

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida rluF* deletsioontüve konstrueerimine ning deletsiooni mõju
translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Carol Luhaäär

Juhendaja MSc Karl Jürgenstein

Tartu 2023

Infoleht

***Pseudomonas putida rluF* deletsioontüve konstrueerimine ning deletsiooni mõju translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele**

RNA modifitseerimine on kõigis eludomeenides evolutsiooniliselt konserveerunud protsess, mis võimaldab RNA-l täita organismis erinevaid ülesandeid. Levinuim RNA posttranskriptsiooniline modifikatsioon on pseudouridiin, mida sünteesivad pseudouridiini süntaasid. Pseudouridiin on seostatud RNA ning nukleotiidide stabilisatsiooniga, kuigi selle täpne funktsioon on veel teadmata. Meie laboris on varasemalt näidatud, et pseudouridiinide süntaaside TruA ja RluA puudumine vähendab bakteri *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsust ja suurendab mutatsioonisagedust. Käesolevas töös uuritakse pseudouridiini süntaasi RluF mõju *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele.

Märksõnad: RluF, pseudouridiin, translatsioonitäpsus, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Construction of a *Pseudomonas putida rluF* deletion mutant and its effects on translational fidelity and mutation frequency

RNA modifying is an evolutionarily conserved process that enables RNA to take part in various stages of gene expression. The most abundant post-transcriptional RNA modifications are pseudouridines, synthesized by enzymes called pseudouridine synthases. Pseudouridines have been linked with increased stabilization of RNA and nucleotides, although the specific function is currently unknown. Our research group has shown that the lack of pseudouridine synthases TruA and RluA reduces translational fidelity and increases mutation frequency of *Pseudomonas putida*. The aim of this dissertation is to study the effects of pseudouridine synthase RluF on the translational fidelity and mutation frequency of *Pseudomonas putida*.

Keywords: RluF, pseudouridine, translational fidelity, mutation frequency, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 RNA modifikatsioonid.....	6
1.2 Pseudouridiin.....	8
1.3 Pseudouridiini süntaasid.....	10
1.4 Valk RluF.....	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjalid ja meetodika.....	15
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed.....	15
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon.....	17
2.2.3 PCR.....	17
2.2.4 Plasmidi eraldamine ja restriksioonianalüüs.....	19
2.2.5 Geelelektroforees.....	19
2.2.6 <i>ArluF</i> tüve konstrueerimine.....	19
2.2.7 Sekveneerimine.....	21
2.2.8 Translatsioonitäpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga.....	21
2.2.9 Mutatsioonisageduse mõõtmine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga.....	23
2.2.10 Bioinformaatiline analüüs.....	23
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> RluF substraatide virtuaalne analüüs.....	24
2.3.2 RluF mõju bakteri <i>P. putida</i> translatsioonitäpsusele.....	25
2.3.3 RluF mõju bakteri <i>P. putida</i> mutatsioonisagedusele.....	28
Kokkuvõte.....	30
Summary.....	31
Tänuõnad.....	32
Kasutatud kirjandus.....	33
Kasutatud veebiaadressid.....	37
Lisad.....	38

Kasutatud lühendid

CAA – kaseiini hüdroksülaad (ingl k – *casamino acids*)

Km – kanamütsiin

LAR – lutsiferaasi reportertesti reagent (ingl k – *luciferase assay reagent*)

LB – lüsogeenne sööde (ingl k – *lysogeny broth*)

Pen – penitsilliin

PUA – pseudouridiini süntaasi ja arheosiini transglükosülaasi domeen (ingl k - *pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase domain*)

Rif - rifampitsiin

Ψ - pseudouridiin

Sissejuhatus

RNA eri vormidel on mitmeid rolle organismi elutegevuses, osaledes näiteks mRNA, rRNA ja tRNA-na valkude sünteesil ning eri vormidena ka geeniekspressiooni reguleerimisel. RNA mitmekesisuses on tähtis osa modifitseeritud nukleotiididel, mida on leitud paljudest eri RNA-dest. Modifikatsioonid stabiliseerivad RNA struktuuri, esinedes tihti molekulaarsete masinavärkide korrektseks toimimiseks kriitiliselt vajalikes piirkondades.

Üks levinumaid posttranskriptsioonilisi modifikatsioone RNA-s on pseudouridiinid, mida sünteesivad pseudouridiini süntaasid. Pseudouridiini esinemise peamiseks tagajärjeks RNA-s on RNA tertsiaarstruktuuri stabiliseerimine ning tertsiaarstruktuuri ja teiste molekulide vaheliste interaktsioonide tugevdamine.

E. coli-s kirjeldatud pseudouridiini süntaas RluF modifitseerib kahte uridiini, millest üks paikneb 23S rRNA-s ning teine türosiini tRNA antikoodonis. Antikoodonis asuva pseudouridiini puudumisel muutub tRNA antikoodoni ja mRNA-s paikneva koodoni vaheline paardumine ebastabiilsemaks, mille tulemusena võidakse sünteesitavasse polüpeptiidi lisada vale aminohape.

Meie laboris leiti, et pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA sünteesitud pseudouridiinide puudumisel tõuseb mutatsioonisagedus bakteris *Pseudomonas putida*. Samuti avastati, et TruA katalüütilise aktiivsuse puudumisel väheneb *P. putida*-s translatsioonitäpsus. Eelnevalt lähtudes seati käesoleva töö eesmärgiks konstrueerida *Pseudomonas putida* tüvi, millest on deleteeritud RluF-i kodeeriv geen ning uurida deletsiooni mõju bakteri translatsioonitäpsusele ning mutatsioonisagedusele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 RNA modifikatsioonid

DNA-lt transkribeeritav RNA mõjutab otseselt geenide ekspressiooni, olles geneetilist informatsiooni kodeeriva DNA ja informatsiooni rakendavate valkude vahel ühendavaks lüliks. Lisaks klassikalistele nukleotiididele A, C, U ja G, sisaldab RNA ka modifitseeritud nukleotiide, millele on lisatud või millest on eemaldatud erinevaid molekulirühmi või üksikuid aatomeid. RNA modifikatsioonid mängivad tähtsat rolli DNA-st saadava info korrektsel ja tõhusal avaldumisel organismis. Neid on leitud kõikidest elusorganismidest ning on RNA-de evolutsiooniliselt konserveerunumaks omaduseks (Li & Mason, 2014). Praeguseks on kirjeldatud üle 160 posttranskriptsioonilise RNA modifikatsiooni, mis mitmekesisistavad RNA rolli organismide elutegevuses (Boccaletto *et al.*, 2018). Kõikide modifikatsioonide täpsed biokeemilised funktsioonid ning nende mõju ei ole veel teada, kuid *E. coli* ribosoomi uurides on leitud, et enamus modifikatsioone esinevad RNA piirkondades, mis on olulised normaalseks funktsioneerimiseks, näiteks ribosoomi peptidüültransferaases tsentris, mis katalüüsib aminohapete lisamist sünteesitavale polüpeptiidile (Decatur & Fournier, 2002). See viitab, et RNA modifikatsioonid on eluks vajalikud.

Modifikatsioone on leitud paljudest eri RNA-dest, näiteks tRNA, mRNA, rRNA ja snRNA (Li & Mason, 2014). Modifikatsioonide tüübid ning arvud varieeruvad liigiti ning ka RNA eri vormides – näiteks *E. coli* 23S rRNA-s on leitud 26 modifikatsiooni (10 pseudouridiini (Ψ), 1 dihydrouridiin, 14 metülatsiooni ja 1 tundmatu modifikatsiooniga tsütosiin) ning 16S rRNAs 11 modifikatsiooni (1 Ψ ja 10 metülatsiooni) (Ofengand & Del Campo, 2004). Eukarüootide tRNA-s on kuni 25% nukleotiididest modifitseeritud, kuid bakterite tRNA-s ainult ligikaudu 10% (Björk & Hagervall, 2014).

