsioonis moodustub ribosoomi subühikutest, initsiaator tRNAST ja mRNAST funktsioneeriv ribosoom. (Gualerzi jt., 2001; Simonetti jt., 2009) Elongatsioonil toimub aminohapete lülitamine polüpeptiidi mRNA nukleotiidsel järjestusel. Terminatsioonil vabaneb polüpeptiid ribosoomilt. (Capecchi, 1967)

Kõigis kolmes etapis osalevad lisaks ribosoomile valgulised komponendid, mida nimetatakse translatsioonifaktoriteks. Terminatsioonil osalevaid faktoreid nimetatakse vabanemisfaktoriteks (*release factors*). Viimased on jagatud vastavalt nende poolt katalüüsivatele reaktsioonidele kahte klassi: klass I faktoriteks on prokarüootidel RF1 ja RF2, eukarüootidel eRF1 ja arhedel aRF1, klass II faktorid on vastavalt RF3, eRF3 ja aRF3. (Beaudet, Caskey, 1971; Konecki jt., 1977; Buckingham jt., 1997) Klass I vabanemisfaktorid seonduvad ribosoomiga translatsiooni lõpus, stoppkoodoni jõudmisel ribosoomi A-saiti ning ribosoomiga seondumise järel katalüüsivad peptidüül-tRNA estersideme hüdrolyüsi. (Frolova jt., 1999) Klass II vabanemisfaktor on GTPaas, mis GTP hüdrolyüsi energiat kasutades, katalüüsib klass I faktorite vabanemist ribosoomilt. (Mora, jt., 2003) Peale klass I RF-i vabanemist ribosoomist järgneb protsess, mille käigus eraldatakse ribosoomi alaühikud, klass II RF, tRNA ning mRNA üksteisest. Reaktsiooni viivad läbi RRF(*ribosome recycling factor*) ja elongatsiooni faktor G (EF-G). Seda protsessi nimetatakse ka ribosoomi retsükleerimine ning selle lõppedes on ribosoomi 30S ja 50S alaühikud võimelised uues translatsioonitsükliks osalema.

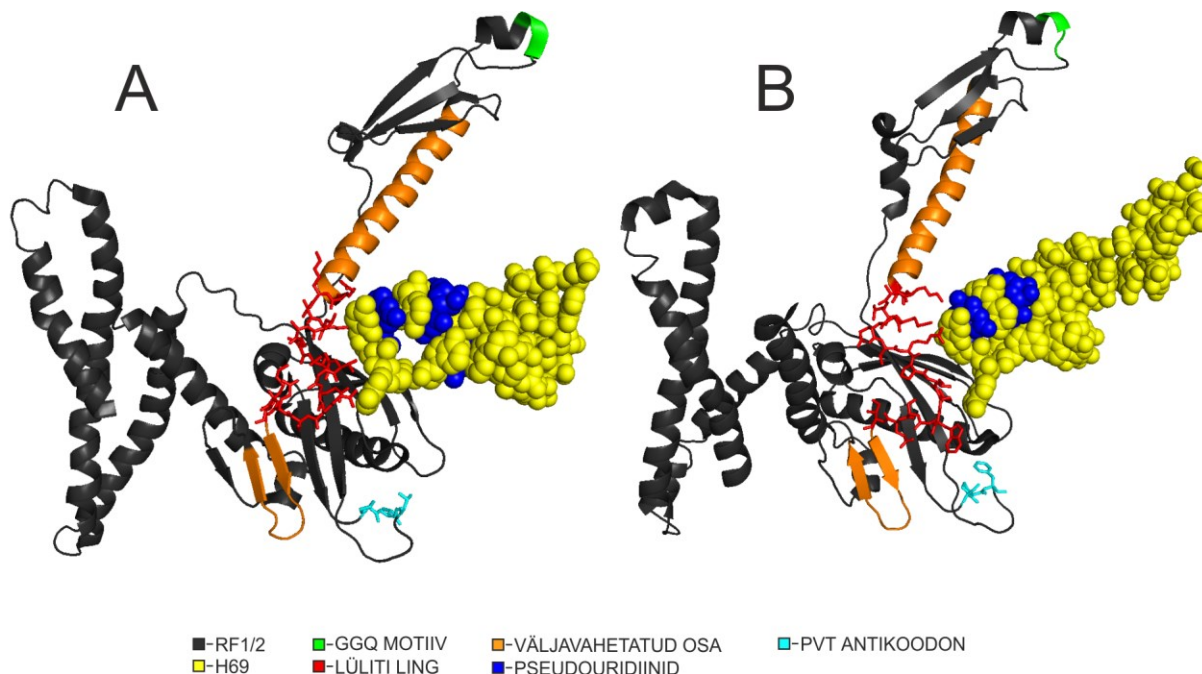


Joonis 1 Translatsiooni tsükkel, jagatud kolmeks: Initsiatsioon(A-faktorite,mRNA ja initsiaator-tRNA seondumine 30S-ga, B-50S alamühiku ja 30S alamühiku ühinemine, C-GTP hüdrolüüs ning IF-de vabanemine ribosoomist), Elongatsioon(D-aatRNA seondumine ribosoomi A-saiti, EF-Tu vahendusel, E-GTP hüdrolüüs ning EF-Tu vabanemine ribosoomist, F-peptiidsideme moodustumine, G-hübriidolekute teke, H-EF-G seondumine ribosoomi A-saiti, I-translokatsioon, J-EF-G vabanemine ribosoomist), terminatsioon(K-RF1/2 seondumine ribosoomi A-saiti, L peptiidüül-tRNA sideme hüdrolüüs ning peptiidahela vabanemine ribosoomist, M-RF3 seondumine ribosoomi, N-GTP hüdrolüüs ning RF1/2 vabanemine ribosoomist) ning retsükleerimine(O-RRF-i ja EF-G seondumine ribosoomile, P-GTP hüdrolüüs, ribosoomi alamühikute lahkumise, IF3 seonumine ja tRNA ning mRNA vabanemine 30S alamühikult) Joonist modifitseeritud selle töö jaoks. (Schmeing, Ramakrishnan 2009)

Prokarüootseid klass I vabanemistoreid RF1 ja RF2 kodeerivad vastavalt prfA ja prfB geenid. RF1 koosneb 360 aminohapest, tema molekulmass on 40,517kDa, RF2 koosneb 365 aminohapest ning tema molekulmass on 41,251kDa. Klass I vabanemistoreid RF1 ja RF2 katalüüsivad keemilises mõttes sama reaktsiooni ning omavad sarnast ruumilist struktuuri, samas erinevad RF1 ja RF2 oma stoppkoodoni spetsiifika poolest. Mõlemad tunnevad ära UAA stoppkoodonit, kuid ainult RF1 on võimeline seonduma ribosoomiga UAG stoppkoodoni ning RF2 UGA stoppkoodoni korral. (Scolnick jt., 1968; Klein, Capecchi, 1971) RF1-l on kolme aminohappeline motiiv PVT (proliin, valiin, treoniin), mis koos piirduvate aminohappejääkidega

osaleb stopp-koodoni äratundmisel. RF2-1 on tripeptiidseks motiiviks vastavalt SPF(seriin, proliin, fenüülalaniin), mis koos piirduvate aminohappejääkidega osaleb stopp-koodoni äratundmises. (Nakamura Y. jt., 2000)

RF1 ja RF2 tertsiaalstruktuuri tasemel koosnevad neljast domäänist. Domäänid 2 ja 4 on omavahel tihedas kontaktis ja moodustavad stabiilselt voltunud valgu tsentri, nn. superdomääni, millega on seotud liikuvad domään 1 ja 3. Domään 2 osaleb koodoni äratundmises ning interaktsioonides rRNA-ga. Domään 3 sisaldab GGQ motiivi ning osaleb estersideme hüdroolüüsis. Domään 1 ei osale peptiidahela vabastamises ega stoppkoodoni ära tundmises, kuid ta interakteerub 50S subühiku GTPaasi aktiveeriva piirkonnaga (23S rRNA heeliks 43 ja valk L11) ja klass II vabanemisfaktoriga RF3. Lisaks on vabastusfaktorites RF1 ja RF2 ilma kindla sekundaarstruktuurita piirkond domään 3 ja domään 4 vahel, mida nimetatakse lüliti liguks (Switch loop). (Korostelev jt., 2008) See piirkond, interakteerudes H69-ga, mängib rolli domään 3 paiknemises sõltuvalt koodoni ära tundmisest. RF1 ja RF2 konformatsioon lahuses erineb nende konformatsioonist ribosoomis – nimelt on lahuses domään 3 tõmbunud domään 2 ja 4 ligidale, kuid ribosoomis paikneb ta domään 2 ja 4-st eemal. RF1/RF2 domään 3 ümberpaigutumiseks ülejäänud valgu suhtes on oluline faktori interaktsioon H69-ga.



Joonis 2 Vabanemisfaktorite struktuur ribosoomis, A-RF1 struktuur ribosoomis, B-RF2 struktuur ribosoomis. Märgitud: RF1/RF2(must), GGQ motiiv(roheline), heeliks 69 (kollane), pseudouridiinid heeliks 69s (tumesinine), aminohappeline antokoodon (helesinine), lüliti ling (punane), koos lüliti linguga ümbertõstetud osa RF1/RF2s (oranz). Kasutatud struktuurid: PDB code-3F1E(Korostelev A, Asahara H 2008), 3D5A(Laurberg M, Asahara H 2008).

Lisaks tripeptiidsele antikoodonile, sisaldavad klass I vabanemisfaktorid domäänis 3 universaalselt konserveerunud GGQ motiivi, mis RF-i seondumisel ribosoomi A-saiti asetub peptidüül-transferaatsentri (PTC-*peptidyl transferase center*) lähedusse ning katalüüsib koos kindlate 23S rRNA nukleotiididega (U2584, U2585 ja U2506) estersideme hüdrolyüsi peptidüül-tRNA ja polüpeptiidi vahel. RF1 ja RF2 on sarnased nii funktsioonilt kui ka struktuurilt, kuid omavad spetsiifilisi erinevusi, mis mõjutavad nende aktiivsust ja seondumist ribosoomiga. Üheks struktuurseks erinevuseks on lüliti lingu piirkond domään 3 ja 4 vahel, mis interakteerub heeliks 69. Tema struktuur võib mõjutada domään 3 paiknemist PTC suhtes. Domään 3 paiknemine mõjutab vabanemisfaktorite katalüütilist aktiivsust ning peptiidahela vabanemise kiirust. Lisaks erineb lülitilingu interaktsioon domään 1-ga. Domääni 1 erinevus RF1-s ja RF2-s tuleneb tema konformatsioonist ja interaktsioonist L11-ga. L11 on valguline osa kompleksist ribosoomis, mis seotud tRNA seondumise ja väljumisega ribosoomist, RF2 annab domään 1-ga ulatuslikumaid interaktsioone kui RF1.

RF2 kodeerivas geeni PrfB-s translatsiooniks on vajalik lugemisraami nihe (frameshift), mis sõltub RF2 konsentratsioonist rakus. RF2 üleproduktseerimine on raku kasvule negatiivse mõjuga.

Vabanemisfaktori 2 positsioonis 246 on leitud faktori aktiivsust mõjutav mutatsioon. (Wilson jt. 2000) E.coli metsiktüüpi tüves on RF2 positsioonis 246 aminohapealaniin, kuid K-12 tüves, mille RF2 aktiivsus on (x) korda väiksem, on selle asemel treoniin. Vabanemisfaktorite GGQ motiivis asuva glutamiini metülatsioon mõjutab RF-de aktiivsust, metüleerimist viib mõlemas valgus läbi valg PrmC. (Mora jt. 2007) Metülatsiooni puudumisel on vabanemisfaktorite aktiivsus väiksem. Kuna metüleerimine on post-translatsiooniline modifikatsioon, siis valgule üleproduktseerumise korral ei jõua vastav ensüüm enam valku täielikult metüleerida.

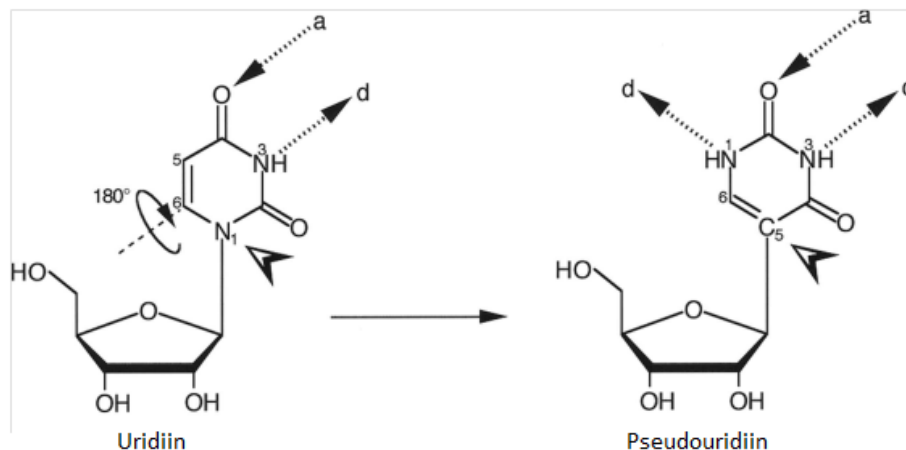
4.2 Pseudouridiinid

Heeliks 69 interaktsioon klass I vabanemisfaktoritega on ühelt poolt vajalik nende faktorite üleminekuks aktiivsesse konformatsiooni, teiselt poolt aga sõltub H69-RF1/2 interaktsiooni H69 enda konformatsioonist. Seega mõjutavad polüpeptiidi vabanemist kaudselt kõik tegurid, mis mõjutavad H69 konformatsiooni. Üheks H69 konformatsiooni mõjutavaks teguriks on H69-s esinevad modifitseeritud nukleotiidid - pseudouridiinid. Pseudouridiin on kõige sagedasemaks posttranskriptsioonilise modifikatsiooni tüübiks rRNA-s. Pseudouridiin kujutab endast uridiini isomeeri. Pseudouridiini erinevus uridiinist seisneb tema lämmastikaluse ning suhkruvahelises

sidemes. Kui uridiinis eksisteerib see side C - N (N-glükosiidne side) vahel, siis pseudouridiinis on see C - C (C-glükosiidne side) vahel. Heeliks 69s paiknevad pseudouridiinid positsioonides 1911, 1915 ning 1917.

Tabel 1 Pseudouridiini süntetaasid ning nende sihtmärgid rRNA-s

Name	RsuA	RluB	RluE	RluF	RluA	RluA	RluC	RluD	TruC	TruB	TruA
RNA substrate	16S RNA	23S RNA	23S RNA	23S RNA	23S RNA	tRNA	23S RNA	23S RNA	tRNA	tRNA	tRNA
Ψ site	516	2605	2457	2604	746	32	955;2504;2580	1911;1915;1917	65	55	38-40



Joonis 3 Uridiini ja Pseudouridiini erinevus

Lisaks H69-le on pseudouridiine leitud ka teistes rRNA(de) funktsiooni seisukohalt olulistes piirkondades, nagu näiteks peptidüültransferaas tsentrit moodustav domään V-s ja subühikutevaheliste sildade läheduses. See on viinud hüpoteesini, et nende olemasolu on vajalik ribosoomi õige konformatsiooni saavutamiseks. Sellele oletusele aga räägib vastu asjaolu, et enamiku pseudouridiini modifikatsioonide puudumine ei häiri rakkude eluvõimet märgatavalt. Prokarüootides sünteesivad pseudouridiine Ψ-süntaasid, post-transkriptsiooniliselt ning ribosoomi partikli kokkupanemise erinevates etappides. Enamik Ψ-süntaase modifitseerib ainult ühte kindlat rRNA piirkonda. Ψ-süntaasid on järjestuse analüüsi põhjal jagatud viite perekonda: RluA, RsuA, TruA, TruB, TruD. Kõik perekonnad on saanud oma nime *E. Coli*-s leiduva ensüümi järgi. (Koonin, 1996). Eukarüootide puhul ei ole modifitseeritavate uridiinide asukoht valgu spetsiifiline, vaid on määratud nn. giid-RNAde poolt, mis aluspaarduvad modifitseeritavat positsiooni sisaldava piirkonnaga rRNAs ja läbi selle „näitavad“ Ψ-süntaasile modifitseeritava uridiini asukoha. Arhede puhul pole leitud giid-RNAsi, kuid genoomide analüüs annab alus hüpoteesile, et nad kasutavad sarnast süsteemi.

Heeliks 69s sünteesib pseudouridiine RluD süntaas, kokkupakkimise ehk assaampli lõppfaasis. (Siibak ja Remme 2010) Lisaks sellele toimub veel positsioonis 1915 metülatsioon. Seda viib läbi valk RlmH ning see on viimane modifikatsioon, mis tehakse assambleeritud 70S-des. (Ero jt. 2010)

Heeliks 69 paiknevad pseudouridiinid mõjutavad H69 kuju ning dünaamilisust translatsiooni faasides, erinevatel füüsilistel tingimustel (pH, temperatuur, Mg kontsentratsioon).

(Y.Sakakibara, C.S.Chow. 2012) Pseudouridiinidest sõltuv H69 dünaamika võib olla oluline ribosoomi funktsioneerimise seisukohalt ja läbi selle mõjutada raku valgusünteesi protsessi.

Sellega on kooskõlas tähelepanek, et Ψ -süntaasi RluD deleteerimisel rakkudest mõjutab translatsiooni kiirust. (Leppik jt. 2007) On leitud, et RluD puudumisel esinevad supressor mutatsioonid prfB(RF2) ja prfC(RF3) geenides, mis vähendavad RluD puudumisest tulenevat madalamat translatsiooni kiirust. (O'Connor, Gregory. 2011)

RF2 on „tundlikum“ kui RF1 pseudouridiinide puudumisele 23S rRNA heeliks 69-s. (Kipper jt. 2011) Võttes arvesse pseudouridiinide mõju translatsiooni efektiivsusele ning vabanemistegurite RF1 ja RF2 erinevusi interakteerumisel Ψ -dega heeliksiga 69, on võimalik püstitada hüpotees: RF1 ja RF2 sõltuva terminatsiooni erinev tundlikkus pseudouridiinide olemasolu või puudumise suhtes heeliksis 69 tuleneb erinevustest nende valkude interaktsioonimustris H69-ga. Üheks võimaluseks seda hüpoteesi kontrollida on vahetada omavahel heeliksiga 69 interakteeruv lüliti lüüsi piirkond kummaski faktoris ja jälgida selliste kimäärsete valkude aktiivsusi sõltuvalt H69 pseudouridüleeritusest. Nimetatud lähenemisel käesoleva töö eksperimentaalne osa põhinebki.

5 Eksperimentaalne osa

5.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli konstrueerida vabanemisfaktorite mutantsed geenid, milles oleks vahetatud vabanemisfaktorite lüliti lingu piirkonda kodeerivad osad RF1 ja RF2 vahel. Teiseks eesmärgiks oli konstrueeritud geenide ekspresseerimine ning lahustuva valgu eraldamine rakkudest. Kolmandaks eesmärgiks oli kontrollida mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsust metsiktüüpi valkude vastu. Viimaseks eesmärgiks oli analüüsida konstrueeritud vabanemisfaktorite aktiivsust pseudouridiinide olemasolul ja puudumisel, võrreldes metsiktüüpi RF-dega.

5.2 Materjal ja metoodika

5.2.1 Kasutatud tüved, plasmiidid ja reagentid

5.2.1.1 Plasmiidid

pQE60(RF1) ja pQE60(RF2) (Vasili Hauryliuki, Uppsala Ülikool).

5.2.1.2 Tüved

E.coli M15 (Qiagen)

5.2.1.3 Reagentid

Reagentid imidasool, Na₂HPO₄, EDTA ning lüsotsüüm olid tootjalt Appllichem. Katsetes kasutatud MgCl₂, DNA-aas, NaOAc, BSA valk ja fenool tootjalt Amresco. IPTG tootjalt Carbosynth Limited. Stsintillatsioonivedelik OPTIPHASE 'HISAFE'3 tootjalt Perkin Elmer. AMP ja PPI tootjalt SIGMA, GTP tootjalt Amersham Biosciences, metioniin ja totaalne tRNA tootjalt Roche ning ATP Pharmacia-lt.

Järgnevad reagentid olid valmistatud Kalle Kipperi poolt: dNTP segu, PCR puhver(10 kordne), EtBr(10 U/μl).

Tris puhver pH 7,5, 2xYT vedelsööde, RF1 ja RF2 lahused ning ampitsiliini agarsöötmega petri tassid olid valmistatud Anneli Kukke poolt.

IF-d, metsiktüüpi ja puuduva heeliks 69-ga ribosoomide alamühikud olid valmistatud Kalle Kipperi poolt. Pseudorevertantsete ribosoomide 50S alamühikud ja pseudouridiinisüntaasi RluD valmistatud ja eraldatud Rya Ero poolt.

pfu DNA polümeraas oli lahke kingitus Prof.J.Sedman-ilt.

Generuler DNA Ladder Mix ja T4 DNA ligaas olid tootjalt Thermo Scientific.

5.3 PCR-i praimerid

Töös kasutatud praimerite järjestused tehti vastavalt plasmidi ning geeni järjestuse analüüsile ning telliti DNA Technology-st.

Praimerite pikkused ning seondumistemperatuurid ning nende järjestused on toodud tabelis 2.

Tabel 2 PCR-i praimerid

Praimer	Pikkus(ap)	T _m (°C)	Järjestus(5'→3')
P1	22	45,5	CATTATTATCATGACATTAACC
P4	21	50,5	GTTCTGAACAAATCCAGATGG
AN1	39	55,7	CCTGATCTTTGTTCTTGTGTTGTGAACGTTTCGTCCTGAC
AN2	19	60,8	CACAAGAACAAAGATCAGG
AC1	49	51,8	GGTTGATGCGGTGATCGGTAACGCGGGAGTCATCAAGGACATAAGAACG
AC2	25	46,8	CGCGTTACCGATCACCGCATCAACC
BN1	47	62,6	TGCTTTAGCTTTGTTTTTATGCTGGGAACGGTCGTTCTGGCACTGGG
BC1	45	54,4	GTGCGCAGATCTTTAATGCGCCCCTGCGGGAAGTTGTAAGTACGG
BN2	20	65,9	CATAAAAACAAAGCTAAAGC
BC2	21	43,6	CGCATTAAAGATCTGCGCACC
R6	28	64,3	CGCATTGATACTTCCGCTCGTCAGGGG
Keskmine T _m		54,7~54	

5.4 Komponentsete rakkude valmistamine ja transformatsioon

5.4.1 Komponentsete rakkude valmistamine

Võeti E.coli (tüvi M15 päritolu, siseelu) ning külvati 2 ml 2xYT vedelsöötmesse. Kasvatati 37°C juures loksutil, kuni OD600~0,6-0,8. Rakukultuur valati 2 ml eppendorfi ning fuugiti 1924g/5minutit. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 500 µl RF1 (RbCl 12 mg/ml, MnCl₂*4H₂O 9,9mg/ml, KOAc 30mM, CaCl₂*2H₂O 1,5mg/ml, glütserool 150mg/ml, pH 5,8-ni COOH-ga) lahuses. Raku lahuseid hoiti jääl 10 minutit, peale mida uuesti fuugiti 1924g juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 500 µl RF2(MOPS 10mM, RbCl 1,2 mg/ml, CaCl₂*2H₂O 11 mg/m, glütserool 150mg/ml, pH6,8-ni NaOH-ga) lahuses. Rakke sisaldavaid lahuseid hoiti jääl 15 minutit, peale mida jagati lahus sobivate osadena 1,5 ml eppendorfidesse ning külmutati vedelas N₂-s. Külmutatud rakke hoiti -80°C juures.

5.4.2 Transformatsioon

Tabel 3 Transformatsiooni meetodi etapid

1	Võeti kompetentsed rakud jää peale sulama
2	Lisati u. 100 ng transformeeritavat plasmidi kompetentsete rakkudele
4	Rakkudel lasti seista jää peal 25 minutit
5	Tõsteti rakud 42°C juurde 45 sekundiks
6	peale seda tagasi jääle 5 minutiks
7	parema transformatsioon saamiseks lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet
8	Pandi 37°C juurde 60 minutiks
9	Fuugiti rakud põhja 1924 g/5 minutit
10	eemaldati sööde, kuni alles u. 100µl
11	rakud resuspendeeriti allesjäänud
12	plaaditi kompetentsed rakud ampitsiliini sisaldavale agarsöötmele
13	kasvatati üleöö 37°C juures

5.4.3 Rakukultuuride säilitussegude tegemine

Transformatsiooni tüvede säilitamiseks, viidi transformatsiooni tassidelt üks koloonia 2xYT söötmesse ning kasvatati 37°C juures lokutil. Kui OD600≈0,8, siis võeti rakukultuur loksutilt.

Lisati 1:1 hulgas 50% glütserooli-2xYT söötme segu rakukultuurile ning jagati 2 ml korgiga tuubidesse. Valmistatud kultuurid külmutati vedelas N₂-s ning säilitati -80°C juures.

5.5 Preparatiivne PCR

Preparatiivset PCR-i kasutati prfA ja prfB mallide tegemiseks ning suunatud mutageneesiks. PCR-i reaktsioonisegu koostis ning kontsentratsioonid toodud tabelis 4.

Tabel 4 PCR-i reaktsioonisegu reagentide kontsentratsioonid.

PCR segu (1 reaktsiooni kohta)	
Reagent	Lõppkontsentratsioon
PCR-i puhver	1 kordne*
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	0,4 mM
Praimer 1	0,3 pmol/μl
Praimer 2	0,3 pmol/μl
Paljundatav DNA lõik	0,5 μg
Pfu DNA polümeraas	0,1 U/μl

*- ühe kordses puhvril kontsentratsioonid: 75mM TrisHCl pH 8,8, 20mM NH₂SO₄, 0,01% tritonX 100, 0,5% ficoll 400, 1mM tartasiin.

Peale PCR-i reaktsioonisegude valmistamist, pandi segu sisaldavad tuubid PCR-i masinasse Biometra Uno II ning sisestati PCR-i programm (tabel 5):

Tabel 5 Preparatiivse PCR-i programm *-pfu polümeraas suudab sünteesida 1000 aluspaari ühes minutis.

Etapp	PCR-i programm
1	93°C 3minutit
2	93°C 30 sekundit
3	T _m °C 40 sekundit
4	72°C aeg vastavalt produkti pikkusele*
5	korrata etappe 2 kuni 4, 32 korda
6	72°C 7 minutit
7	4°C 20 minutit

5.6 Plasmiidse DNA eraldamine rakkudest (Miniprep).

Sekveneerimiseks eraldati üleöö kasvanud 2 ml rakukultuuridest(D3RF1 või D3RF2) plasmiidne DNA. Rakud tsentrifugeeriti 2376 g 5 minutit põhja ning supernatant eemaldati. rakud suspendeeriti 150 µl P1 lahuses(Qiagen), peale mida lisati 150 µl P2 lahust(Qiagen) ning hoiti toatemperatuuril 5minutit. Lisati 150 µl P3 lahust(Qiagen), segati ettevaatlikult ning pandi jääle 5 minutiks. Lisati 300 µl NaClO₄ ning jäeti jääle 3minutiks. Proovid tsentrifugeeriti 16060 g juures 5 minutit ning supernatant tõsteti uude tuubi. Supernatandile lisati 1200 µl GUTCN ning 15 µl räni suspensiooni. segati ning lasti seista 5 minutit toatemperatuuril. Lahus tsentrifugeeriti 16060 g 5 minutit ning supernatant eemaldati. Räni sade suspendeeriti 1 ml 70% etanoolis, segati ning tsentrifugeeriti 16060 g juures 1 minut. Supernatant eemaldati ning sade suspendeeriti uuesti 70% etanoolis. Proov tsentrifugeeriti 16060 g juures 1minut, supernatant eemaldati ning sademega tuub pandi 37°C kuumablokile 10 minutiks, et eemaldada võimalikult palju etanooli tuubist. Räni sademele lisati 30 µl H₂O(MQ) ning jäeti toatemperatuurile seisma 5 minutiks. Proovi tsentrifugeeriti 16060 g juures 1 minut, supernatant tõsteti uude tuubi. Juhtumil, kui räni tuli kaasa supernatandi ümbertõstmisel, siis korrati tsentrifugeerimist ning tõsteti supernatant uuesti uude tuubi. Peale seda mõõdeti DNA kontsentratsioon Nanodrop 2000c-ga. DNA säilitati -20°C juures.

5.7 Bradfordi kaliibergraafiku tegemine

Võeti BSA valgu lahused kontsentratsioonidega: 0.1, 0.25, 0.5 ja 1.0 mg/ml. Segati valmis proovid, kuhu lisati 50 µl valgu lahust ning 1500 µl Bradfordi värvi lahust ning mõõdeti OD₆₀₀. Tulemuste põhjal tehti graafik millele arvutati vastav sirge võrrand. Sirge võrrand: $y=0,21x-0,011$, kus y tähistab OD₆₀₀ väärtust ning x tähistab sellele vastavat valgu kontsentratsiooni (mg/ml).

Ligeerimine ja restriksioon tehti vastavalt „Molecular Cloning“ (Sambrook ja Russell, 2001)

5.8 Valgu ekspressioon ning puhastamine

5.8.1 Kasutatud lahused ning puhvrid

(sulgudes antud lõppkontsentratsioonid):

- Lüüsilahus – puhver A, kuhu lisati: lüsotsüüm (2mg/ml), DNAas (20U/ml), PMSF (0,2mM).
- Puhver A – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM), NaCl (0,5M), Imidasool (20mM). pH tiitriti 7.4 juurde 5M NaOH-ga.
- Puhver B – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM), NaCl (0,5M), Imidasool (0,5M). pH tiitriti 7.5 juurde 85% H_3PO_4 -ga.

5.8.2 Rakumassi kasvatamine

Valkude ekspressiooniks võeti -80°C juurest *E.coli*+pQE60(X) säilitussegu (X - plasmidi viidud geen). Rakud plaaditi ampitsiliini sisaldavale tassile ning pandi üleöö 37°C juurde. Tassi pealt valitud kolooniatega inokuleeriti 2ml 2xYT söödet, kuhu eelnevalt lisati ampitsiliini lõppkontsentratsioon 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Rakud pandi 37°C juurde loksutile üleöö kasvama. Järgmisel päeval võeti 2 liitrit 2xYT söödet ning lisati ampitsiliini lõppkontsentratsioon 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, viimasena lisati eelmisel päeval kasvama pandud innokulumi kuni $\text{OD}_{600} \approx 0,05$. Edasi jagati valmistatud sööde rakkudega 500 ml kaupa 2 liitristesse kolbidesse ning pandi loksutile 37°C juurde. Rakukultuuri tihedust mõõdeti valguse neeldumise järgi 600nm juures (OD_{600} põhjal). $\text{OD}_{600} \approx 0,8$ juures lisati rakukultuuridele IPTG-d lõppkontsentratsioon 1mM ning lasti kultuuril edasi kasvada 4 tundi 37°C juures, loksutil.

4 tundi pärast indutseerimist IPTG-ga, fuugiti rakud põhja 4000g 15minutit. Supernatant eemaldati, rakud külmutati vedelas N_2 -s ja säilitati -80°C juures.

5.8.3 Rakkude lüüs

Rakud sulatati ning suspendeeriti 50 ml lüüsilahuses, lisati lüsotsüüm lõppkontsentratsiooniga 2 mg/ml-s ning DNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 U/ml. Saadud suspensiooni segati *Intel mix-1* 4°C ning 60rpm juures, kuni silmnähtava homogeensuse saavutamiseni. Rakud lüüsiiti French press-is 16000psi rõhu juures, kolmes järjestikulises tsüklis. Peale seda lahus tsentrifuugiti kasutades SS-34 rootorit 34541 g 60 minutit, supernatant kanti uude tuubi.

5.8.4 Ni-NTA affiinsuskromatograafia

Kolonne matriksina kasutati Ni-NTA agarooši Qiagen-lt. Kolonne mõõtmed: läbimõõt-2,5 cm, kõrgus-7 cm, ruumala≈35 ml. Kolonn viidi tasakaalu umbes 4-kordse kolonne ruumala puhver A-ga, millesse oli lisatud PMSF-i lõppkontsentratsioon 0,2mM. Pärast kolonne tasakaalustamist kanti kolonnile umbes 50 ml rakkude lüsaati. Peale seda kolonne pestud 120 ml puhver A-ga. Pärast pesu, toimus kolonne elueerimine 40 ml puhver B-ga. Eluaat fraktsioneeritud 1 ml kaupa. Kogu töö toimus 4°C juures. Fraktsioonides kontrolliti valgu olemasolu mikrotiiterplaadil Bradfordi reaktsiooniga. Valku sisaldavad fraktsioonid kanti Amicon 10000G tseentrifugaalfiltrile ning fuugiti 4000 g juures 20 minutiliste tsüklitena 3 korda. Peale seda tõstetud filtri pealne lahuse uude tuubi, mõõdetud kontsentratsioon Bradfordi meetodiga.