RNA posttranskriptsioonilised modifikatsioonid loovad translatsiooni jaoks õige konteksti ja raamistiku, aidates kaasa ribosoomi jaoks vajaliku stabiilse struktuuri loomisele. Kui mRNA kodeerivas osas on mõni nukleosiid modifitseeritud, mõjutab see tRNA koodonite äratundmist ning Watson-Crick paardumiste muudatuse tõttu ka tRNA antikoodoni seondumist koodoniga. See omakorda mõjutab translatsioonitäpsust ja -kiirust ning võib põhjustada ka varajast terminatsiooni, mille tulemuseks on ebatäielik polüpeptiid (Agris *et al.*, 2017). Näiteks, kui ribosoomi P-saiti satub modifitseerimata peptidüül-tRNA, ei pruugi see luua kindlat ühendust P-saidiga, mis põhjustab lugemisraami libisemist (Urbonavičius *et al.*, 2001). Kui

translatsioonikompleksis on modifitseerimata tRNA asemel modifitseeritud tRNA, toimub ka sünteesitavasse valku uute aminohapete lisamine kiiremini (Smith *et al.*, 2022).

Modifikatsioonid on olulised ka teistes translatsiooni etappides, näiteks 1-metüülguanosiini esinemine *Salmonella typhimurium*-i proliini ja arginiini tRNA antikoodoni läheduses aitab olulisel määral kaasa õige aminoatsüül-tRNA seondumisele ribosoomi A-saiti, samas ei täheldatud sama modifikatsiooni puhul märgatavat mõju leutsiini tRNA-s. Samuti kiirendas õige aminoatsüül-tRNA valikut pseudouridiini esinemine leutsiini tRNA antikoodonis, aga mitte pseudouridiini esinemine samas positsioonis proliini tRNA antikoodonis (J. Li *et al.*, 1997). See viitab RNA modifikatsioonide tähtsusele translatsiooni tõhusaks toimimiseks, aga ka modifikatsioonide funktsiooni mitmekesisusele, kuna samad modifikatsioonid ei pruugi isegi sarnastes kontekstides sama mõju avaldada.

Kuna modifikatsioonid asuvad RNA-s tihti raku elutegevuseks olulistes piirkondades, on modifikatsioone seostatud ka antibiootikumiresistentsusega. Antibiootikumide mõju on kõige tõhusam siis, kui nad suudavad võimalikult kiiresti rikkuda raku võime ennast elus hoida. Üks efektiivsemaid viise selleks on takistada raku valgusünteesi, seondudes just funktsionaalse tähtsusega piirkondadele ribosoomis (Long & Vester, 2009). Antibiootikum klooramfenikool seondub näiteks ribosoomi A-saidi lähedusse ning takistab seeläbi translatsiooniks vajalike tRNA-de seondumist ribosoomile (Dunkle *et al.*, 2010). Kui antibiootikumide seondumiskohad on aga modifitseeritud, ei ole antibiootikumidel võimalik RNA või DNA-ga seonduda. Sellisel viisil võivad ennast kaitsta bakterid, mis ise antibiootikume produtseerivad, näiteks antibiootikumi tülosiin tootev bakter *Streptomyces fradiae* ekspresseerib kahte metüültransferaasi TlrB ja TlrD, mis metüleerivad kumbki ühte positsiooni 23S rRNA-s (Liu & Douthwaite, 2002). Bakterid on tülosiinile resistentsed, kui RNA-s esinevad mõlemad metüülatsioonid. Resistentsust võivad mõjutada ka konserveerunud modifitseeritud nukleotiidid. Antibiootikum sparsomütsiin seondub 23S rRNA peptidüültransferaasse tsentri lähedusse ning sparsomütsiinile resistentsel arhe *Halobacterium salinarium* mutandil leiti puuduvat konserveerunud modifikatsioon U2603, mis asub samuti peptidüültransferaases tsentris (Lázaro *et al.*, 1996).

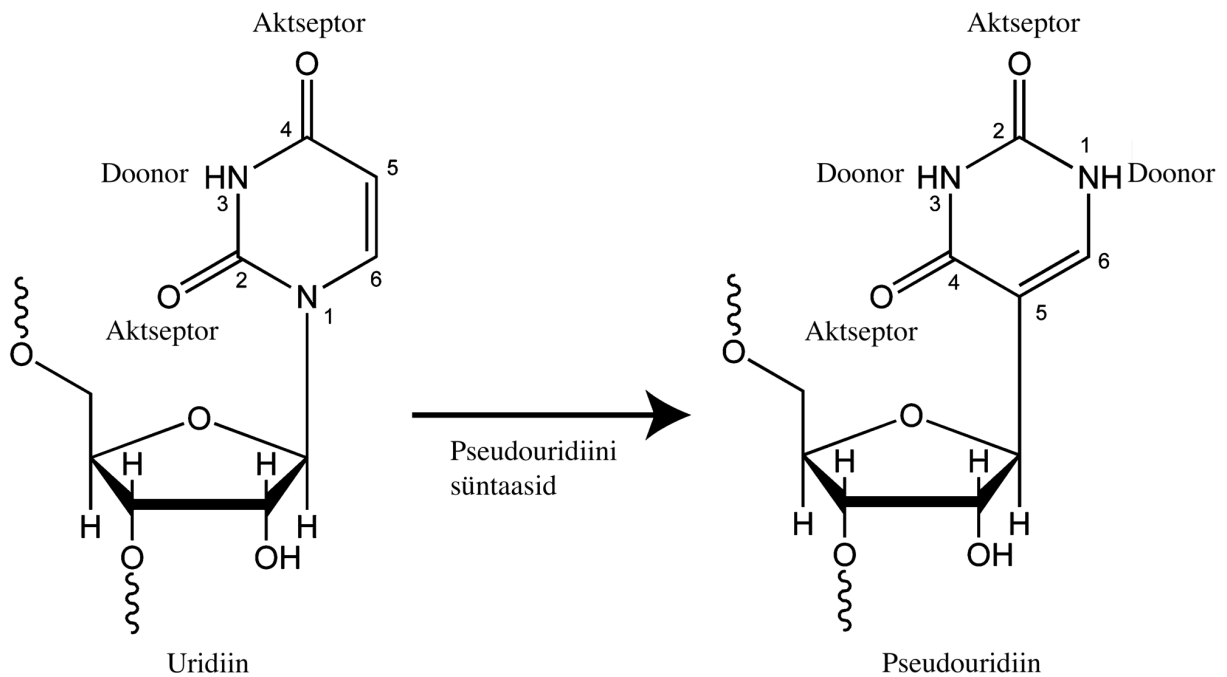
RNA modifikatsioonid võivad mõjutada ka rakkude mutatsioonisagedust. *E. coli* geen *miaA* kodeerib ensüümi, mis lisab tRNA antikoodoni läheduses positsioonis 37 asuvale adenosiinile isopentüülrühma. Sellise modifikatsiooni puudumisel on *E. coli* rakkudes täheldatud

mutaatorfenotüübi tekkimist, mille tagajärjena esineb bakteri genoomis suurema sagedusega transversioonmutatsioone, mis omakorda vähendab translatsioonitäpsust. (Zhao *et al.*, 2001)

1.2 Pseudouridiin

Pseudouridiin (Ψ) ehk 5-ribosüüluratsiil on RNA-s esineva nukleosiidi uridiini isomeer ning kõige levinum RNA posttranskriptsiooniline modifikatsioon, mida on leitud mitmes eri RNA-s, nagu mRNA-s, tRNA-s, snRNA-s, mt-tRNA-s ja rRNA-s (Lin *et al.*, 2021) Pseudouridiini kirjeldasid esimest korda Davis ja Allen aastal 1957, kes nimetasid seda „viidaks ribomononukleotiidiks“ (Davis & Allen, 1957). Pseudouridiin on levinuim posttranskriptsiooniline modifikatsioon tRNA-s, esinedes igas tRNA molekulis keskmiselt 2-3 korda (Lin *et al.*, 2021). See mängib olulist rolli tRNA struktuuris ja funktsioonis, stabiliseerides tRNA D-lingu, T-lingu ja antikoodonlingu, ning vahendades tRNA seondumist ribosoomiga (Charette & Gray, 2001).