5.9 S100 eraldamine ja kontroll

5.9.1 Kasutatud lahused ja puhvid:

Tabel 6 lüüsi puhvri reagentide kontsentratsioonid

Tabel 7 puhver P ja puhver E reagentide kontsentratsioonid

Lüüsi puhver	
hepes-KOH(pH7.6)	20 mM
NH ₄ Cl	25 mM
MgCl ₂	6 mM
β-merkaptotEtOH	6 mM

Reandid	Puhver P	Puhver E
hepes-KOH(pH7.6)	20 mM	20 mM
KCl	50 mM	300 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
β-merkaptotEtOH	6 mM	6 mM

5.9.2 Rakkude lüüs

Võeti 10g *E.coli*MRE600 rakke ning suspendeeriti 100 ml lüüsi puhvris (tabel 6), kuhu lisati: lüsootsüüm lõppkontsentratsiooniga 2mg/ml, DNAaas lõppkontsentratsiooniga 40U/ml ja PMSF lõpp-kontsentratsiooniga 1mM. Saadud suspensiooni segati magnetsegajal 3000rpm 4°C juures, kuni homogeense lahuse saavutamiseni. Suspensiooni lüüsi, lastes kolm korda läbi *French press*-i 16000psi rõhu juures. Saadud lüsaat klaariti SS-34 rootoris 34541g/40 minutit. Supernatant jagati kahte Ti-45 tuubi, tasakaalustati ja tseentrifuugiti Ti-45 rootoris tingimustel: kiirus: 134032 g, aeg: 14 tundi, temperatuur: 4°C, w²t: 6,45·10¹¹. Pärast fuugimist valati supernatant uude tuubi.

5.9.3 DEAE-sepharose ionvahetuskromatograafia

Eelmise etapi lõpptulemusena saadud supernatandist puhastatud valkude fraktsioonid kasutades DEAE sepharose maatriksit. Kolonni mõõtmed: läbimõõt-2,5 cm, kõrgus-6cm, ruumala≈30 ml. Kolonn tasakaalustati puhvriga P (tabel 7), peale pesu kanti kolonnile 100 ml proovi eelmisest etapist. Prooviga kolonni pesti 250 ml puhver P-ga. Pärast pesu kolonni voolutati puhver E-ga (tabel 7) ning fraktsioneeriti 4 ml kaupa. Valku sisaldavad fraktsioonid, mida oli kokku 9 tükki, valati kokku ning kanti Amicon 3000kDa tsentrifugaalfiltrile. Fuugiti 2113g juures, kuni filtri peal oleva lahuse ruumala ligikaudu 6 ml. Lahus jagati laiali sobivate osadena, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

5.10 [³⁵S]fMet-tRNA süntees

Meetodi üldine ülesehitus: „tühjad“ tRNA^{fMet}-dele sünteesitakse külge metioniin(külm), millest teatud osa on radioaktiivselt märgistatud [³⁵S] (kuum). tRNA toormaterjaliks kasutati nn. „bulk“-tRNAd (totaalne tRNA), millest umbes 3% on tRNA^{fMet}. Reaktsioon lõpp ruumala oli 8 ml.

Tabel 8 Reaktsioonisegu reagentide lõppkontsentratsioonid

Reagendid	Lõppkontsentratsioon
„bulk“-tRNA	185,6 µM
Metioniin	27,8 µM
[³⁵ S]Metioniin	25 µM
N ⁵ -THF	2 mM
ATP	8 mM
MgCl ₂	20 mM
Tris-HCl(pH7,5)	50 mM
β-merkaptEtOH	6 mM

Segati kokku reaktsioonisegu (tabel 8), lõppruumalaga 7,2 ml. Reaktsiooni alustamiseks lisati reaktsiooni segule 800µl S100-t. Segu tõsteti 45minutiks 37°C juurde. Peale 45minutit, lisati segusse AMP ja PPi, lõppkontsentratsioonid 6mM. Hoiti 5 minutit toa-temperatuuril, siis lisati 600mM NaOAc ja 20 mM EDTA-d. Tsentrifugiti 16060 g juures 10 minutit ning supernatant tõsteti uude tuubi.

5.10.1 Fenool-kloroform töötlus

Eelmises etapis saadud supernatandile lisati 1:1 suhtes fenooli, voltrex faaside segunemiseks ning tsentrifugiti 2113 g juures 10 minutit. Vesifaas tõsteti ümber uude tuubi ning lisati kloroformi 1:1 suhtes, voltrex faaside segunemiseks ning tsentrifuug 2113g juures 10 minutit. Vesifaas tõstetud ümber uude tuubi.

5.10.2 Konsentreerimine

Fenool-kloroformi töötluste lõpuks saadud vesifaasile lisati 96% etanooli suhtes 3:1-le ning pandi -20°C juurde üheks tunniks. Peale seda tehtud tsentrifuug 2376 g juures 30minutit, supernatant eemaldati. Järgnevaid etappe korrati kolm korda: sademele lisati 3ml 0,35M NaOAc-d ja 96% etanooli suhtes 3:1 ning pandi -20°C juurde 1 tunniks, Peale seda tsentrifugiti segu 2376 g juures 30 minutit ning supernatant eemaldati. Pärast kolme korda resuspendeeriti sade 2 ml 1 kordses hepes/polümix puhvrite segus. Lahus kanti Amicon 3000G tsentrifugaalfiltrile ning pandi tsentrifugima 3000 g juures 25 minutit. Tsentrifuugi korrati neli korda ning peale igat korda suspendeeritud retendanti. Peale neljandat korda retendant tõsteti uude tuubi ning klaariti 16060 g juures 10 minutit. Lõpuks mõõdeti tRNA kontsentratsioon Nanodrop 2000c-ga, fooni määramiseks kasutati 1x hepes/polümix puhvrite segu. Produkt jagati osadeks, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -20°C juures.

5.11 Vabanemisfaktorite aktiivsuse mõõtmine

Vabanemisfaktorite aktiivsust mõõdeti [S^{35}]Met vabanemisega terminatsiooni kompleksist. [S^{35}]Met-i singaali mõõdeti Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR-iga. Reaktsiooni lõppruumala oli 50 μ l.

Tabel 9 Reaktsioonisegu reagentide kontsentratsioonid

Reagent	Lõppkontsentratsioon
50S alamühikud	0,5 pmol/ μ l
30S alamühikud	0,4 pmol/ μ l
mRNA	0,8 pmol/ μ l
fMet-tRNA	0,8 pmol/ μ l
IF-1	0,2 pmol/ μ l
IF-2	40 pmol/ μ l
IF-3	0,1 pmol/ μ l
GTP	1 mM
Herpes pH7,6 puhver	*lisatud 10-kordset puhvrit, kuni
Polümix puhver	reaktsiooni segus 1-kordne

Alustati Mastermixi kokkusegamisega (vt. Tabel 9). Kõigepealt segati kokku MQ vette 30S segu: 30S alamühikud, mRNA, fMet-tRNA, initsiatsioonifaktorid (IF-1, IF-2, IF-3), GTP ja hepes/polümix puhver. Teiseks segati MQ vette 50S segu: 50S, 10XOL-100. Segusid inkubeeriti 37°C juures 10 minutit. Segati kokku 30S ja 50S segud, mida inkubeeriti 37°C juures 15 minutit. Valminud reaktsioonisegu jagati osadeks. Reaktsiooni alustati vabanemisfaktori, lõppkontsentratsiooniga 0,2 pmol/ μ l, või puromütsiini, lõppkontsentratsiooniga 1nmol/ μ l, lisamisega. 30 sekundi möödumisel lisati vabanemisfaktoritega proovidele suhtes 1:1-le 18% HCOOH, puromütsiiniga proovidele lisati 30 sekundi möödumisel suhtes 1:1 2M KOH-d. Proovid viidi jääle 30 minutiks, peale mida tsentrifugiti proove 16060 g juures 15 minutit. Pärast fuugi tõsteti supernatant uude tuubi ning ruumala viidud 300 μ l-ni 9% HCOOH ning lisati 1ml etüülatsetaati ja segati. Valminud lahust fuugiti 16060 g juures 2 minutit, orgaaniline faasi tõsteti uude tuubi. Saadud lahus kanti filterpaberile ning pesti 70% EtOH. Filterpaber pandi plastik tuubi ning kuivatati 65°C juures 40 minutit. Pärast seda lisati sintsilatsiooniviin ja mõõdeti luminesentsi Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR-ga.

6 Tulemused

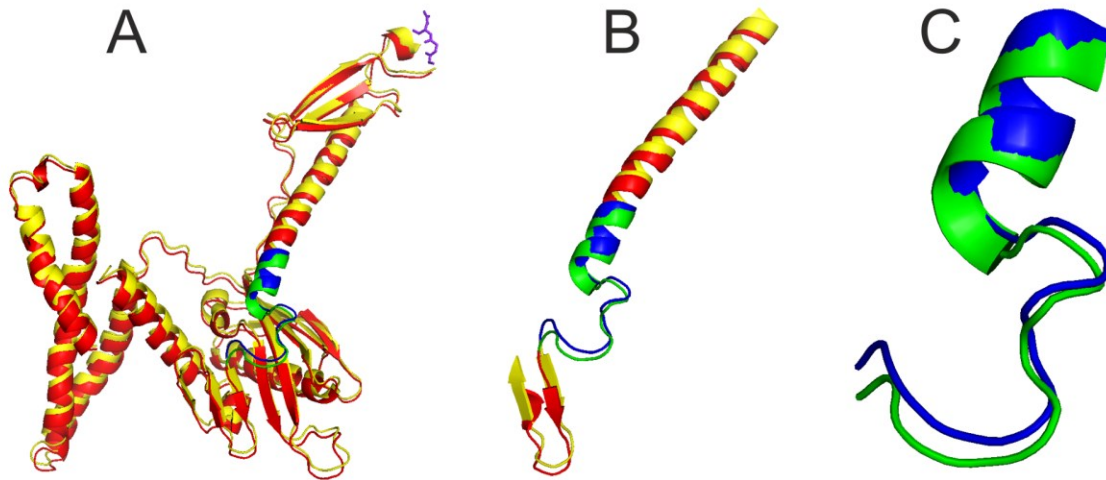
Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli konstrueerida vabanemisfaktorite mutantset geenid, milles oleks vahetatud vabanemisfaktorite lüliti ligu piirkonda kodeerivad osad prfA ja prfB vahel. Teiseks eesmärgiks oli konstrueeritud geenide ekspresseerimine ning lahustuva valgu eraldamine rakkudest. Kolmandaks eesmärgiks oli kontrollida mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsust metsiktüüpi valkude vastu. Neljandaks eesmärgiks oli tulemuste analüüs, sõltuvalt pseudouridiinide olemasolust katsetes kasutatud ribosoomide 23S rRNA heeliks 69-s.

Vahetavate piirkondade defineerimiseks kasutati homoloogia modelleerimist. Mutageensed geenid konstrueeriti, kasutades preparatiivset PCR-i ning viidi plasmidi pQE60 restriksiooni ja ligaasi tulemusel. Seejärel plasmiidid transformeeriti ning kontrolliti sekveneerimisega ning ekspresseeriti ja eraldati mutantne valk Ni-NTA affiinsuskromatograafial. Mutantide aktiivsust mõõdeti in vitro terminatsiooni kompleksilt radioaktiivselt märgistatud metioniini vabanemisega.

6.1 Homoloogia modelleerimine

Selleks, et hinnata RF1 ja RF2 struktuuri sarnasusi ning interaktsioonide erinevusi heeliks 69-ga ribosoomi 23S rRNA-s, oli vajalik näha RF-ide paiknemist ribosoomis (joonis 2). Kuna röntgenkristallograafia struktuurid 70S ribosoomikompleksidega, mis sisaldavad vabanemisfaktoreid, on tehtud *T.thermophiliuse* ribosoomide, mitte *E.coli* omadega, siis ei olnud otsene võrdlus võimalik. Selle asemel tehtud homoloogiline modelleerimine, kasutades *PrfA* ja *PrfB* järjestust *E.coli str.K12 substr.MG1655* tüvest ning *T.thermophiliuseHB27* tüvest pärit funktsionaalsete 70S ribosoomikompleksidest eraldatud RF1 ja RF2 tertsiaalstruktuuri. (viide) See võimaldas näha potentsiaalseid erinevusi valkude struktuuris kahe organismi vahel. Teiseks tehtud struktuuride võrdlus *T.thermophiliuse* vabanemisfaktorite RF1 ja RF2 vahel, et näha potentsiaalseid erinevusi kahe valgu vahel. Homoloogia modelleerimiseks kasutatud SWISS-MODEL veebirakendust. Töö struktuuridega tehti tarkvaraga Pymol(versioon1.5). Homoloogia modelleerimine toodud joonistel 3 ja 4. Struktuuride võrdlused toodud joonisel 5.

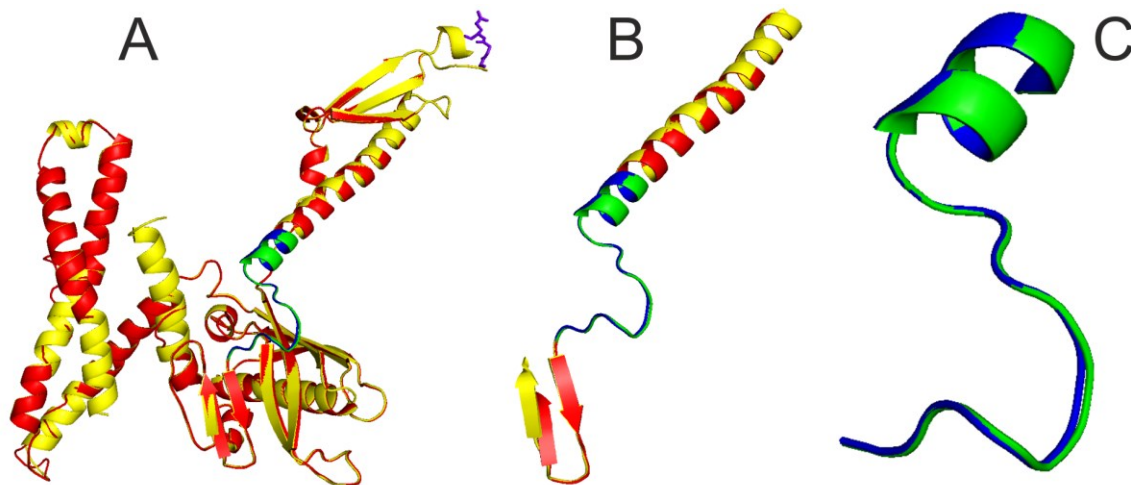
Joonistel 4 ja 5 toodud struktuuride täpsust iseloomustab nende GMQE (*Global Model Quality Estimation*), mis jääb 0 kuni 1 vahele ning kus 0 tähistab sarnasuse puudumist ja 1 tähistab täieliku kokkulangevust. Joonisel 4 ja 5 toodud struktuuride GMQE on vastavalt 0,79 ning 0,76. Joonisel 6 toodud struktuurid on viidud kokku pymol-is.