Uridiini pseudouridiiniks modifitseerimise tulemusena on pseudouridiin vabade N1 ja N3 iminoprootonite tõttu võimeline moodustama ühe võrra rohkem vesiniksidemeid kui uridiin, millel on vaba ainult N3 iminoprooton (Kierzek *et al.*, 2014) (joonis 1). Kui RNA ahelas asuv uridiin on asendatud pseudouridiiniga ning pseudouridiin on seotud teiste RNA-s asuvate lämmastikalustega ehk guaniini, tsütosiini või adeniiniga, siis on selline RNA molekul lisavesiniksidemete tõttu termodünaamiliselt stabiilsem kui tavaline RNA molekul (Kierzek *et al.*, 2014). Pseudouridiini esinemine RNA-s soodustab ka lämmastikaluste omavahelist *stacking*'ut stabiilsemate konformatsioonide tõttu (Davis, 1995).



Joonis 1. RNAs oleva uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks. Lainelised jooned näitavad molekulide seotust teiste RNA ahelas paiknevate nukleotiididega (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006, muudetud).

Pseudouridiine ei sünteesi bakterites ning eukarüootides samad molekulaarsed mehhanismid, mis viitab pseudouridiinide tähtsusele ning sellele, et need mehhanismid arenesid eri organismides välja üksteisest sõltumatult. Bakterites modifitseerivad uridiini spetsiaalsed ensüümid ehk pseudouridiini süntaasid (Ofengand, 2002), kuid eukarüootsetes organismides sünteesivad pseudouridiini väikeste tuumakese RNA-valgu kompleksid (snoRNP), mis koosnevad spetsiifilisest snoRNA-st ning kõikide snoRNP-de koosseisu kuuluvatest lisavalkudest (Kiss, 2001). Ka arhedel on pseudouridiinide sünteesiks eukarüootide snoRNP-dele sarnased homoloogsed valgud (Dennis *et al.*, 2001).

Pseudouridiini süntaas TruA modifitseerib uridiine *E. coli* tRNA positsioonides 38-40 ning RluA modifitseerib uridiine *E. coli* tRNA positsioonis 32 ning 23S rRNA positsioonis 746 (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006). Nende ensüümide sihtmärgid *E. coli*-s ning *P. putida*-s on sarnased. Ensüümide RluA ja TruA sünteesitud pseudouridiinide puudumine bakteris *Pseudomonas putida* toob kaasa vastavalt kolmekordse või viiekordse mutatsioonisageduse tõusu (Tagel *et al.*, 2021). Asendades nii TruA kui RluA deletsioontüves deleteeritud geeni katalüütiliselt inaktiivset pseudouridiini süntaasi kodeeriva geeniga, jäi mutatsioonisagedus võrreldavaks täielikult deleteeritud geeniga tüve mutatsioonisagedusega. Seega on mutatsioonisagedus otseselt mõjutatud TruA ja RluA sünteesitavate pseudouridiinide puudumisest. See näitab, et pseudouridiinide esinemine RNA-s on bakteritele mitmest küljest kasulik ning eluks vajalik.

Pseudouridiinide tähtsust on demonstreeritud ka pärmirakkudes, mille genoomist on deleteeritud 1-5 snoRNA geeni, mille kodeeritavad valgud sünteesivad pärmis rRNA peptidüültransferaasentsentri kindlas domeenis kokku kuut pseudouridiini. Deletsioonide tulemusena leiti, et rRNA A-lingus paikneva pseudouridiini puudumisel on inhibeeritud pärmirakkude kasv ning efekt oli veelgi märgatavam, kui pärmis olid puudu kõik 5 snoRNA-d ehk puudu oli kuus pseudouridiini. Kasvudefekti ei täheldatud, kui rakkudest puudusid üksikud snoRNA-d, mis ei modifitseeri rRNA A-lingu. Samuti leiti, et viie ja kuue pseudouridiini puudumisel väheneb pärmirakkudes translatsiooniefektiivsus ning muutub ribosoomi ehitus (King *et al.*, 2003). Iga üksiku pseudouridiini puudumine võib, aga ei pruugi organismile märgatavat mõju avaldada, mis näitab, et pseudouridiinide funktsioon sõltub suuresti nende asukohast RNA-s.

1.3 Pseudouridiini süntaasid

Uridiini modifitseerivad pseudouridiiniks ensüümid nimega pseudouridiini süntaasid, mis asendavad uridiini molekulis esineva N-glükosiidse sideme C-glükosiidse sidemega. N-glükosiidne side paikneb lämmastikaluse uratsiili 1. positsioonis asuva lämmastikuaatomi ja riboosi 1. positsioonis asuva süsiniku vahel. C-glükosiidne side paikneb uratsiili 5. positsioonis ja riboosi 1. positsioonis asuvate süsinike vahel (Charette & Gray, 2000). Uridiini konversioonireaktsioon on mehhanismi poolest üsna ainulaadne, kuna teised ensüümid küll samuti lõhuvad glükosiidseid sidemeid, aga teadaolevalt ei pööra ükski teine ensüüm lämmastikalust ümber ja ei ühenda seda uuesti riboosiga, kuniks nukleotiid veel ensüümiga seotud on (Ofengand & Del Campo, 2004). Modifikatsioonireaktsiooniks ei ole lisaks vaja kofaktoreid (Samuelsson & Olsson, 1990).

Teadaolevad pseudouridiini süntaasid kõikidest eludomeenidest jagatakse viieks perekonnaks, mis on nime saanud *E. coli* ensüümide järgi: RluA, RsuA, TruA, TruB ja TruD (Kaya & Ofengand, 2003). RluA perekonda kuuluvad RluA, RluC, RluD ja TruC; RsuA perekonda kuuluvad RsuA, RluB, RluE ja RluF; ning TruA, TruB ja TruD on oma perekondades ainukesed esindajad (Gutgsell *et al.*, 2005). Kõik nimetatud pseudouridiini süntaasid modifitseerivad *E. coli*-s ühte kuni kolme nukleotiidi kas tRNA-s, 23S rRNA-s või 16S rRNA-s. Ainult RluA ja RluF on topeltpetsiifilisusega ensüümid, mis modifitseerivad nukleotiide nii 23S rRNA-s kui ka tRNA-s.