■ – RF1 *E.coli*
 ■ – RF1 *T.thermophilus*
 ■ – RF1 *E.coli* lülitilõng

■ – GGQ motiiv
 ■ – RF1 *T.thermophilus* lülitilõng

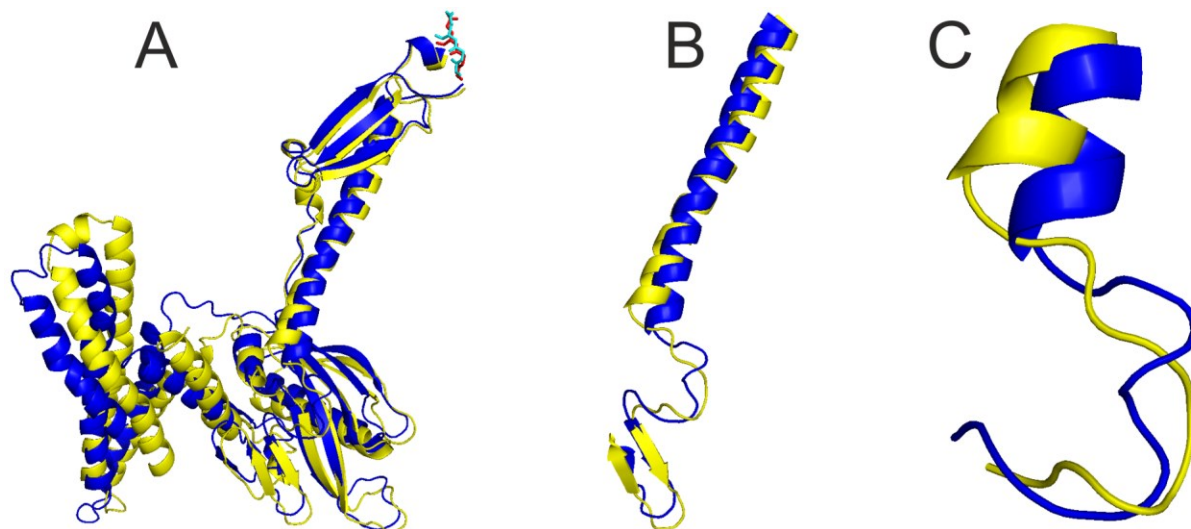
Joonis 4 *E.coli* ning *T.thermophilus* RF1 homoloogia modelleerimine. A-RF1 terve struktuuri võrdlus, B-RF1 lülitilõnguga koos ümbervahetatud osa võrdlus, C-RF1 lülitilõngude võrdlus. Modelleerimiseks kasutatud struktuur: PDB code-3D5A(Laurberg M, Asahara H 2008), mida modifitseeritud selle töö jaoks. Valgu järjestus *E.coli str.K12 substr.MG1655*.



■ – RF2 *E.coli*
 ■ – RF2 *T.thermophilus*
 ■ – RF2 *E.coli* lülitilõng

■ – GGQ motiiv
 ■ – RF2 *T.thermophilus* lülitilõng

Joonis 5 *E.coli* ning *T.thermophilus* RF2 homoloogia modelleerimine. A-RF2 terve struktuuri võrdlus, B-RF2 lülitilõnguga koos ümbervahetatud osa võrdlus, C-RF2 lülitilõngude võrdlus. Modelleerimiseks kasutatud struktuur: PDB code-3F1E(Korostelev A, Asahara H 2008), mida modifitseeritud selle töö jaoks. Valgu järjestus *E.coli str.K12 substr.MG1655*.



■ – RF1 *E.coli*
 ■ – RF2 *E.coli*
 ■ – RF1 *E.coli* GGQ Motiiv

■ – RF2 *E.coli* GGQ motiiv

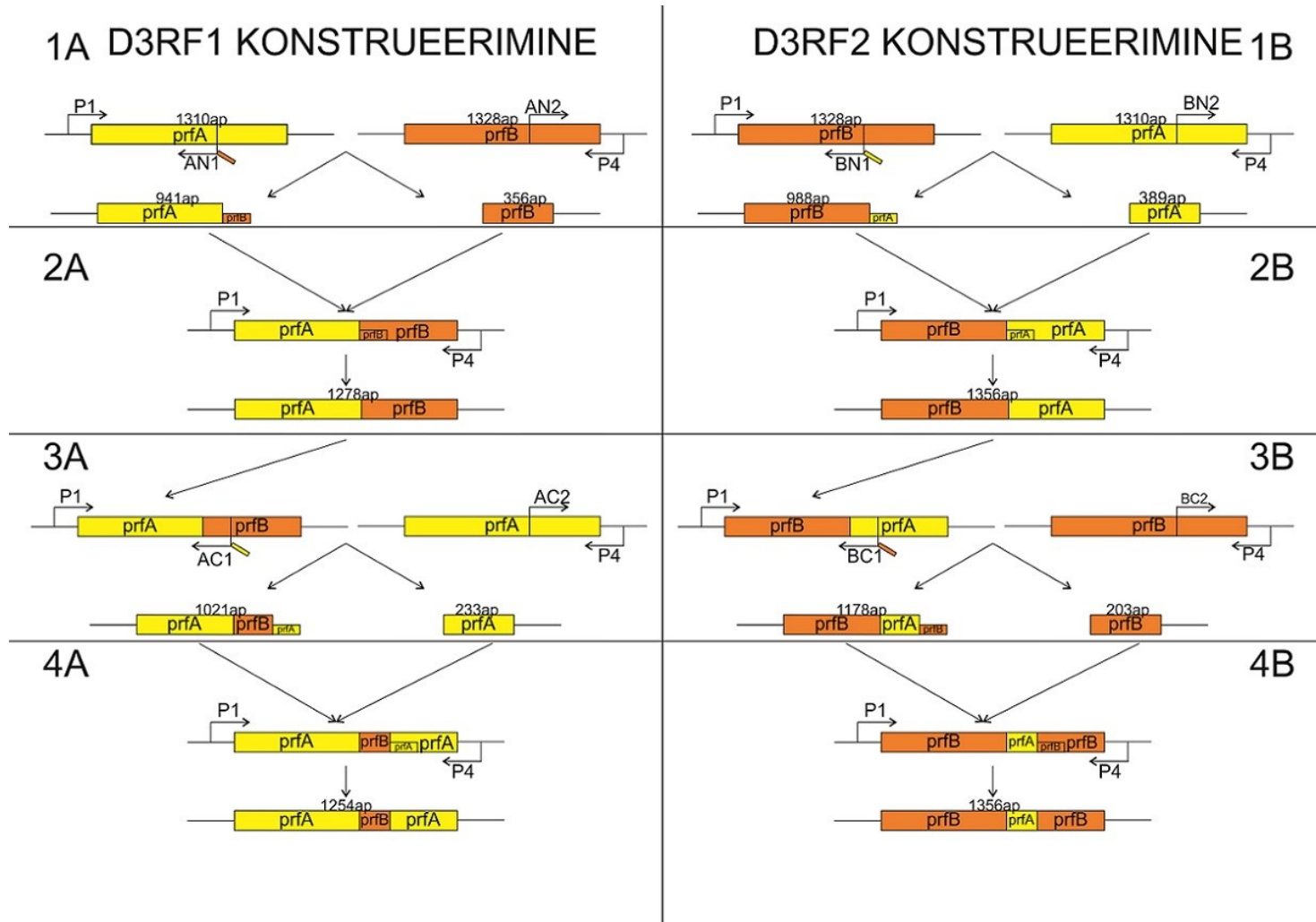
Joonis 6 *T.thermophiliuse* HB27 RF1 ja RF2 võrdlus. A-RF-ide kogu struktuuri võrdlus, B-RF1s ja RF2 ümbervahetatud osad, C-RF1 ja RF2 lüliti lüügi struktuuride võrdlus. Võrdluses kasutatud struktuurid: PDB code-3F1E(Korostelev A, Asahara H 2008), 3D5A(Laurberg M, Asahara H 2008), mida modifitseeritud selle töö jaoks.

Jooniselt 4 ja 5 oli näha, et võib eksisteerida väikesi erinevusi kahe valgu vahel, kuid uuritavas regioonis ei ole märgatavaid erinevusi kahe organismi vahel. Joonisel 6 toodud kahe valgu võrdlus näitab, et vabanemisfaktorite struktuurid on sarnased, kuid omavad erinevusi uuritavas piirkonnas. Jooniselt 6B ja 6C on näha, et üldine ehitus on sama, kuid esineb erinevusi lüliti lüügis ning seda ümbritsevas struktuuris. Arvestades, et lüliti lüügi interaktsioonid heeliks 69 mängivad rolli tema konfirmatsiooni muutustes, mis omakorda mõjutavad domään 3 α -heeliksi pikkust ning GGQ paiknemist, oli alust vahetada välja kogu α -heeliks domään 3-s, mis jääb lüliti lüügi ning GGQ motiivi vahele.

6.2 vabanemistfaktorite mutagenees ja eraldamine

RF1 ja RF2 vastavate piirkondade vahetus toimus 4-etapilise PCR-i abil. prfA(RF1) ja prfB(RF2) mutantsete geenide konstrueerimise skeem toodud joonisel 7. Kõikide agarosgeelidel kasutati suurusmarkerit Generuler DNA ladder mix plus().

Joonisel 7 toodud skeem näitab piltlikult, mis järjekorras ning kuidas mutantsete geenide konstrueerimine toimus. Skeem jagatud kaheks: D3RF1 ja D3RF2 konstrueerimine, mis omakorda jagatud neljaks etapiks. Esimestes etappides 1A ja 1B kasutatud prfA ja prfB konstrueerimismalle ning disainitud praimerite paare, et saada paarduvate otsedega PCR-i produktid, millest üks ühest valgust ning teine teisest. Etappides 2A ja 2B kasutatud PCR-i meetodi eripärasid, et ühendada esimestest etappidest saadud produktid omavahel. Nimelt PCR-i käigus denatureeritakse DNA üheaahelaliseks, peale mida toimub praimerite paardumine. Selle ajal on võimelised seonduma kahe produkti komplementaarsed alad. Tulemuseks oli geen, kus üks pool on prfA-st ning teine prfB-st. Selleks, et saada lahti esimeses PCR-is kaasa tulnud geeni 3'- poolsest osast, mida ei tahetud välja vahetada, tehti uus PCR. Etapid 3A ja 3B tehtud analoogselt esimestele etappidele, kuid kasutatud eelnevast etapist saadud produkti ning sellele vastavat malli, et saada kaks DNA lõiku: üks, mille 3'otsas on teisest geenist pärit kindla pikkusega järjestus ning teine, mis omab komplementaarset otsa esimesega. Neljanda etapis toimub kõik sama moodi nagu teises etapis ning tulemuseks on geen, milles kindel osa on välja vahetatud.



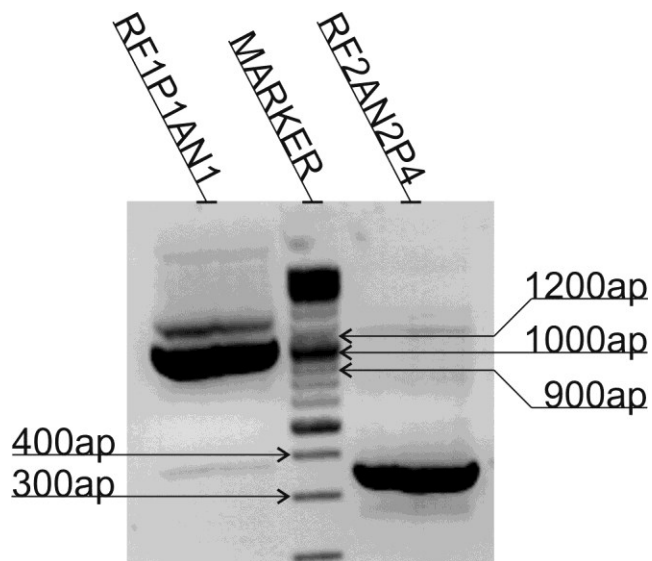
Joonis 7 D3RF1 ja D2RF2 konstrueerimise skeem. 1A/B, 2A/B, 3A/B ja 4A/B - PCR-ide etapid. Kollasega märgistatud prfA geeni järjestus, oranžiga prfB geeni järjestus. P1, AC1, BN1 jt. on kasutatud praaimerid. PCR-i etappide sisu lahti seletatud leheküljel 25.

6.2.1 prfA ja prfB konstrueerimismalli tegemine

plasmiidid pQE60(RF1) ja pQE60(RF2) transformeeriti *E.coli* M15 kompententsetesse rakkudesse ning kasvatati AMP agartassidel üleöö. Tehti külvid 50ml 2xYT vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö loksutil 37°C juures. Vedelsöötmes olevad kultuurid kanti 50ml falcon tuubidesse ning fuugiti 4754g, 15minutit. Supernatant valati pealt ning sademest eraldati plasmiidne DNA *Invisorb Plasmid Midi Kit*-i abil. Produkte kontrolliti restriksiooni teel, 1% agarosgeelil elektroforeesi teel. Tehti PCR eraldatud plasmiididele, kasutades primereid P1 ja P4. PCR-i reaktsioonisegudest puhastati produktid elektroforeesi teel 1% agarosigeelil. Geelist lõigati välja bändid, mis vastasid umbes 1200 aluspaari pikkusele kaheahelalisele DNA-le. Geeli tükkidest eraldati DNA *Genejet Gel Extraction Kit*-ga, kontsentratsioon mõõdetud Nanodrop 2000c-ga. Produkte säilitatud -20°C juures.

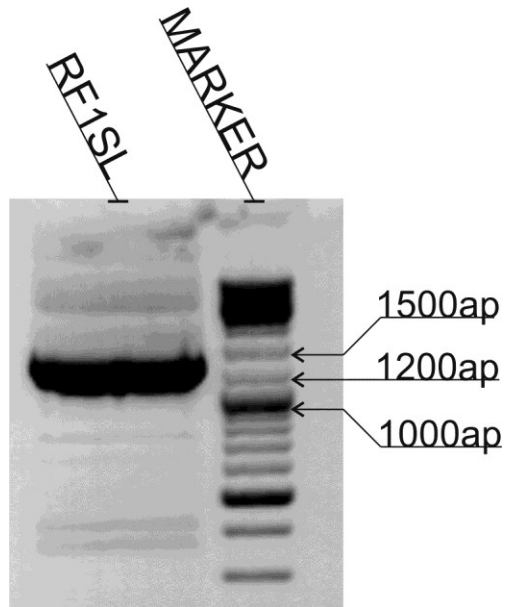
6.2.2 D3RF1 geeni konstrueerimine

prfA(RF1) ja prfB(RF2) konstrueerimismallidele tehtud preparatiivsed PCR-id: prfA puhul kasutati praimeride paari P1 ja AN1, prfB aga praimeride paari AN2 ja P4. Primer AN1 omab 3' otsas prfB-le komplementaarset järjestust. PCR produktid puhastati segust 1,5% agarosgeelil (joonis 8) elektroforeesi teel ning eraldati geelilt *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. DNA kontsentratsioon mõõdetud Nanodrop 2000c-ga. Produktid märgistatud vastavalt RF1P1AN1 ja RF2AN2P4.



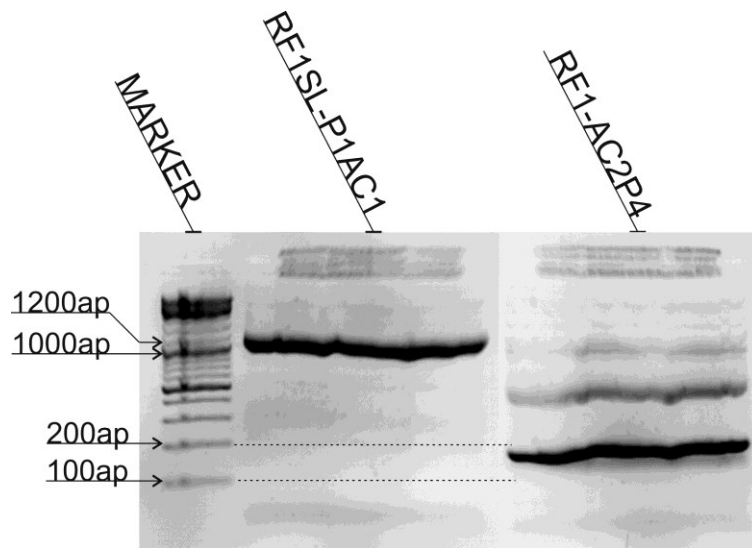
Joonis 8 D3RF1 konstrueerimise etapi 1A PCR-i produktid agarosgeelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurus, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemikesse jäävad geelibändid.

Valmistatud uus PCR-i segu, kuhu lisati RF1P1AN1 ja RF2AN2P4 eelmisest etapist ning praimerid P1 ja P4. PCR produktid puhastati segust 1% agarosgeelil elektroforeesi teel (joonis 9) ning eraldati geelilt *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. Produkt nimetatud RF1SL.



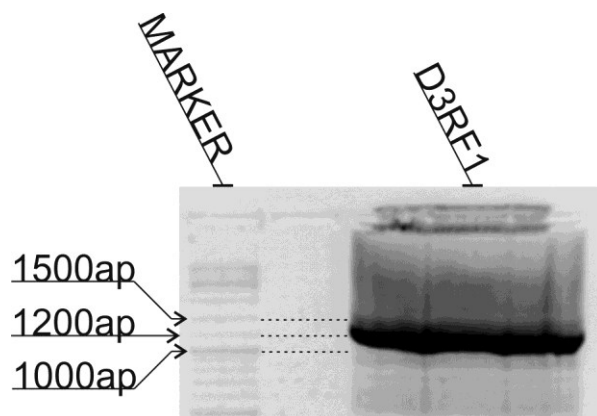
Joonis 9 D3RF1 konstrueerimise etapi 2A PCR-i produktid agarosgeelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurus, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemiku jääv geelibänd.

Geelist eraldatud produktile tehti uus PCR, praimeritega P1 ja AC1. samal ajal tehti ka prfA(RF1) mallile uus PCR praimeritega AC2 ja P4. PCR produktid eraldati segust 1% agarosgeelil elektroforeesi teel (joonis 10). Geelil rajal, kus PCR-i produktid praimeritega AC1 ja P4, oli näha mitut produkti ning nendest kasutati edasi neid, mis olid õiges suurusvahemikus. Geelilt eraldatud produktid *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. Eraldatud DNA lõigud tähistatud RF1SL-P1AC1 ja RF1-AC2P4.



Joonis 10 D3RF1 konstrueerimise etapi 3A PCR-i produktid agarosgeelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurused, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemikesse jäävad geelibändid.

Valmistatud uus PCR-i segu kuhu lisati mõlemat produkti eelnevast PCR-ist. Reaktsioonis kasutati primereid P1 ja P4. Reaktsioonisegust puhastatud DNA 1% agaros geelil, elektroforeesi teel (joonis 11) ning eraldati geelilt *Genejet Gel Extraction Kit*-ga. Eraldatud Produktil mõõdeti kontsentratsioon Nanodrop 2000c-ga ning tähistati kui D3RF1.



Joonis 11 D3RF1 konstrueerimise etapi 4A PCR-i produktid agarosgeelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurused, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemiku jääv geelibänd.

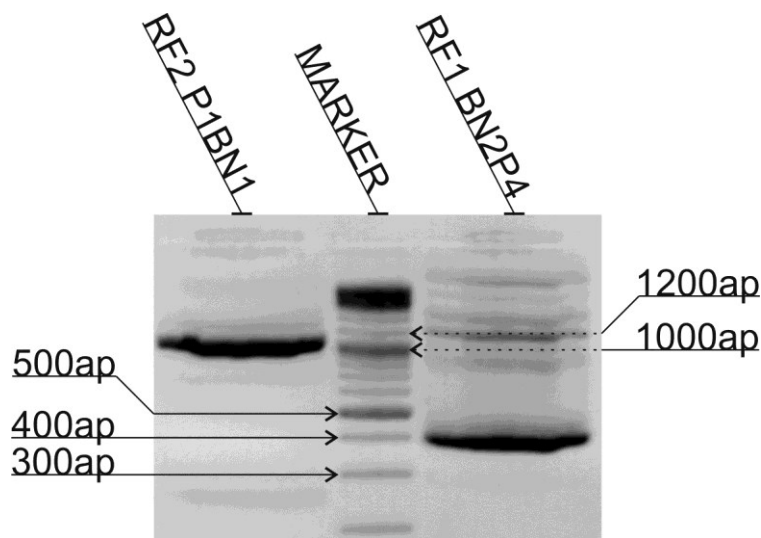
D3RF1 kontrolliti järjestuse tasemel sekveneerimisega. Sekveneerimisel kasutatud primereid P1 ja R6. Edasi tehti D3RF1 ja pQE60(RF1)-le restriksioon *AvaI* ja *CeIII*-ga. Produktid puhastati reaktsioonisegust 1% agaros geelil elektroforeesi teel ning eraldati geelist kasutades *Genejet Gel Extraction Kit*-i. Restriksiooni produktid ligeeriti ning transformeeriti *E.coli M15* tüvesse.

Transformatsiooni tassilt viidi neli kolooniat 2ml 2YT+AMP söötmesse ning kasvatati üleöö 37°C juures. Rakukultuurist eraldati plasmiidne DNA kasutades miniprep meetodit. Produkt saadeti sekveneerimisele praimerite P1 ja P4, sekveneerimise joondused toodud lisas 1.

Kolooniatest, kus sekveneerimine kinnitas mutantse geeni olemasolu, valiti üks ning kasvatati rakukultuurid valgu eraldamiseks.

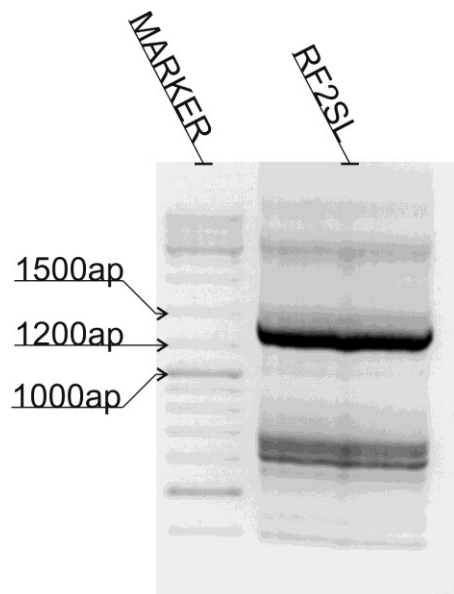
6.2.3 D3RF2 geeni konstrueerimine

D3RF2 konstrueerimine toimus analoogiliselt D3RF1 omale. prfA(RF1) ja prfB(RF2) konstrueerimismallidele tehtud PCR-id: prfA puhul kasutati praimerite paari BN2 ja P4, prfB aga praimerite paari P1 ja BN1. PCR produktid puhastati segust 1,5% agarosgeelil, elektroforeesi teel (joonis 12) ning eraldati geelilt *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. Produktid märgistatud vastavalt RF2P1BN1 ja RF1BN2P4.



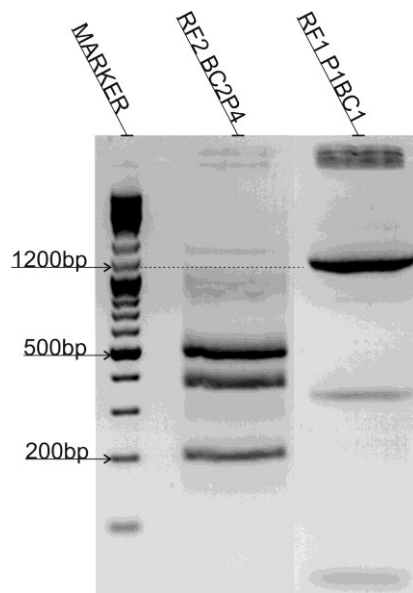
Joonis 12 D3RF2 konstrueerimise etapi 1B PCR-i produktid agarosgeelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurus, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemikesse jäävad geelibändid.

Valmistatud uus PCR-i segu, kuhu lisati RF2P1BN1 ja RF1BN2P4 eraldatud bändid eelmisest etapist ning praimerid P1 ja P4. PCR produktid puhastati segust 1% agarosgeelil (joonis 13). Geeli rajal, kus paiknes PCR-i produktid, oli näha mitut produkti, millest eraldari ainult need, mis paiknesid õiges suurusvahemikus. Geelilt eraldati produkt *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. Produkt nimetatud RF2SL.



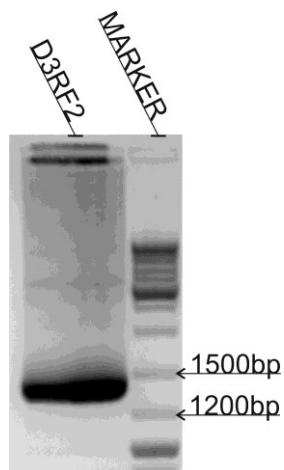
Joonis 13 D3RF2 konstrueerimise etapp 2B PCR-i produktid agaros geelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurused, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemiku jääv geelibänd.

Geelist eraldatud RF2SL-e tehti uus PCR, praimeritega P1 ja BC1. samal ajal tehti ka prfB(RF2) mallile uus PCR praimeritega BC2 ja P4. PCR produktid puhastati segust 1% agarosgeelil, elektroforeesi teel (joonis 14). Geelilt eraldati umbes 1200 aluspaari pikkune DNA, *Genejet Gel Extraction Kit*-i abil. Eraldatud DNA lõigud tähistatud RF2SL-P1BC1 ja RF2BC2P4.



Joonis 14 D3RF2 konstrueerimise etapp 3B PCR-i produktid agaros geelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurused, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud Generuler DNA Ladder Mix. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemikesse jäävad geelibändid.

Valmistatud uus PCR-i segu kuhu lisati mõlemat produkti eelnevast PCR-ist. Reaktsioonis kasutati primereid P1 ja P4. Reaktsioonisegust puhastatud DNA 1% agaros geelil, elektroforeesi teel (joonis 15) ning eraldati geelilt *Genejet Gel Extraction Kit*-ga. Eraldatud Produktil mõõdeti kontsentratsioon Nanodrop 2000c-ga ning tähistati kui D3RF2.



Joonis 15 D3RF2 konstrueerimise etapp 4B PCR-i produktid agaros geelil. Nooltega märgitud suurusmarkeri bändide suurused, mille ligidusse jäid oodatud PCR-i produktid. Suurusmarkerina kasutatud *Generuler DNA Ladder Mix*. Geelist lõigati välja ära märgitud vahemiku jääv geelibänd.

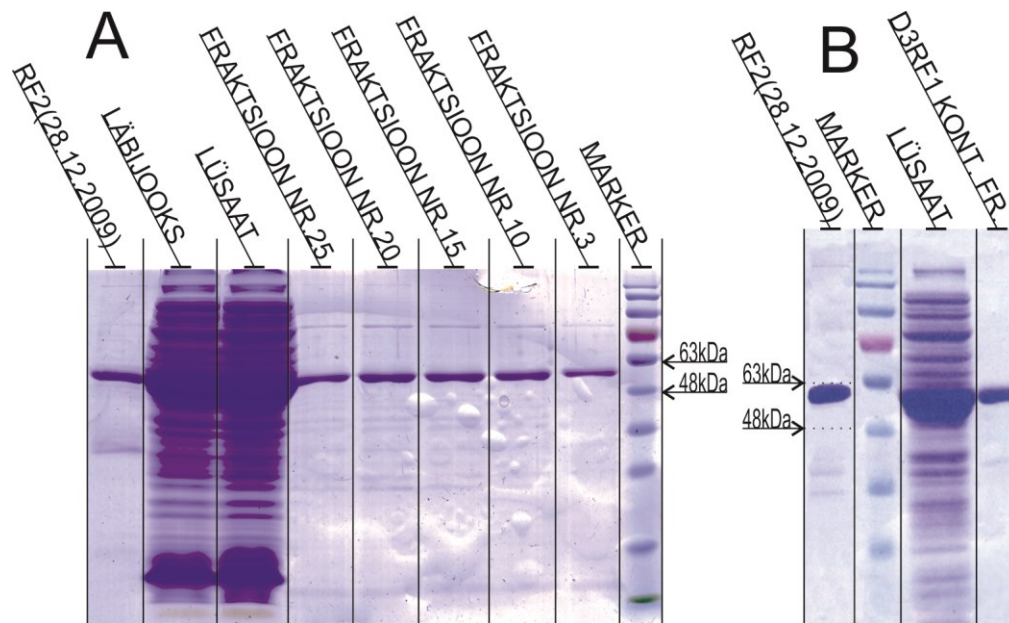
Geelist eraldatud bänd D3RF2, mida kontrolliti sekveneerimisega. Sekveneerimiseks kasutatud primereid P1 ja R6. Edasi tehti D3RF2 ja pQE60(RF2)-le restriksioon *AvaI* ja *CelII*-ga. Produktid puhastati reaktsioonisegust 1% agarosgeelil elektroforeesi teel ning eraldati geelist kasutades *Genejet Gel Extraction Kit*-i. Restriksiooni produktid ligeeriti, kasutades T4 ligaasi ning transformeeriti *E.coli M15* tüvesse.

Transformatsiooni tassilt viidi neli kolooniat 2ml 2YT+AMP söötmesse ning kasvatati üleöö 37°C juures. Rakukultuurist eraldati plasmiidne DNA kasutades miniprep meetodit. Produkt saadeti sekveneerimisele praimerite P1 ja P4, sekveneerimise joondused toodud lisas 2. Korraliku sekveneerimistulemustega ning õiget järjestust sisaldavatest kolooniatest valitud üks, millest kasvatati rakukultuurid valgu eraldamiseks.

6.2.4 D3RF1 ja D3RF2 valgu eraldamine

Mutageneesi tulemusel saadi *E.coli* rakud, milles oli mutantset vabanemise faktori geeni sisaldav pQE60 plasmiid. Edasi tehti vastavalt meetodile: rakkude üles kasvatamine, lüüs ning valgu eraldus Ni-NTA agaros kolonnil, . Kätte saadi fraktsioonid D3RF1 ja D3RF2 valguga, mis

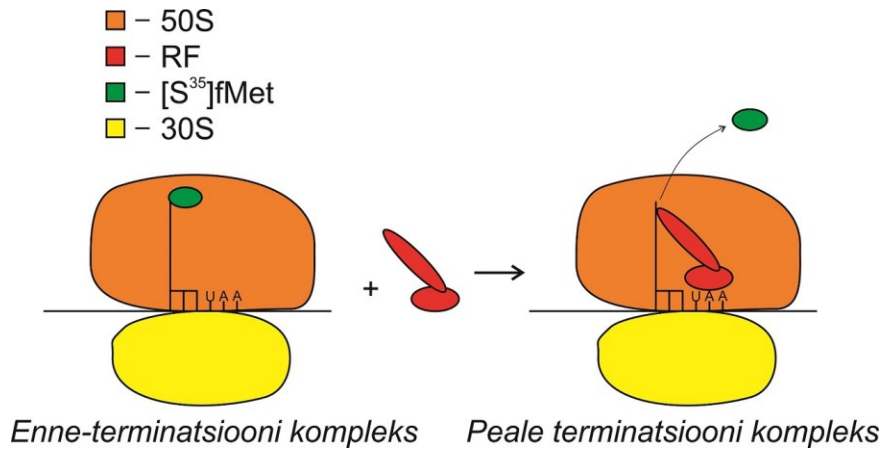
kontsentreeriti tsentrifugaalfiltril ja kontrolliti SDS-PAAG geelil elektroforeesi teel (joonis 16) SDS-PAAG geel tehtud vastavalt „Molecular Cloning Third Edition“ (Sambrook ja Russell, 2001). Valk säilitati -80°C juures 20% glütseroolis.



Joonis 16 D3RF1 ja D3RF2 fraktsioonide kontroll 12% SDS-PAAG geelil. A-D3RF2 puhastamisel Ni-NTA kolonnil saadud fraktsioonide kontroll, lisaks sellele ka proov kolonnile kantud lüsaadist ja proov kolonni läbijooksust(pesupuhver ja elueerimisel. Referentsiks kasutatud eelnevalt puhastatud RF2(Margus Leppik, 28.12.2009). B-D3RF1 puhastamisel kogutud fraktsioonid peale filtreerimist tsentrifugaalfiltril, lisaks proov kolonnile kantud lüsaadist ning eelnevalt eraldatud RF2(Margus Leppik, 28.12.2009). Referentsiks kasutatud eelnevalt puhastatud RF2(28.12.2009).