Kuigi eri pseudouridiini süntaasid pole nukleotiidselt järjestuselt sarnased, on neis kõigis täheldatud struktuurilisi sarnasusi. Kõikide pseudouridiini süntaaside südamikud koosnevad kaheksaahelalisest β -lehest. β -lehe keskel asub katalüütiline tsepter, mida ümbritsevad eri ensüümide puhul erinevad sekundaarstruktuurid. Katalüütiliseks aktiivsuseks on hädavajalik aktiivtsentri läheduses paiknev aspartaadi jääk, mis on ainukese jäägina leitud kõikidest pseudouridiini süntaasidest. Erinevatel ensüümidel võib N- ja C-terminuses olla lisadomeene, näiteks TruB ensüümil on C-terminaalne PUA domeen ehk mõndades pseudouridiini süntaasides ja arheosiini transglükosülaasides esinev domeen, mis vahendab ühendust ensüümi ja tRNA aktseptorõla vahel. RluA ja RsuA perekondades leidub ensüüme, millel on N-terminaalne ribosomaalse valgu S4 sarnane domeen, näiteks ensüümil RluF (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006). Samuti on RluA ja RsuA perekondade ensüümide struktuuris leitud 3 sarnase paiknemisega konserveerunud motiivi, nimetatud motiivideks I, II ja III (Koonin, 1996).

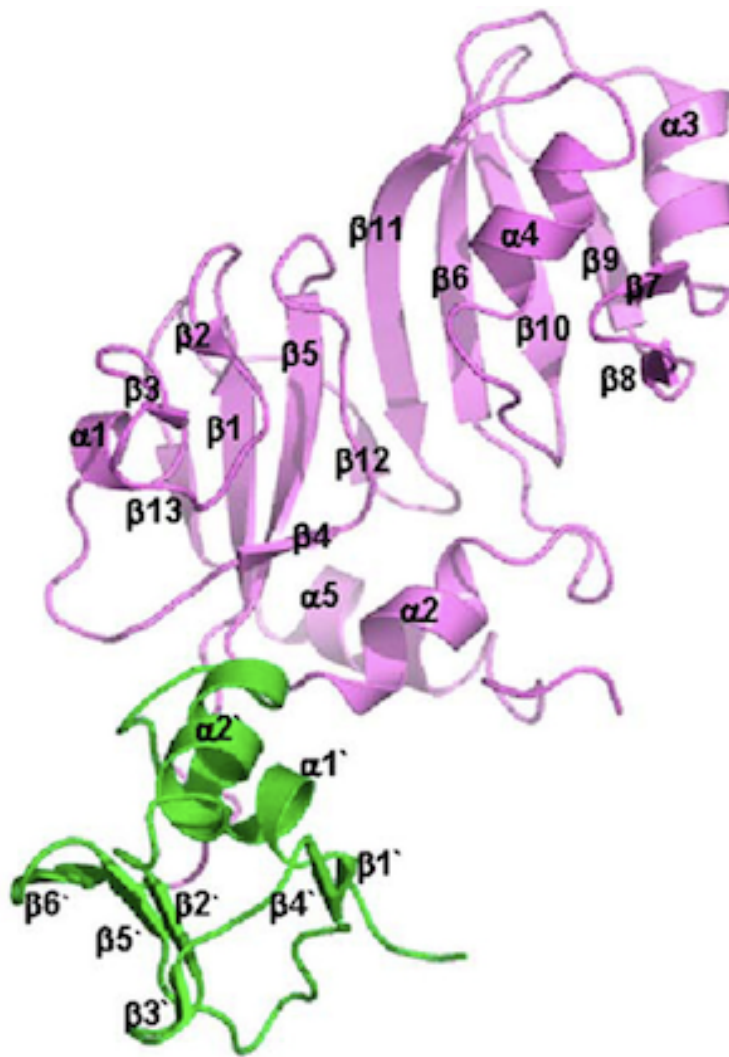
Pseudouridiini süntaasid on substraadispetsiifilised ning tunnevad modifitseeritavat nukleotiidi ära ainult RNA kontekstis. See on vajalik, et vältida rakus leiduva vaba uridiini ära kasutamist, kuna uridiini kasutatakse DNA sünteesiks tarviliku tümidiini sünteesiks ning pseudouridiini selle jaoks kasutada ei saa (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006).

E. coli-s on uuritud pseudouridiini süntaaside olulisust, konstrueerides tüvesid, millest on pseudouridiini süntaase kodeerivad geenid deleteeritud ning jälgides nende tüvede kasvukiirust. *E. coli*-s esineva seitsmest pseudouridiini süntaasist kuue puhul ei märgatud deletsioontüvel metsiktüvega võrreldes kasvukiiruse muutumist, näiteks RsuA (Conrad *et al.*, 1999) ja RluA (Raychaudhuri *et al.*, 1999) puhul. Ainult RluD *knockout*-mutandi puhul täheldati kasvukiiruse olulist vähenemist (Raychaudhuri *et al.*, 1998). RluD modifitseerib uridiine *E. coli* 23S rRNA-s positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006). Katalüütiliselt inaktiivset RluD valku kodeerivas tüves jäi kasvukiirus võrreldavaks metsiktüvega (Gutgsell *et al.*, 2001). Seega ei tulene bakteri kasvukiiruse aeglustumine RluD sünteesitavate pseudouridiinide puudumisest, vaid valgu RluD mõnest alternatiivsest ning ehk seni veel teadmata funktsioonist.

1.4 Valk RluF

RluF on RsuA valguperekonda kuuluv pseudouridiini süntaas ehk valk, mis katalüüsib 23S rRNA-s ja türosiini tRNA-s nukleosiidi uridiin modifitseerimist pseudouridiiniks. RluF modifitseerib *E. coli*-s ainult spetsiifilisi nukleotiide – türosiini tRNA antikoodonis positsioonis 35 paiknevat uridiini ja 23S rRNA-s uridiini, mis asub positsioonis 2604 (Limbach & Addepalli, B., 2016). Modifikatsioonid tRNA antikoodonis põhjustavad tihti vigu RNA translatsioonil, kui valgusünteesi käigus lülitatakse muutunud antikoodoni tõttu sünteesitavasse polüpeptiidi vale aminohape. U2604 asub *E. coli* 23S rRNA V domeeni heeliksis 93. V domeen on ribosoomi korrektseks töötamiseks kriitiline, kuna seal piirkonnas paikneb peptidüültransferaasne tsepter, mis katalüüsib aminohapete lisamist sünteesitavasse polüpeptiidahelasse. V domeeni jäävad ka A-ling, mis seob aminoatsüül-tRNA ribosoomiga; P-ling, mis seondub peptidüül-tRNA-ga ning E-piirkond, kuhu seonduvad deatsüleeritud tRNAd enne ribosoomist dissotsieerumist (Moazed & Noller, 1989). *E. coli* RluF deletsioontüvel on avastatud vähenenud resistentsus antibiootikumide hügomütsiin A ja sparsomütsiin vastu, mis mõlemad seonduvad 23S rRNA peptidüültransferaasessesse tsentrisse (Toh & Mankin, 2008).

Enamik *Escherichia coli* pseudouridiini süntaase modifitseerivad spetsiifiliselt ainult tRNA-d või ainult rRNA-d. Seega on valku RluF kodeeriv geen teine teadaolev topeltspetsiifilisusega pseudouridiini süntaasi kodeeriv geen *E. coli*-s lisaks geenile *rluA* (Limbach & Addepalli, B., 2016). Del Campo *et al.* (2001) tuvastasid *E. coli* 23S rRNA positsiooni 2604 modifitseerimise eest vastutava valgu 2001. aastal ja nimetasid selle RluF-iks. Katsetes toodi välja, et valk RluF interakteerub vähesel määral ka 23S rRNA nukleosiidiga positsioonis 2605, mis võis aimu anda valgu RluF topeltspetsiifilisusest RNA modifikatsioonil (Del Campo *et al.*, 2001). Addepalli ja Limbach (2016) tegid aga valgu osaluse ka *E. coli* türosiini tRNA modifikatsioonis kindlaks aastal 2016, kasutades valgu RluF suhtes konstrueeritud deletsioontüve, funktsionaalse RluF-i valguga bakteritüve, vedelikkromatograafia-massispektromeetria valgu RluF aktiivsuse mõõtmiseks ja lutsiferaasi reportertesti RluF-i modifitseeritud tRNA mõju leidmiseks mRNA translatsioonile.



Joonis 2. Valgu RluF tertsiaarstruktuur. Roosaga on värvitud valgu katalüütiline domeen ning rohelisega ribosomaalse valgu S4 sarnane domeen (Alian *et al.*, 2009).

E. coli valgu RluF tertsiaarstruktuur koosneb β -lehtedest ning α -heelikstest (joonis 2). Valk jagatakse kolmeks domeeniks, mis on omavahel linkeritega ühendatud – N- ning C-terminaalne domeen ja katalüütiline domeen. Valgu N-terminaalne domeen sarnaneb voltumiselt ribosomaalse valgu S4 RNA-d siduvale domeenile ning sellist sarnasust on täheldatud ka pseudouridiini süntaasis RsuA. RluF-i katalüütilises tsentraalses domeenis on α - β voltumine, mis on konserveerunud teistes pseudouridiini süntaasides. RNA 22-meerne ling seondub RluF-i RNA-d siduvasse piirkonda, mille põhja moodustab β -heeliks (β 11) ning seinad koosnevad pseudouridiini süntaasidele iseloomulike motiivide II ja III aminohappejääkidest. RNA-ga seonduvad veel valgu β 2 ja β 3 lehti omavahel ühendav ling heeliks α 2 ja N-terminaalse domeeni heeliks-pööre-heeliks motiiv (Alian *et al.*, 2009).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

RNA modifikatsioonid on vajalikud rakus toimuvate protsesside kiireks ja efektiivseks toimumiseks. Levinuim RNA modifikatsioonidest on pseudouridiin, mida on leitud paljudest erinevatest RNA-dest (Lin *et al.*, 2021). Nii spetsiifiliselt pseudouridiinide kui ka üldiselt RNA modifikatsioonide täpne eesmärk ei ole teada. Siiski on näidatud, et pseudouridiinide esinemine stabiliseerib RNA-d ning selle nukleotiidide omavahelist paiknemist (D. R. Davis, 1995). Samuti esinevad RNA modifikatsioonid tihti konserveerunult valgusünteesiks olulistes piirkondades, näiteks *E. coli* ribosoomi peptidüültransferaases tsentris (Decatur & Fournier, 2002).

Meie laboris on näidatud, et pseudouridiini süntaasi TruA modifitseeritud pseudouridiinide puudumine *P. putida*-s vähendab translatsioonitäpsust (Jürgenstein *et al.*, 2022). TruA sünteesib *E. coli*s kolme pseudouridiini tRNA-de antikoodonlingu läheduses positsioonides 38-40 (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006). Ka valk RluF modifitseerib *E. coli* türosiini tRNA antikoodonis paiknevat uridiini, täpsemalt positsioonis 35. Sellises positsioonis asuva pseudouridiini puudumisel on *E. coli*-s näidatud translatsioonitäpsuse vähenemist juhul, kui kodeeriva järjestuse ees paikneb mitu türosiini koodonit (Limbach & Addepalli, B., 2016). Arvestades RluF-i ja TruA substraatide asukohtade lähedust, tekkis hüpotees, et ka RluF-i sünteesitud pseudouridiinide puudumine võiks mõjutada *P. putida*-s translatsioonitäpsust. Samuti on meie laboris näidatud, et pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA modifitseeritud pseudouridiinide puudumine *P. putida*-s suurendab mutatsioonisagedust. Sellest lähtuvalt seati käesoleva töö eesmärkideks:

- Konstrueerida *Pseudomonas putida rluF* deletsioontüvi
- Uurida *rluF* puudumise mõju *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed

Baktereid kasvatati LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöötmes või M9-glükoos-CAA (ingl k – *casamino acids*) söötmes (edaspidi glcCAA), mille valmistamiseks lisati M9 puhvrise (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 666 μM MgO , 50 μM CaCO_3 , 40 μM FeSO_4 , 12,5 μM ZnSO_4 , 12,5 μM MnSO_4 , 2,5 μM CuSO_4 , 2,5 μM CoSO_4 , 1,9 μM H_3BO_4), glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ja kaseiini hüdroksülaati (lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Tardsöötme valmistamiseks lisati söötmesse agarit 15 g/l. Kasutatud bakteritüvede ja plasmiidide loetelu on toodud tabelis 1.

Selektiooni jaoks kasutati järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km, 50 $\mu\text{g/ml}$ või 75 $\mu\text{g/ml}$), rifampitsiin (Rif, 100 $\mu\text{g/ml}$), penitsilliin (Pen, 7,5 $\mu\text{g/ml}$). *Pseudomonas putida* rakke kasvatati temperatuuril 30°C ning *Escherichia coli* rakke kasvatati temperatuuril 37°C.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>P. putida</i> PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud KT2440 tüvega	(Bayley <i>et al.</i> , 1977)
<i>P. putida</i> PaW85 $\Delta rluF$	Deleteeritud geen <i>rluF</i>	Käesolev töö
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 relA1	(Miller, 1992)
Plasmiidid		
pSEVA AD2	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja linker-regioonis -1 raaminihet	(Jürgenstein <i>et al.</i> , 2022)
pSEVA 304	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja UAG stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 304	(Jürgenstein <i>et al.</i> , 2022)
pSEVA 417	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc valgu tootmiseks on vaja UGA stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 417	(Jürgenstein <i>et al.</i> , 2022)
pSNW2	I-SceI restriksioonisaite ja multikloonimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmid, Km ^R	(Volke <i>et al.</i> , 2020)
pSNW2 $\Delta rluFees$	pSNW2 plasmid, kuhu on kloonitud EcoRI ja Acc65I ensüümidega lõigatud fragmendina geeni <i>rluF</i> eelne ala, Km ^R	Käesolev töö
pSNW2 $\Delta rluF$	pSNW2 plasmid, kuhu on kloonitud EcoRI ja Acc65I ensüümidega lõigatud fragmendina geeni <i>rluF</i> eelne ala ning Acc65I ja BamHI ensüümidega lõigatud fragmendina geeni <i>rluF</i> järgne ala	Käesolev töö
pSW(I-SceI)	I-SceI endonukleaasi kodeeriv plasmid, Pen ^R	(Wong & Mekalanos, 2000)

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Pseudomonas putida kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati metsiktüve 5 ml LB vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30°C. 250 µl üleöökuultuuri tsentrifugiti kokku (1 min 12100 x g) ja pesti 3 korda 800 µl 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeeriti ligikaudu 100 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

Escherichia coli kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati rakke 5 ml LB vedelsöötmes üleöö temperatuuril 37°C. 100 µl üleöökuultuuri lisati 5 ml värskesse LB vedelsöötmesse ning kasvatati loksutil 2 tundi temperatuuril 37°C. Seejärel tsentrifugiti 3-5 ml kultuuri kokku (1 min 21000 x g) ning pesti 3 korda 800 µl 10% glütseroolilahusega. Rakud suspendeeriti 100 µl glütseroolilahuses. *E. coli* kompetentsete rakkude valmistamise puhul hoiti kogu protsessi jooksul rakke jääl.