6.3 RF-de aktiivsuse mõõtmine

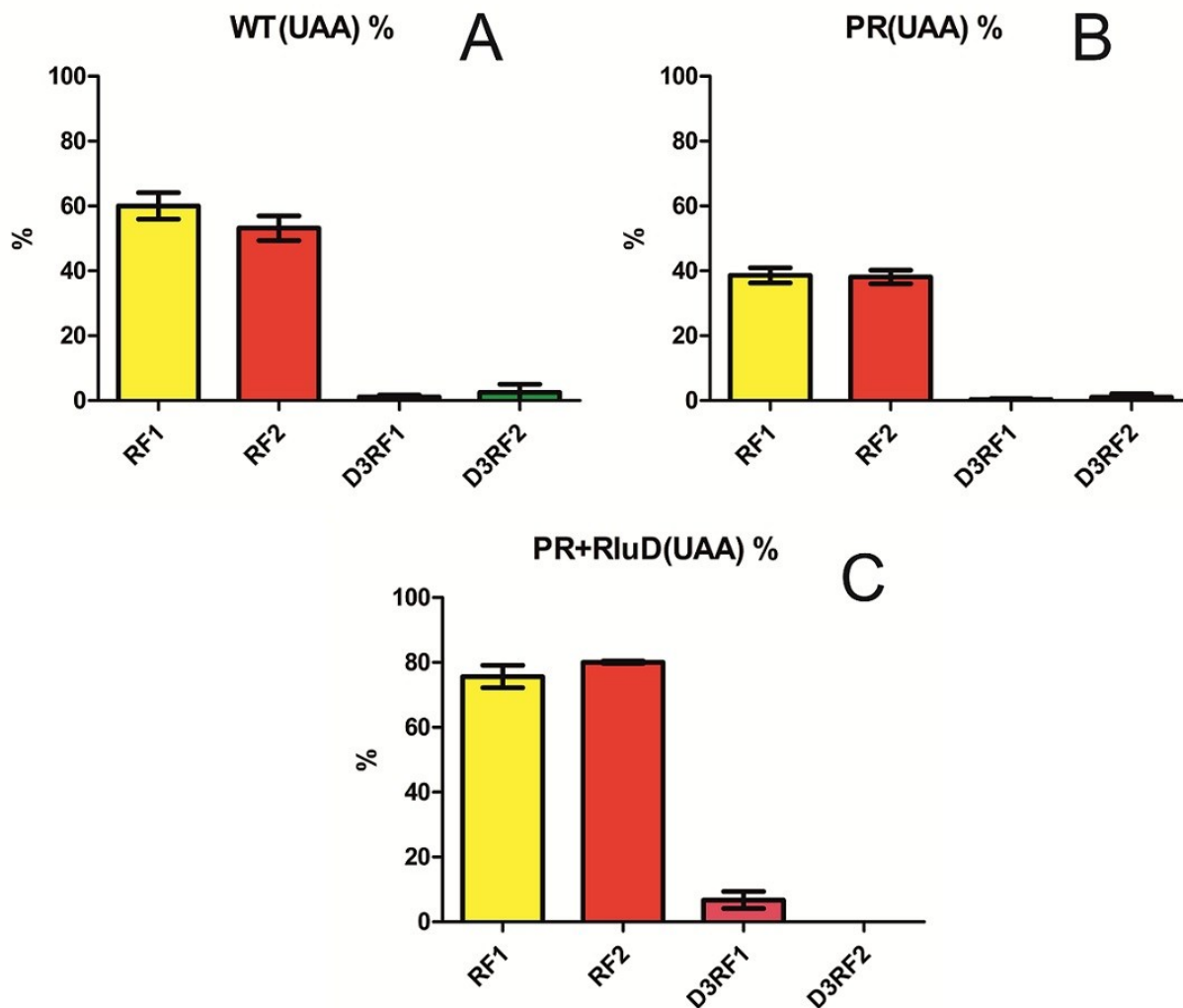
Vabanemisfaktorite (RF) aktiivsust mõõdetud $[S^{35}]fMet$ vabanemisega terminatsiooni kompleksist.



Joonis 17 fMet-i vabanemine 70S terminatsiooni kompleksist. Üldine skeem, kuidas RF-id seonduvad ribosoomi A-saiti ning vabastavad $[S^{35}]fMet$ -i tRNA küljest ribosoomi P-saidis.

fMet-i küljes oleva radioaktiivse märgise signaali mõõdetud Perkin Elmer Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR-iga. Negatiivse kontrollina kasutati reaktsioonisegu ilma vabanemisfaktorita (foon) ning positiivseks kontrollis lisati reaktsiooni segusse vabanemisfaktori asemel puromütsiini. Algsed mõõtmistulemused toodud lisas 3. Katse tulemustest lahutatud foon ning teades radioaktiivselt märgistatud fMet-i eriaktiivsust (dpm/pmol), lagunemisaega ning tootmiskuupäeva sai välja arvutada vabanenud fMet-i hulk pikomoolides. Selleks, et võrrelda erinevate katsete tulemusi, arvutati välja fMet-i vabanemise protsent positiivse kontrolli suhtes (puromütsiin).

Vabanemisfaktorite (RF1, RF2, D3RF1 ja D3RF2) aktiivsust mõõdeti kõigepealt metsiktüüpi, pseudorevetantsete ning RluD-ga töödeldud pseudorevertantsete ribosoomidest vabanenud fMet signaalina. Stoppkoodoniks ehk koodoniks, mis terminatsiooni kompleksis jääb ribosoomi A-saiti, oli UAA. Katse tulemused esitatud vabanenud fMet-i koguste protsenditena, positiivse kontrolli suhtes (joonis 18).

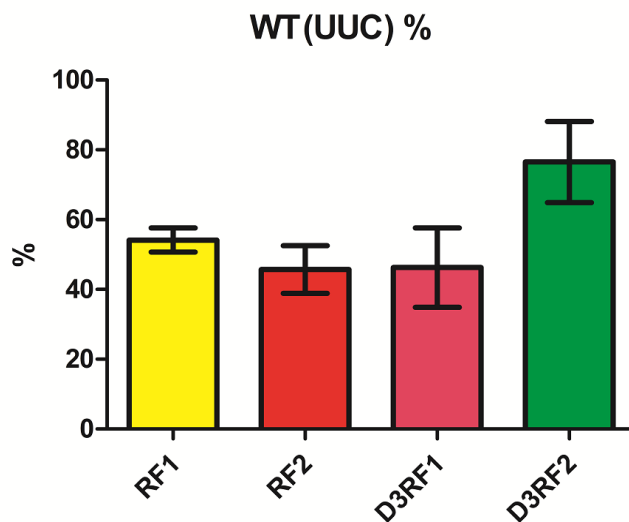


Joonis 18 vabanemiskompleksi vabastatud fMet-i kogus protsentides, stoppkoodoni UAA esinemisel ribosoomi A-saidis: metsiktüüpi ribosoomides(A), pseudorevertantides(B) ning pseudorevertantides, mida on töödeldud RluD-ga(C). Y-teljel toodud vabanenud fMet-i kogus võrreldes positiivses kontrollis puromütsiini toimel vabanenud fMet-iga. X-teljel toodud vabanemiskompleksid, millega reaktsiooni läbi viidi.

Joonistel 18 on toodud vabanenud fMet-i suhteline kogus protsentides, stoppkoodoni UAA esinemisel ribosoomi A-saidis. Joonisel 18A kasutati metsiktüüpi ribosoomide. Joonisel 18B kasutati mutantseid ribosoomide, milles puuduvad pseudouridiinid 23S rRNA heeliks 69-s. Joonisel 18C kasutati mutantseid ribosoomide, milles puuduvad pseudouridiinid 23S rRNA heeliks 69-s olid sünteesitud RluD poolt *in vitro*. Jooniselt 18A on näha, et RF1 ja RF2 töötavad normaalselt metsiktüüpi ribosoomide olemasolul, kuid D3RF1 ja D3RF2 omavad minimaalset katalüütilist aktiivsust. Joonisel 18B on näha, et RF1 ja RF2 töötavad kehvemini mutantsetes ribosoomides ning D3RF1 ja D3RF2 omavad väga väikest katalüütilist aktiivsust. Lisaks sellele on metsiktüüpi RF-de aktiivsus hüdrolüüsida estersidet tRNA ja fMet-i vahel võrdne

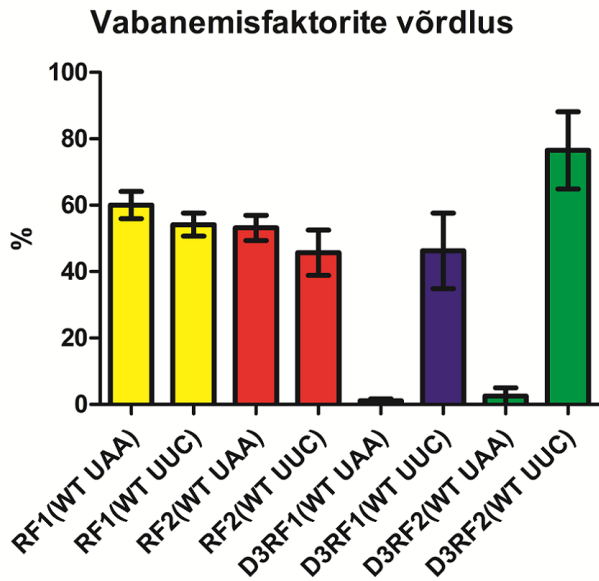
pseudouridiini puudumisel 23S rRNA heeliks 69-s, mis on vastuolus eelnevates publikatsioonides avaldatud tulemustega. (Kipper jt. 2011) Joonisel 18C on näha, et RF1 ja RF2 aktiivsus taastub kui pseudorevertantseid ribosome töödelda RluD-ga ning tundub olevat isegi parem kui metsiktüüpi ribosoomide puhul, kuid D3RF1 ja D3RF2 on ikka minimaalne.

Lisaks sellele kontrolliti RF-ide aktiivsust metsiktüüpi ribosoomides, kus stoppkoodoni asemel oli fenüülalaniini koodon, UUC, ribosoomi A-saidis.



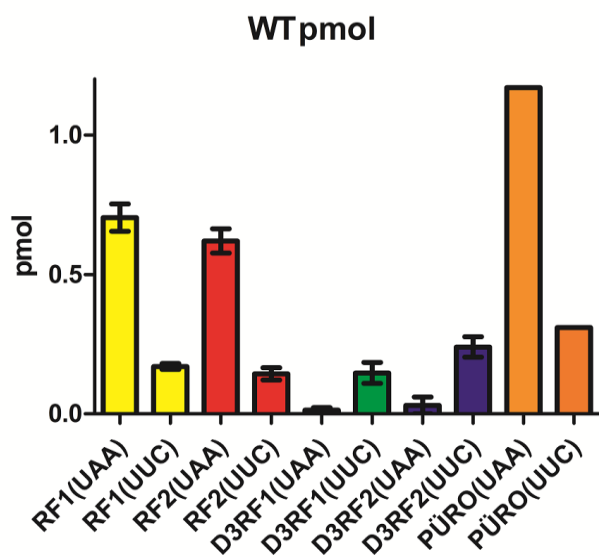
Joonis 19 vabanemiskompleksi poolt vabastatud fMet-i kogus protsentides, metsiktüüpi ribosoomides, koodoni UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Y-teljel toodud vabanenud fMet-i kogus võrreldes positiivses kontrollis puromütsiini toimel vabanenud fMet-iga. X-teljel toodud vabanemiskompleksid, millega reaktsiooni läbi viidi.

Joonisel 19 on toodud vabanenud fMet-i suhteline kogus protsentides, koodoni UUC esinemisel. Kasutatud metsiktüüpi ribosome. Jooniselt 19 on näha, et kõik RF-d suudavad hüdrolüüsida estersidet tRNA ja peptiidahela vahel, UUC koodoni juuresolekul. Lisaks sellele näitab D3RF2 suuremat efektiivsust, kui metsiktüüpi RF2. Joonisel 20 on võrreldud valkude suhtelisi efektiivsusi sõltuvalt koodonist.



Joonis 20 Võrdlus vabanemistfaktorite poolt vabastatud fMet-i koguste vahel (protsentides), metsiktüüpi ribosoomides, koodonite UAA või UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Y-teljel toodud vabanenud fMet-i kogus võrreldes positiivses kontrollis puromütsiini toimel vabanenud fMet-iga. X-teljel toodud vabanemistfaktorid, millega reaktsiooni läbi viidi ning mis koodoni A-saidis esines.

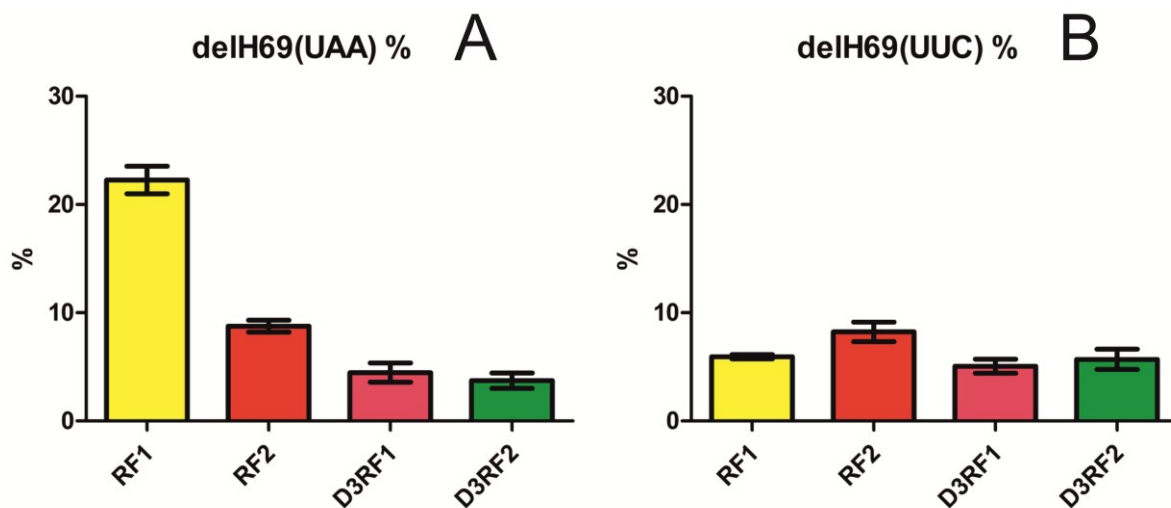
Kuna RF1-l ja RF2-l on näiliselt peaaegu sama efektiivsus nii koodoni UUC kui ka UAA esinemisel ribosoomi A-saidis, siis võrreldud ka vabanenud fMet-i koguseid pikomoolides (joonis 21).



Joonis 21 Võrdlus vabanemistfaktorite poolt vabastatud fMet-i koguste vahel (pikomoolides), metsiktüüpi ribosoomides. Koodoni UAA või UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Y-teljel toodud vabanenud fMet-i kogus pikomoolides. X-teljel toodud vabanemistfaktorid, millega reaktsiooni läbi viidi ning mis koodon A-saidis esines..

Joonisel 21 toodud diagrammilt on näha, et koodoni UUC esinemisel vabaneb mutantse valgu D3RF2 toimel tõepoolest rohkem fMet-i kui RF2 toimel samadel tingimustel. Samas on näha positiivsete kontrollide võrdlusel, et UUC koodoni juures on puromütsiini poolt vabastatud fMet hulk umbes 4 korda väiksem. Seda arvesse võttes tasub katse tulemuste analüüsil lähtuda joonisest 21.

Viimasena kontrolliti aktiivsust ribosoomides, kust puudus heeliks 69 ribosoomi 23S rRNA-st. Katse tehti nii stoppkoodoni UAA kui ka koodoni UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Vabanemistegurite katalüütilise aktiivsuse suhtelised väärtused toodud joonisel 22.



Joonis 22 Vabanemistegurite poolt vabastatud fMet-i kogus protsentides, kus puudub heeliks 69. A-koodoni UAA või B-koodoni UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Y-teljel toodud vabanenud fMet-i kogus võrreldes positiivses kontrollis puromütsiini toimel vabanenud fMet-iga. X-teljel toodud vabanemistegurid, millega reaktsiooni läbi viidi.

Joonistel 22 on toodud tulpdiaagramm vabanenud fMet-i suhteline kogus ribosoomidest, kus puudub heeliks 69 23S rRNA-s. Joonisel 22A fMet-i suhtelised kogused stoppkoodoni UAA puhul ning joonisel 22B koodoni UUC esinemisel ribosoomi A-saidis. Joonisel 22A on näha, et kõikide valkude aktiivsus on mõjutatud heeliks 69 puudumisest, kuid selle mõju RF1-le on väiksem kui teiste RF-de puhul. Joonisel 22B on näha, et kõikide valkude aktiivsus on väga väike koodoni UUC esinemisel.

7 Arutelu

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli konstrueerida vabanemisfaktorite mutantsete geenid, milles oleks vahetatud vabanemisfaktorite lüliti lüli piirkonda kodeerivad osad RF1 ja RF2 vahel. Teiseks eesmärgiks oli konstrueeritud geenide ekspresseerimine ning lahustuva valguga eraldamine rakkudest. Kolmandaks eesmärgiks oli kontrollida mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsust metsiktüüpi valkude vastu.

Selleks, et kontrollida lüliti lüli ning seda ümbritsevate alade paigutust nii RF1-s kui ka RF2-s, võrreldud kahe valguga röntgenkristallograafia struktuure *T.thermophiliuse* HB27 tüves (joonis 6).

Lisaks sellele, tehtud homoloogia modelleerimine *T.thermophilus* HB27 ning *E.coli* K12MG1655 vabanemisfaktoritele, et näha kas ja kui sarnased võivad olla kahe organismi vabanemisfaktorid (joonised 4 ja 5).