Plasmiidne DNA viidi kompetentsetesse rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Rakkudele lisati 100 ng plasmiidset DNA-d ning elektroporatsiooniks kasutati firma *BioRad* elektroporaatorit „*E. coli Pulser*“ pingel 2500V. Peale elektroporatsiooni lisati rakkudele 1 ml LB vedelsöödet, kasvatati loksutil 45 minutit 30°C või 37°C juures ning plaaditi seejärel selektiivsöötmele.

2.2.3 PCR

PCR-i kasutati plasmiidide ja kointegraatide kontrolliks. Reaktsioonisegu lõppmahuks oli 20 µl ja sisaldas: 1x PCR-i puhvrit; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d; 0,5 U Taq polümeraasi; praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 2. Matriitsina kasutati bakterirakkude kromosomaalset DNA-d.

PCR-i reaktsioon koosnes 25 tsüklist. Ühe tsükli moodustas: 1) DNA denaturatsioon 96°C juures 30 sekundit; 2) praimerite seondumine DNA-le 56-59°C juures 30 sekundit, temperatuur sõltus praimeri GC sisaldusest; 3) DNA süntees 72°C juures 45-90 sekundit, aeg sõltus amplifitseeritava DNA lõigu pikkusest. Esimesele tsüklile eelnes 2-10 minuti pikkune eelkuumutus 96°C juures ning viimasele tsüklile järgnes 5 minuti pikkune järelsüntees 72°C juures, mille käigus sünteesiti lõpuni pooleli olevad DNA fragmendid.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Nukleotiidne järjestus	Kasutamine
RluFdelAcc	5'-TAGGTACCTTCGCAAGGCAGG GAAAGG-3'	Kasutati <i>rluF</i> eelse ala amplifitseerimiseks. Komplementaarne <i>rluF</i> -i eelse alaga positsioonides -26 kuni -8, suunaga <i>rluF</i> -st eemale. Acc65I lõikesait on allajoonitud.
RluFoutAcc	5'-TCGGTACCTTACCTGGCTACCT CCGAAC-3'	Kasutati <i>rluF</i> järgse ala amplifitseerimiseks. Komplementaarne <i>rluF</i> -i lõpuga positsioonides 684 kuni 703, suunaga <i>rluF</i> -st eemale. Acc65I lõikesait on allajoonitud.
RluFeesERI	5'-CGAATTCTGTGCTGCGCCGTT ATCTC-3'	Kasutati <i>rluF</i> eelse ala amplifitseerimiseks. Komplementaarne <i>rluF</i> -i eelse alaga positsioonides -444 kuni -427, suunaga <i>rluF</i> -i poole. EcoRI lõikesait on allajoonitud.
RluFtagaBH	5'-CGGATCCCATCAACTGGTCGC CACAC-3'	Kasutati <i>rluF</i> järgse ala amplifitseerimiseks. Komplementaarne <i>rluF</i> -i järgse alaga positsioonides +451 kuni +470, suunaga <i>rluF</i> -i poole. BamHI lõikesait on allajoonitud.
Prtac	5'- AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	Kasutati topeltlutsiferaasi testsüsteemi kontrolliks.
FlucDIR1	5'AGCTTCTGCCAACCGAACGGAC- 3'	
fw	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Kasutati sekveneerimisel. Plasmidi pNSW2 universaalpraimerid.
rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	

2.2.4 Plasmidi eraldamine ja restriksioonianalüüs

Rakkudest plasmidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen* plasmidieralduskomplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja protokollit.

Eraldatud plasmidi kontrollimiseks tehti restriksioonianalüüs. DNA restriksiooniks kasutati firma *Thermo Scientific* restriktase, järgides analüüsil tootja tingimusi. Restriksioonianalüüsi tulemusi visualiseeriti geelelektroforeesiga.

2.2.5 Geelelektroforees

PCR-i produkte ja restriktasidega lõigatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesil. Analüüsitavale proovile lisati 6 µl foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis) ning seejärel kanti 8 µl proovi 1% agarosgeelile 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi kontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees toimus pingel 130 V. Tulemusi visualiseeriti UV valguses.

2.2.6 *ArluF* tüve konstrueerimine

ArluF tüve konstrueerimisel kasutati modifitseerituna Pósfai töögrupi (Pósfai *et al.*, 1999) ja Martínez-García töögrupi (Martínez-García *et al.*, 2011) loodud meetodit.

Esmalt amplifitseeriti PCR-iga *Pseudomonas putida* PaW85 tüvest geenile *rluF* eelnev ja järgnev ala umbes 500 bp ulatuses, kasutades vastavalt praimeripaare RluFeesERI ja RluFdelAcc ning RluFtagaBH ja RluFoutAcc (tabel 2). Geenile eelnev ja järgnev ala sisestati vektorplasmidi pSNW2 kahe eraldi kloneerimisega. Esmalt sisestati vektorplasmidi pSNW2 geeni eelnev ala, kasutades selleks restriktase EcoRI ja Acc65I. Saadud plasmid nimetati kui pSNW2*ArluFees*. Seejärel sisestati sellesse plasmidi geeni järgnev ala, kasutades restriktase BamHI ja Acc65I ning tulemuseks saadud plasmid nimetati kui pSNW2*ArluF*.

Kloneerimiseks valmistati reaktsioonisegud, kus PCR-i produktide ja plasmid pSNW2 töötlemiseks kasutati *Thermo Scientific*'u ensüüme vastavalt tootja ettekirjutustele. Plasmidi restriksioonil lisati reaktsioonisegule 1 U aluselist fosfataasi FastAP, et hiljem plasmid iseendaga kokku ei liigeks. Restriksioon toimus temperatuuril 37°C 30 minutit ning seejärel inaktiveeriti ensüümid 5 minutilise termotöötusega temperatuuril 80°C. Restriksioonisegud sadestati 2,5x mahus 96% etanooli ja 0,1x mahus 5M NaCl lahusega temperatuuril -20°C 15

minutit. Sade tsentrifuugiti põhja (21000 x g) 10 minuti jooksul temperatuuril 4°C ning pesti 2 korda 150 µl 80% etanooliga. Sadet kuivatati temperatuuril 37°C, et etanoolist vabaneda ning lahustati seejärel 10 µl vees. Sadestatud restriksioonifragmentide ligeerimiseks valmistati 15 µl mahus ligaasisegu, mis sisaldas sadestatud DNA-d, vektorplasmidi, 1 mM ATP-d, 0,5 U T4 ligaasi ning 1x T4 ligaasi puhvrit. Ligeerimisreaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril. Ligaasisegu sadestati sarnaselt restriksioonisegudele ning sade lahustati 10 µl vees. Seejärel elektroporeeriti 4 µl ligaasisegu *E. coli* tüve DH5α λpir rakkudesse. Kloonimise õnnestumist kontrolliti PCR-iga, kasutades praimereid RluFeesERI ja RluFtagaBH (tabel 2). Kloneeritud plasmiidiga rakkudest eraldatud plasmiid sekveneeriti, veendumaks, et *ΔrluF* fragmenti ei ole PCR-i käigus tekkinud mutatsioone.

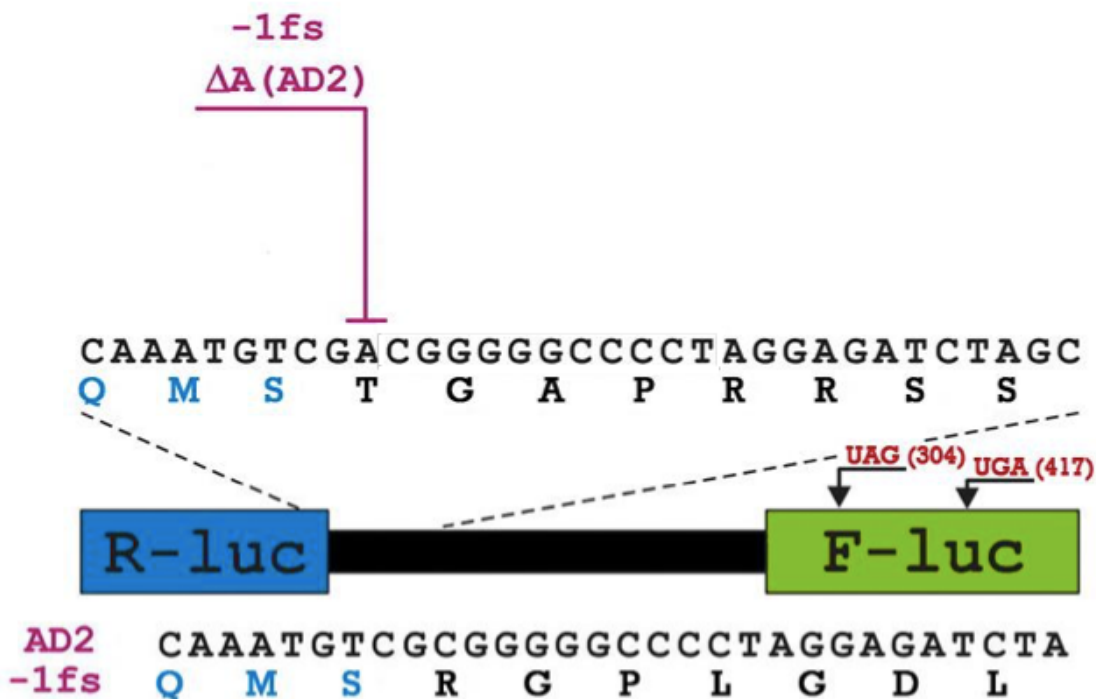
E. coli DH5α λpir rakkudest eraldati pSNW2/*ΔrluF* plasmiid ning viidi elektroporatsiooniga kompetentsetesse *P. putida* PaW85 rakkudesse. pSNW2/*ΔrluF* plasmiid ei replitseeru *P. putida*-s ning integreerub bakteri kromosoomi. Kointegraadiga rakke selekteeriti Km sisaldaval söötmel (75 µg/ml) ning kointegraadi olemasolu rakkudes kontrolliti PCR-iga, kasutades praimereid RluFeesERI ja RluFtagaBH. Seejärel elektroporeeriti kointegraati sisaldavatesse rakkudesse plasmiid pSW(I-SceI), mis kodeerib I-SceI endonukleaasi, kasutades selektsiooniks Pen sisaldavat LB-söödet. Plasmidi indutseerimiseks kasvatati rakke üleöö loksutil temperatuuril 30°C söötmes, millele lisati antibiootikumi Pen ja 3 mM meta-toluaati. Meta-toluaat on I-SceI promotori induktor ning indutseerimise tulemusena sünteesitakse endonukleas, mis tekitab kaheaheelalisi lõikeid kromosoomi integreerunud pSNW2/*ΔrluF* plasmidi I-SceI lõikesaitides. Selline lõikamine võimaldab homoloogilisel rekombinatsioonil toimuda *ΔrluF* fragmendi ja genoomis oleva *rluF* geeni eelse ja järgse ala vahel. Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena jääb genoomi pooltel juhtudel metsiktüüpi lookus ja pooltel juhtudel deletsiooni sisaldav lookus. Deletsioonlookusega rakud ei kasva Km sisaldaval söötmel. Homoloogilise rekombinatsiooni toimumise kontrolliks tehti üleöökultuurist lahjendusrida, mis külvati LB tassile. Seejärel tehti paralleelkylv tavalisele LB tassile ning Km sisaldavale LB tassile (50 µg/ml). Geeni *rluF* deleteerumist kontrolliti PCR-iga, kasutades matriitsina Km suhtes tundlikke kolooniaid ning praimeripaari RluFeesERI ja RluFtagaBH (tabel 2). Deletsioontüves plasmiidist pSW(I-SceI) vabanemiseks kasvatati rakke üleöö antibiootikumita 5 ml LB vedelsöötmes ning üleöökultuurist 15 µl inokuleeriti värskesse antibiootikumita LB vedelsöötmesse. Seda protsessi korrati 4 korda. Seejärel tehti 10⁵ lahjendus LB-tassile ning plasmidi kadumist kontrolliti paralleelkylviga antibiootikumita LB tassile ja Pen sisaldavale LB tassile. Konstrueeritud deletsioontüve kontrolliti sekveneerimisega.

2.2.7 Sekvenerimine

Sekvenerimist kasutati deletsioontüvede konstrueerimisel kontrolliks. Sekvenerimise reaktsioonisegu jaoks töödeldi esiteks PCR-i reaktsioonisegu 2,5 U eksonukleasiga ExoI (*Thermo Scientific*) ja 1 U aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*), et eemaldada PCR-i reaktsioonisegust üle jäänud praimerid ja nukleotiidid. Töötlus toimus 15 minutit temperatuuril 37°C, seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C. Sekvenerimiseks valmistati proovid ette kitiga „*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*“ firmalt *Applied Biosystem*. Sekvenerimise jaoks lisati reaktsioonisegusse (lõppmahuga 10 µl) 0,5 µl töödeldud PCR produkti ning praimerina kasutati fw ja rev, 1,6 pmol reaktsiooni kohta. Reaktsioon koosnes 30 tsüklist. Ühe tsükli etapid olid: 1) DNA denaturatsioon 15 sekundit temperatuuril 96°C; 2) praimerid seondumine 10 sekundit temperatuuril 50°C; 3) DNA süntees 1 minut temperatuuril 60°C. DNA järjestused määrati firma *Applied Biosystems* 3730xI kapillaarsekvenaatoriga. Sekveneritud järjestusi analüüsiti programmiga *BioEdit*.

2.2.8 Translatsioonitäpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga

Topeltlutsiferaasi testsüsteemiga translatsioonitäpsuse mõõtmiseks viidi *Pseudomonas putida* metsiktüvesse ja *ΔrluF* tüvesse reporterplasmiidid pSEVA AD2, pSEVA 304 ja pSEVA 417 (joonis 3). Plasmiidide olemasolu kontrolliti koloonia PCR-iga, kasutades praimeripaari Prtac ja FlucDIR1 (tabel 2).



Joonis 3. Skemaatiline esitus topeltlutsiferaasi testsüsteemist. Joonisel on näha testsüsteemilt kodeeritud liitvalku, kus lutsiferaasid Rluc ja Fluc on näidatud vastavalt siniselt ja roheliselt ning nendevaheline *linker*-regioon on märgitud mustaga. Liitvalgu joonise kohal on näidatud *linker*-regiooni nukleotiidne ja aminohappeline järjestus, mille peale on lillaga märgitud vektoris AD2 olev mutatsioon. Joonise all on välja toodud AD2 vektori nukleotiidne ja aminohappeline järjestus. Punasega on tähistatud stoppkoodonid. (Lilleorg *et al.*, 2017, muudetud).