Homoloogia modelleerimine näitas, et vabanemisfaktorite RF1 ja RF2 erinevused üldises struktuuris (Joonis 4A, 5A) on minimaalsed ning lüliti lüli ja seda ümbritsevad piirkonnad võivad olla piisavalt sarnased selleks, et kasutada *T.thermophiliuse* tertsiaalstruktuure *E.coli* vabanemisfaktorite struktuuri ja funktsiooni analüüsil. *T.thermophiliuse* HB27 vabanemisfaktorite struktuuride võrdlemisel (Joonis 6) selgus, et ainult lüliti lüli ära vahetamisel (Joonis 6C) võib muutuda domään 3 pikkus, mis omakorda mõjutab GGQ motiivi paigutust. GGQ motiivi korrektne paiknemine on vajalik vabanemisfaktorite katalüütilist aktiivsuse tagamiseks. (viide) Seda arvestades vahetatud ära kogu domään 3 α -heeliks ning lüliti lüli C-terminuse külgnev piirkond, et vähendada GGQ motiivi paiknevuse muutumist valguga tertsiaalstruktuuris (joonis 6B ja 6C).

Peale mutantsete vabanemisfaktorite eraldamist rakkudest, üritatud valke lahustada 50% glütseroolis. Mutantsed vabanemisfaktorid sadenesid 50% glütseroolist välja, kuid 20% glütserooli juures olid lahustuvad. See viitas valkude konformatsiooni muutustele, võrreldes metsiktüüpi vabanemisfaktoritega.

In vitro aktiivsuse katsed näitasid, et mutantsete vabanemisfaktorid olid stoppkoodoni UAA olemasolul praktiliselt inaktiivsed nii metsiktüüpi ribosoomides kui ka mutantsetes ribosoomides. Fenüülalaniini koodoni UUC juures oli, võrreldes metsiktüüpi vabanemisfaktoritega, mutantsetel valkudel aktiivsus olemas ning D3RF2 puhul isegi kõrgem. Samas tuleb võtta arvesse, et selles katses puromütsiini poolt vabastatud fMet-i hulk ligikaudu 4 korda madalam, kui UAA koodoniga katses (joonis 21). Vaadates aga joonist 21 on näha, et mutantsete

vabanemisfaktorite D3RF1 ja D3RF2 toimel vabanes rohkem fMet-i kui metsiktüüpi vabanemisfaktorite RF1 ja RF2 puhul. Seda arvesse võttes saab öelda, et mutantsed vabanemisfaktorid omavad paremat aktiivsust UUC koodoni juures kui metsiktüüpi vabanemisfaktorid.

Koodonspetsiifilisuse kadumine ning sellega seoses tekkinud aktiivsus mutantide puhul, võib olla tingitud konstrueeritud vabanemisfaktorite tertsiaalstruktuuri muutusest, mille tõttu on nende valguline antikoodon motiiv muutunud. Sellele annab toetust eelnevates publikatsioonides näidatud koodon-antikoodon lugemise spetsiifika, mis oleneb aminohappe ja nukleotiidi interaktsioonidest. (Ito jt. 2000) Mõlemal nii RF1 kui ka RF2 on spetsiifilisus stoppkoodonis uridiini esinemisele esimeses positsioonis. Erinevus kahe vabanemisfaktori koodon spetsiifilisuse vahel tuleneb nende interaktsioonist nukleotiidiga stoppkoodoni teises positsioonis, mis võib mängida rolli mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsuses UUC koodoni olemasolul. Stoppkoodoni kolmanda nukleotiidil ei ole näidatud suurt mõju koodon-antikoodon seondumisele. (Ito jt. 2000)

Üks potentsiaalseid seletusi madalale aktiivsusele mutantide puhul oli valgu tertsiaalstruktuuri muutus, mille tõttu võis olla nende seondumine ribosoomile takistatud või aeglustatud. Selle testimiseks tehtud aktiivsuse kontroll ribosoomides, stoppkoodoni UAA ja koodoni UUC olemasolul, milles puudus heeliks 69. Tulemustest on näha, et nii metsiktüüpi kui ka konstrueeritud valkude aktiivsus on madalam kui metsiktüüpi ribosoomide puhul. See, et heeliks 69 puudumine mõjutab tugevalt vabanemisfaktorite aktiivsust, vastab ka eelnevalt avaldatud andmetele. (Ali jt. 2006) Kui võrrelda kõiki kasutatud vabanemisfaktoreid, siis on näha et heeliks 69 kaotamine ribosoomidest, vähendab nii metsiktüüpi kui ka konstrueeritud vabanemisfaktorite aktiivsust, kuid ei inhibeeri neid täielikult. See võib tähendada, et konstrueeritud vabanemisfaktoritel on olemas katalüütiline aktiivsus, kuid nad ei ole võimelised efektiivselt seonduma ribosoomiga. Seda teooriat toetavad publikatsioonid, mis on näidanud et õiged interaktsioonid ribosoomi struktuuridega aitavad kaasa vabanemisfaktori domään 3 korrektsele paiknemisele ning katalüütilise aktiivsuse tagamisele.

Viimasena vaadatud pseudouridiinide olemasolu mõju mutantsetele vabanemisfaktoritele. Mutantsed vabanemisfaktorid ei omanud aktiivsust standardsetes terminatsiooni tingimustes ja nende aktiivsus fenüülalaniini koodoni esinemisel oli võrreldes metsiktüüpi valkudega väike. Selle tõttu ei ole võimalik välja tuua nende erinevusi interaktsioonides heeliks 69-ga, kus on või ei ole pseudouridiine.

8 Kokkuvõte

Töö esimeseks eesmärgiks oli mutantsete vabanemisfaktori geenide konstrueerimine.

Homoloogia modelleerimise alusel otsustatud omavahel ära vahetada lüliti lingu ning sellega külgnevate järjestuste piirkonnad, mis sisaldas endas vabanemisfaktorite domään 3 α -heeliksit, lüliti lingu ja domään 4 N-terminaalset otsa. Töö teiseks eesmärgiks oli konstrueeritud valgude ekspressioon ja eraldamine ning kolmandaks mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsuse mõõtmine erinevatel tingimustel. Töö viimane eesmärk oli mutantsete vabanemisfaktorite aktiivsuse analüüs, sõltuvalt pseudouridiinide olemasolust ribosoomi 23S rRNA heeliks 69-s.

Töös õnnestus konstrueerida mutantsete vabanemisfaktorite geenid ning need edukalt ekspresseerida *E.coli* M15 tüves. Samamoodi õnnestus nendest rakkudest eraldada mutantsete vabanemisfaktorid lahustuval kujul. Vabanemisfaktorite aktiivsus katsed sooritati edukalt, kuid mutantsetel vabanemisfaktoritel, milles olid ära vahetatud lüliti lingu piirkonnad kahe valgu vahel, puudus võime hüdrolüüsida estersidet tRNA ja fMet-i vahel, stoppkoodoni UAA esinemisel ribosoomi A-saidis. Oli üllatav, et mutantsetel RF-idel oli aktiivsus metsiktüüpi ribosoomides, kus ribosoomi A-saidis asetses UUC koodon.

Töö viimaseks eesmärgiks oli analüüsida aktiivsuskatsete tulemusi, et vastata küsimusele: kas RF1 ja RF2 sõltuva terminatsiooni erinev tundlikkus pseudouridiinide olemasolu või puudumise suhtes heeliksis 69 tuleneb erinevustest vabanemisfaktorite lüliti lingu interaktsioonides heeliks 69-ga. Sellele küsimusele ei leitud vastust, sest mutantsetel vabanemisfaktoritel puudus aktiivsus terminatsiooni standardsetel tingimustel.

9 Summary

„Release factor RF1 and RF2 switch loop interactions with pseudouridines in ribosome 23S rRNA helix 69.“

First objective of this work was to construct mutant release factor genes. Based on homology modeling, we replaced the “switch loop” along with adjacent regions, composed of α -helix of domain 3, switch loop and N-terminal end of domain 4. The second objective of this work was expression and isolation of mutant proteins and third objective was to measure the named protein's activity on different conditions. The last objective of this work was to analyze the activity of mutant release factors depending on the existence of pseudouridines in ribosome 23S rRNA helix 69.

We were able to construct the mutant genes of release factors and express them successfully in *E.coli* M15 cells. We were also able to isolate the mutant release factors in soluble form. The activity measurements of mutant release factors was carried out successfully, but the mutant release factors, with switched region of switch loop, had no catalytical activity to hydrolyze the ester bond between tRNA and fMet, in the presence of stop codon UAA in ribosome A-site. It was surprising that the mutant release factors had catalytical activity in the presence of UUC codon in ribosome A-site.

Presence of pseudouridines in the H69 of 23S RNA is known to affect RF-2 activity but not RF-1. (Kipper jt. 2011) The last objective in this work was to analyze the activity measurements in order to find whether or not this difference is due the interaction pattern of “switch loops” of RF's and H69 of 23S rRNA. The answer to the question could not be given, because the mutant release factors had no activity on normal conditions.

10 Tänuavaldused

Tänan Kalle Kipperit ning Aivar Liiva sisuka ning praktilise juhendamise eest. Tänan Rain Hindrimäed abistamise eest katsete tegemisel.

11 Kasutatud kirjanduse loetelu

- Ali, IK., Lancaster, L., Feinberg, J., Joseph, S., Noller, HF. (2006). Deletion of a conserved, central ribosomal intersubunit RNA bridge. *Mol Cell.*, 23, 865-874.
- Beaudet, A. L., Caskey, C. T. (1971). Mammalian Peptide Chain Termination, II. Codon Specificity and GTPase Activity of Release Factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 619-624.
- Buckingham, R. H., Grentzmann, G., Kisselev, L. (1997). Polypeptide chain release factors. *Mol. Microbiol.* 24, 449-456.
- Capecchi, MR. (1967). Polypeptide chain termination in vitro: isolation of a release factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 58, 1144-1151.
- Ero, R., Leppik, M., Liiv, A., Remme, J. (2010). Specificity and kinetics of 23S rRNA modification enzymes RlmH and RluD. *RNA*, 16, 2075-84.
- Frolova, LY., Tsivkovskii, RY., Sivolobova, GF., Oparina, NY., Serpinsky, OI., Blinov, VM., Tatkov, SI., Kisselev, LL. (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, 1014-1020.
- Gualerzi, CO., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, C., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J., Pon, CL. (2001). Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 66, 363-376.
- Ito K, Uno M, Nakamura Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature*, 403, 680-684.
- Kipper, K. 2011. Studies on the role of helix 69 of 23S rRNA in the factor-dependent stages of translation initiation, elongation, and termination. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- Kipper, K., Sild, S., Hetényi, C., Remme, J., Liiv, A. (2011). Pseudouridylation of 23S rRNA helix 69 promotes peptide release by release factor RF2 but not by release factor RF1. *Biochimie.* 93, 834–844.
- Koonin, E. V. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic Acids Research*, 24, 2411–2415

- Konecki, D. S., Aune, K. C., Tate, W., Caskey, C. T. (1977). Characterization of Reticulocyte Release Factor. *J. Biol. Chem.* 252, 4514-4520.
- Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W.G., Noller, H.F. (2008). Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *PNAS*, 105, 19684-19689.
- Leppik, M., Peil, L., Kipper, K., Liiv, A., Remme, J. (2007). Substrate specificity of the pseudouridine synthase RluD in *Escherichia coli*. *FEBS J.*, 274, 5759-66.
- Mora, L., Zavialov, A., Ehrenberg, M., Buckingham, R. H. (2003). Stop codon recognition and interactions with peptide release factor RF3 of truncated and chimeric RF1 and RF2 from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 50, 1467-1476.
- O'Connor, M., Gregory, S. T. Inactivation of the RluD Pseudouridine Synthase Has Minimal Effects on Growth and Ribosome Function in Wild-Type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 193, 154–162.
- Raychaudhuri S, Conrad J, Hall BG & Ofengand J. (1998). A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* 4, 1407–1417.
- Sakakibara, Y., Chow, C.S. (2012). Role of pseudouridine in structural rearrangements of helix 69 during bacterial ribosome assembly. *ACS Chem Biol.*, 7, 871-8.
- Sambrook, Russell, 2001 „Molecular Cloning Third Edition“.
- Schmeing, T.M., Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature.*, 461, 1234-42.
- Siibak, T., Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA.*, 16, 2023-32.
- Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., Klaholz, B.P., Yusupov, M. (2009). A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell Mol Life Sci.*, 66, 423-436.

12 Lisa 1

		1		100
D3_RF1_pQE60	(1)	CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATC		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(1)	-----		
		101		200
D3_RF1_pQE60	(101)	ATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCG-TATCACGAGGCCCTTTCGTCTTACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATT		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(1)	-----ATTGGGCGCTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATT		
		201		300
D3_RF1_pQE60	(200)	ATAATAGATTCAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAGCCTTCTATCGTTGCCAAACTGGAAGCCC		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(84)	ATAATAGATTCAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAGCCTTCTATCGTTGCCAAACTGGAAGCCC		
		301		400
D3_RF1_pQE60	(300)	TGCATGAACGCCATGAAGAAGTTTCAGGCGTTGCTGGGTGACGCGCAACTATCGCCGACCAGGAACGTTTTTCGCGCATTATCACGCGAATATGCGCAGTT		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(184)	TGCATGAACGCCATGAAGAAGTTTCAGGCGTTGCTGGGTGACGCGCAACTATCGCCGACCAGGAACGTTTTTCGCGCATTATCACGCGAATATGCGCAGTT		
		401		500
D3_RF1_pQE60	(400)	AAGTGATGTTTTTCGCGCTGTTTTACCAGCTGGCAACAGGTTTCAGGAAGATATCGAAACCGCACAGATGCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCG		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(284)	AAGTGATGTTTTTCGCGCTGTTTTACCAGCTGGCAACAGGTTTCAGGAAGATATCGAAACCGCACAGATGCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCG		
		501		600
D3_RF1_pQE60	(500)	CAGGTGAACGCGCAAGCTAAAGAAAAAGCGGCAACTGGAACAGCAATTACAGGTTCTGTACTGCCAAAAGATCCTGATGACGAACGTAACGCCT		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(384)	CAGGTGAACGCGCAAGCTAAAGAAAAAGCGGCAACTGGAACAGCAATTACAGGTTCTGTACTGCCAAAAGATCCTGATGACGAACGTAACGCCT		
		601		700
D3_RF1_pQE60	(600)	TCCTCGAAGTCCGAGCCGAACCGCGCGCACGAAGCGGCGCTGTTTCGCGGGCGATCTGTTCCGATGTACAGCCGTTATGCCGAAGCCCGCGCTGGCG		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(484)	TCCTCGAAGTCCGAGCCGAACCGCGCGCACGAAGCGGCGCTGTTTCGCGGGCGATCTGTTCCGATGTACAGCCGTTATGCCGAAGCCCGCGCTGGCG		
		701		800
D3_RF1_pQE60	(700)	GGTAGAAATCATGAGCGCCAGCGAGGTTGAACATGGTGGTTATAAAGAGATCATCGCCAAAATAGCGGTGATGGTGTGTATGGTCTGTAATTTGAA		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(584)	GGTAGAAATCATGAGCGCCAGCGAGGTTGAACATGGTGGTTATAAAGAGATCATCGCCAAAATAGCGGTGATGGTGTGTATGGTCTGTAATTTGAA		
		801		900
D3_RF1_pQE60	(800)	TCCGGCGGTCATCGCGTGAACGTTTCTCTGCTACGGAATCGCAGGTCGATTATCATACTTCTGCTTGTACCGTTGCGGTAATGCC-AGAACTGCCTGAC		
D3RF1PCRR6	(1)	-----		
P1_PCR_FRAG	(684)	TCCGGCGGTCATCGCGTGAACGTTTCTCTGCTACGGAATCGCAGGTCGATTATCATACTTCTGCTTGTACCGTTGCGGTAATGCC-AGAACTGCCTGAC		
		901		1000
D3_RF1_pQE60	(899)	GCAGAA-CTGCCGACATCAACCCAGCAGATTTACGCATTGATACTTTCCGCTCGTCAGGG-GCGGGTGGT CAGCACGTTAACACC-ACCGATT-CGGCA		
D3RF1PCRR6	(1)	-----GCC-GGGGGTGGT-AGCACGTTA-CACC-ACCGATT-CGGCA		
P1_PCR_FRAG	(784)	GCACAACTGCTGGACATCAACCCAGCAGATTTACGCATTGATACTTTCCGCTCGTCAGGGAGCGGGTGGT CAGCACGTTAACACCACCGATTTCGGTA		
		1001		1100
D3_RF1_pQE60	(995)	ATTTCGTATTACTCACTTCCGACCGGGATTGTTGTTGAATGTCAGGACGAACTTCACAACACAAGAACAAGATCAGGCCATGAAGCAGATGAAGCGCA		
D3RF1PCRR6	(38)	ATTTCGTATTACTCACTTCCGACCGGGATTGTTGTTGAATGTCAGGACGAACTTCACAACACAAGAACAAGATCAGGCCATGAAGCAGATGAAGCGCA		
P1_PCR_FRAG	(884)	ATTTCGTT-----		
		1101		1200
D3_RF1_pQE60	(1095)	AGCTTTATGAACTGGAGATGCAGAAGAAAAATGCCGAGAAACAGGCGATGGAAGATAACAAATCCGACATCGGCTGGGGCAGCCAGATTTCGTTCTTATGT		
D3RF1PCRR6	(138)	AGCTTTATGAACTGGAGATGCAGAAGAAAAATGCCGAGAAACAGGCGATGGAAGATAACAAATCCGACATCGGCTGGGGCAGCCAGATTTCGTTCTTATGT		
P1_PCR_FRAG	(891)	-----		
		1201		1300
D3_RF1_pQE60	(1195)	CCTTGATGACTCCCGGTTACCAGTACCAGCATCAACCTGACGCTCTACCCTGGATGAAGTATGGAAGGTAAGCTGGATATGCTGATTGAACCGATT		
D3RF1PCRR6	(238)	CCTTGATGACTCCCGGTTACCAGTACCAGCATCAACCTGACGCTCTACCCTGGATGAAGTATGGAAGGTAAGCTGGATATGCTGATTGAACCGATT		
P1_PCR_FRAG	(891)	-----		
		1301		1400
D3_RF1_pQE60	(1295)	ATCCAGGAACATCAGGCCACCAACTGGCGCGTTGTCGAGCAGGAA-GATTCATCACCATCACCATCACTAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC		
D3RF1PCRR6	(338)	ATCCAGGAACATCAGGCCACCAACTGGCGCGTTGTCGAGCAGGAAAGATCTCATCACCATCACCATCACTAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC		
P1_PCR_FRAG	(891)	-----		
		1401		1500
D3_RF1_pQE60	(1394)	TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTGAGAAGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTTATTTGGTGAGAATCCAAGCTAGCT		
D3RF1PCRR6	(438)	TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTGAGAACA-----		
P1_PCR_FRAG	(891)	-----		

Joonis 23 D3RF1 PCR-i sekveerimistulemuste joondus. Sinise ja punasega toodud kattuvad järjestused sekveerimisandmetest ning kimäärse geeni teoreetilise järjestuse vahel. . Joonduste algused ja lõpud on ebatäpsed tulenevalt sekveerimismeetodist. Esineb ka üksikuid nukleotiide, mis ei joondu, kuid on tegelikult lihtsalt sekveerimistulemustest valesti loetud.

13 Lisa 2

		1		100
pQE-60 (D3RF2)	(1)	AGGGGTTCGCGCACCATTCCCGAAAAGTCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC		
P4 Praimer	(1)	-----		
P1 Praimer	(1)	-----CAATTAAGCGGTATCGCGAGGCC		
		101		200
pQE-60 (D3RF2)	(101)	TTTCGCTTCACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAG		
P4 Praimer	(1)	-----		
P1 Praimer	(25)	TTTCGCTTC-CCTCTAGAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATACATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAG		
		201		300
pQE-60 (D3RF2)	(201)	AATTTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGTTTGAATTAATCCGGTAAATAATCGCATTACGAGCCTCACGGAACGCTCCGACGTTCTTAGGGGTATCT		
P4 Praimer	(1)	-----T		
P1 Praimer	(124)	AATTTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGTTTGAATTAATCCGGTAAATAATCACATTCTTGACCTCACGGAACGCTCCGACGTTCTTAGGGGTATCT		
		301		400
pQE-60 (D3RF2)	(301)	T-GACTACGAC-GCCAAGAAAGA-GCG-TCTGGAAGAA-GTAAACGCCGAGCTGGAACACCCGGATGTCTGGAACGAACCCGAACCGGCACAGGCGCTGG		
P4 Praimer	(2)	G-GACTACGACGCCAAGAAAGAAGCGGCTTTGAAGAAAGTAAACGCCGAGCTGAAACACCCGGATGTCTGGAACGAACCCGAACCGGCACAGGCGCTGG		
P1 Praimer	(224)	TTGACTACGAC-GCCAAGAAAGA-GCG-TCTGGAAGAA-GTAAACGCCGAGCTGGAACACCCGGATGTCTGGAACGAACCCGAACCGGCACAGGCGCTGG		
		401		500
pQE-60 (D3RF2)	(396)	GTAAGAGCGTTCCCTCCCTCGAAGCCGTTGCTGACACCCCTCGACCAATGAAACAGGGGCTGGAAGATGTTTCTGGTCTG-CTGGAACCTGGCTGTAGAAG		
P4 Praimer	(101)	GTAAGAGCGTTCCCTCCCTCGAAGCCGTTGCTGACACCCCTCGACCAATGAAACAGGGGCTGGAAGATGTT-CTGGTCTGGCTGGAACCTGGCTGTAGAAG		
P1 Praimer	(320)	GTAAGAGCGTTCCCTCCCTCGAAGCCGTTGCTGACACCCCTCGACCAATGAAACAGGGGCTGGAAGATGTTTCTGGTCTG-CTGGAACCTGGCTGTAGAAG		
		501		600
pQE-60 (D3RF2)	(495)	CTGACGACGAAGAAACCTTTAACGAAGCCGTTGCTGAACTCGACGCCCTGGAAGAAAACTGGCGCAGCTTGAGTTCCGCCGTATGTTCTCGGCGAATA		
P4 Praimer	(200)	CTGACGACGAAGAAACCTTTAACGAAGCCGTTGCTGAACTCGACGCCCTGGAAGAAAACTGGCGCAGCTTGAGT-CCGCCGTATGTTCTCGGCGAATA		
P1 Praimer	(419)	CTGACGACGAAGAAACCTTTAACGAAGCCGTTGCTGAACTCGACGCCCTGGAAGAAAACTGGAGCAGCTTGTTCTCGGCCGATGTTCTCGGCGAATA		
		601		700
pQE-60 (D3RF2)	(595)	TGACAGCGCCGACTGCTACCTCGATATTCAGGCGGGGCTTGGCGGTACGGAAGCACAGGACTGGGCGAGCATGCTTGAGCGTATGTATCTCGCGTGGGCA		
P4 Praimer	(101)	TGACAGCGCCGACTGCTACCTCGATATTCAGGCGGGGCTTGGCGGTACGGAAGCACAGGACTGGGCGAGCATGCTTGAGCGTATGTATCTCGCGTGGGCA		
P1 Praimer	(519)	TGACAGCGCCGACTGCTACCTCCATATTCAGGCGGGGCTTGGCGGTACGGAAGCACAGGACTGGGCGAGCATGCTTGAGCGTATGTATCTCGCGTGGGCA		
		701		800
pQE-60 (D3RF2)	(695)	GAATCCGGTGGTTTCAAACCTGAAATCATCGAAGAGTGGAAAGTGAATGGCGGGTATAAATCCGTGACGATCAAATCTCCGCGGATTACGCTTACG		
P4 Praimer	(399)	GAATCCGGTGGTTTCAAACCTGAAATCATCGAAGAGTGGAAAGTGAATGGCGGGTATAAATCCGTGACGATCAAATCTCCGCGGATTACGCTTACG		
P1 Praimer	(619)	GAATCCGGTGGTTTCAAACCTGACATCATCGAACATTTGTAAGTGAATGGCGGGTACTCTAT		
		801		900
pQE-60 (D3RF2)	(795)	GCTGGCTGCGTACAGAAACCGCGTTACCCGCTGGTGGCTAAAAGCCCGTTTGACTCCGGCGGTCGTCGCCACACGTCGTTACGTCGCCGTTTGTGTTA		
P4 Praimer	(499)	GCTGGCTGCGTACAGAAACCGCGTTACCCGCTGGTGGCTAAAAGCCCGTTTGACTCCGGCGGTCGTCGCCACACGTCGTTACGTCGCCGTTTGTGTTA		
P1 Praimer	(683)	-----		
		901		1000
pQE-60 (D3RF2)	(895)	TCCGGAAGTTGATGATGATATTTGATATCGAAATCAACCCGCGGATCTGCGCATTGACGTTTATCGCACGTCGCGCGGGCGGTCAGCACGTTAACCGT		
P4 Praimer	(599)	TCCGGAAGTTGATGATGATATTTGATATCGAAATCAACCCGCGGATCTGCGCATTGACGTTTATCGCACGTCGCGCGGGCGGTCAGCACGTTAACCGT		
P1 Praimer	(683)	-----		
		1001		1100
pQE-60 (D3RF2)	(995)	ACCGAATCTGCGGTGCGTATTACCACATCCCGACCGGGATCGTGACCCAGTGCCAGAACGACCGTTCCCGAGCATAAAAAACAAAGCTAAAGCACTTTCTG		
P4 Praimer	(699)	ACCGAATCTGCGGTGCGTATTACCACATCCCGACCGGGATCGTGACCCAGTGCCAGAACGACCGTTCCCGAGCATAAAAAACAAAGCTAAAGCACTTTCTG		
P1 Praimer	(683)	-----		
		1101		1200
pQE-60 (D3RF2)	(1095)	TTCTCGGTGCTCGCATCCACGCTGCTGAAATGGCAAACCGCAACAGGCCAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCG		
P4 Praimer	(799)	TTCTCGGTGCTCGCATCCACGCTGCTGAAATGGCAAACCGCAACAGGCCAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCG		
P1 Praimer	(683)	-----		
		1201		1300
pQE-60 (D3RF2)	(1195)	TAACCGTACTTACAACCTCCCGCAGGGCGCATTAAAGATCTGCGCACCGGGGTAGAAACCCGCAACACGAGCCGCTGCTGGACGGCAGCCTGGATCAA		
P4 Praimer	(899)	TAACCGTACTTACAACCTCCCGCAGGGCGCATTAAAGATCTGCGCACCGGGGTAGAAACCCGCAACACGAGCCGCTGCTGGACGGCAGCCTGGATCAA		
P1 Praimer	(683)	-----		
		1301		1400
pQE-60 (D3RF2)	(1295)	TTTATCGAAGCAAGTTTGAAGCAGGGAGATCTCATCACCATCACCATCACTAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGA		
P4 Praimer	(999)	TTTATCGAAGCAAGTTTGAAGCAGGGAGATCTCATCACCATCACCATCACTAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGA		
P1 Praimer	(683)	-----GATAGATCCAGTAA-GG		
		1401		1500
pQE-60 (D3RF2)	(1395)	CCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTCCGCCGGCGGTTTTTTATTGGTGAAGTCCAAGCTAGCTTGCGGAGATTTTCAGGAGCTA		
P4 Praimer	(1097)	CTTTAGGC-----		
P1 Praimer	(683)	-----		

Joonis 24 D3RF2 Sekvenerimistulemuste joendus. Sinise ja punasega toodud kattuvad järjestused sekvenerimisandmetest ning kimäärse geeni teoreetilise järjestuse vahel. Joenduste algused ja lõpud on ebatäpsed tulenevalt sekvenerimismeetodist. Esineb ka üksikuid nukleotiide, mis ei joendu, kuid on tegelikult lihtsalt sekvenerimistulemustest valesti loetud.

14 Lisa 3

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
WT	-	1488	0	0,00	0,0%
	RF1	3196	1708	0,64	54,7%
	RF1	3275	1787	0,67	57,3%
	RF1	3613	2125	0,80	68,1%
	RF2	3128	1640	0,61	52,6%
	RF2	2951	1463	0,55	46,9%
	RF2	3360	1872	0,70	60,0%
	D3RF1	1523	35	0,01	1,1%
	D3RF1	1555	67	0,03	2,1%
	D3RF1	1495	7	0,00	0,2%
	D3RF2	1726	238	0,09	7,6%
	D3RF2	1320	0	0,00	0,0%
	D3RF2	1377	0	0,00	0,0%
	PÜRO	4608	3120	1,17	100,0%

[³⁵S] Metioniini eriaktiivsus -2672 dpm/pmol

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
PR	-	1377	0	0,00	0,0%
	RF1	2929	1552	0,58	42,7%
	RF1	2637	1260	0,47	34,7%
	RF1	2776	1399	0,52	38,5%
	RF2	2862	1485	0,56	40,9%
	RF2	2808	1431	0,54	39,4%
	RF2	2616	1239	0,46	34,1%
	D3RF1	851	0	0,00	0,0%
	D3RF1	1249	0	0,00	0,0%
	D3RF1	1409	32	0,01	0,9%
	D3RF2	1495	118	0,04	3,2%
	D3RF2	1253	0	0,00	0,0%
	D3RF2	1377	0	0,00	0,0%
	PÜRO	5010	3633	1,36	100,0%

[³⁵S] Metioniini eriaktiivsus -2672 dpm/pmol

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
PR+RIUD	-	1996	0	0,00	0,0%
	RF1	4153	2157	0,81	69,0%
	RF1	4420	2424	0,91	77,6%
	RF1	4509	2513	0,94	80,4%
	RF2	4512	2516	0,94	80,5%
	RF2	4473	2477	0,93	79,3%
	RF2	4509	2513	0,94	80,4%
	D3RF1	2043	47	0,02	1,5%
	D3RF1	2277	281	0,11	9,0%
	D3RF1	2299	303	0,11	9,7%
	D3RF2	1569	0	0,00	0,0%
	D3RF2	1744	0	0,00	0,0%
	D3RF2	1584	0	0,00	0,0%
	PÜRO	5120	3124	1,17	100,0%

[³⁵S] Metioniini eriaktiivsus -2672 dpm/pmol

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
WT + UUC	-	861	0	0,00	0,0%
	RF1	1203	342	0,15	47,3%
	RF1	1285	424	0,18	58,6%
	RF1	1270	409	0,18	56,6%
	RF2	1238	377	0,16	52,1%
	RF2	1244	383	0,17	53,0%
	RF2	1093	232	0,10	32,1%
	D3RF1	1050	189	0,08	26,1%
	D3RF1	1334	473	0,21	65,4%
	D3RF1	1203	342	0,15	47,3%
	D3RF2	1470	609	0,26	84,2%
	D3RF2	1523	662	0,29	91,6%
	D3RF2	1249	388	0,17	53,7%
	PÜRO	1584	723	0,31	100,0%

[³⁵S] Metioniini eriaktiivsus -2303 dpm/pmol

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
ΔH69 + UAA	-	1324	0	0,00	0,0%
	RF1	3745	2421	1,06	24,8%
	RF1	3349	2025	0,89	20,7%
	RF1	3403	2079	0,91	21,3%
	RF2	2267	943	0,41	9,7%
	RF2	2182	858	0,38	8,8%
	RF2	2086	762	0,33	7,8%
	D3RF1	1648	324	0,14	3,3%
	D3RF1	1929	605	0,26	6,2%
	D3RF1	1708	384	0,17	3,9%
	D3RF2	1826	502	0,22	5,1%
	D3RF2	1591	267	0,12	2,7%
	D3RF2	1655	331	0,14	3,4%
	PÜRO	11092	9768	4,27	100,0%

Ribosoomid	RF	DPM	dDPM	pmol	%PÜRO
ΔH69 + UUC	-	1298	0	0,00	0,0%
	RF1	1826	528	0,23	6,3%
	RF1	1798	500	0,22	5,9%
	RF1	1772	474	0,21	5,6%
	RF2	2128	830	0,36	9,9%
	RF2	1972	674	0,29	8,0%
	RF2	1867	569	0,25	6,8%
	D3RF1	1641	343	0,15	4,1%
	D3RF1	1698	400	0,17	4,8%
	D3RF1	1826	528	0,23	6,3%
	D3RF2	1883	585	0,26	7,0%
	D3RF2	1815	517	0,23	6,2%
	D3RF2	1627	329	0,14	3,9%
	PÜRO	9703	8405	3,67	100,0%

[³⁵S] Metioniini eriaktiivsus -2288 dpm/pmol

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Kaspar Reier _____
(*autori nimi*)
(sünnikuupäev: _____ 17.06.1990 _____)

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

_____ VABANEMISFAKTORITE RF1 JA RF2 LÜLITI LINGU
INTERAKTSIOONID PSEUDOURIDIINIDEGA RIBOSOOMI 23S rRNA HEELIKSIS
69 _____,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Aivar Liiv _____,
(*juhendaja nimi*)

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

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

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

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

Tartus, __26.05.2014__ (*kuupäev*)