Plasmiidiga rakkudega inokuleeriti 1,5 ml glcCAA söödet, kuhu oli lisatud antibiootikumi kanamütsiin (50 µg/ml) ning rakke kasvatati 17-20 tundi temperatuuril 30°C. Üleökultuuri optiline tihedus mõõdeti 580 nm juures ning seejärel lahjendati rakukultuuri kuni OD₅₈₀=0,1. Lahjendus tehti 2 ml värskesse glcCAA söötmesse, kuhu oli lisatud IPTG (lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM) ning rakke kasvatati 3 tundi temperatuuril 30°C. Mõõtmiseks tsentrifuugiti kokku 1 ml kummagi tüve rakukultuuri (2,5 min 12100 x g). Supernatant eemaldati ja rakud külmutati vedelas lämmastikus. Külmutatud rakud suspendeeriti 400 µl firma Promega 1x lüüsipuhvris.

Mõõtmist teostati *TECAN infinite M200 Pro* mikrotiiterplaadilugejaga. Mikrotiiterplaadile kanti 50 µl rakke sisaldavat lüüsipuhvrit ning 50 µl firma *Promega* topeltlutsiferaasi testsüsteemi Fluc-i substraati LAR II-te (LAR – *luciferase assay reagent*). Lahused segati omavahel suspendeerides ning LAR II lisamisel käivitati kell. Mikrotiiterplaadilugeja mõõtis lahuse luminesentsi 2 minutit peale LAR II lisamist. Plaadil olev reaktsioonisegu lahjendati 50x 1x lüüsipuhvris ja 100 µl lahjendatud reaktsioonisegule lisati LAR II lisamisest 4 minuti möödudes 50 µl Stop&Glo Rluc-i substraati, mis peatab LAR II reaktsiooni ning on substraadiks Rluc-i reaktsioonile. Mikrotiiterplaadilugeja mõõtis lahuse luminesentsi, kui

Stop&Glo lisamisest oli möödunud 2 minutit. Fluc/Rluc suhte statistiliseks analüüsiks kasutasin Student'i T-testi.

2.2.9 Mutatsioonisageduse mõõtmine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga

Rif^R/*rpoB* testsüsteemi kasutati *P. putida* metsiktüve ja Δ *rluF* tüve mutatsioonisageduse võrdlemiseks. *P. putida* metsiktüve ja Δ *rluF* tüve kasvatati glcCAA söötmes 6-7 tundi 30°C juures. Kummastki kultuurist tehti 25 ml värskesse glcCAA söötmesse 10⁵ lahjendus ja jaotati 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. Kultuure kasvatati loksutil temperatuuril 30°C ligikaudu 18 tundi. Seejärel plaaditi 500 µl kultuuri rifampitsiini sisaldavatele LB-tassidele ja inkubeeriti kaks päeva temperatuuril 30°C. Kolooniad loendati 24 tunni ja 48 tunni möödudes. (Jatsenko *et al.*, 2010)

Bakterirakkude elumust määrati kolooniaid moodustavate rakkude (CFU, ingl k – *colony forming unit*) arvukuse abil. Selleks tehti üleöö kasvanud bakterikultuuridest 1xM9 puhvrise 10⁸ lahjendused ning kanti lahjendusest 10 µl tilgad LB-tassile. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 30°C ning seejärel loendati tassile kasvanud kolooniad. Kolooniade arvu ja rakukultuuri lahjenduse põhjal arvutati elusrakkude hulk 1 ml üleöökultuuris. Arvestades rakukultuuri elumust ja Rif-söötmele ilmunud antibiootikumiresistentsete kolooniade arvu, leiti mutantide tekkesagedus järgneva valemiga:

$$\text{Mutantide sagedus} = \frac{\text{Mutantide arv/ml}}{\text{CFU/ml}}$$

Metsiktüve ja deletsioontüve mutantide tekkesageduse statistiliseks analüüsiks kasutasin Student'i T-testi.

2.2.10 Bioinformaatiline analüüs

Nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste joondamiseks kasutati programme Clustal Omega ja BLAST. *P. putida* türosiini tRNA ja RluF modifitseeritava *E. coli* türosiini tRNA struktuuride võrdlemiseks kasutati bioinformaatilist tööriista tRNAscan-SE, mis võimaldab nukleotiidsel järjestusel ennustada tRNA sekundaarstruktuuri, antikoodoni järjestust ja selle põhjal ka tRNA transporditavat aminohapet (Lowe & Chan, 2016).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *Pseudomonas putida* RluF substraatide virtuaalne analüüs

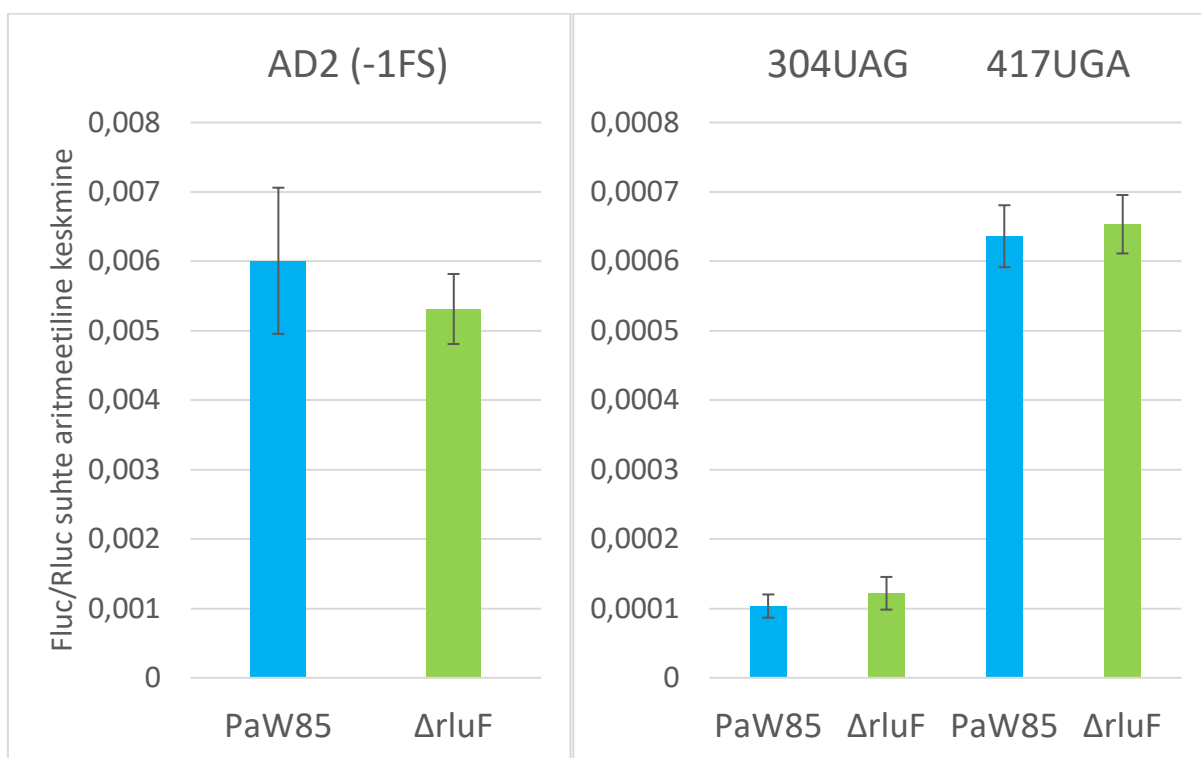
Kirjanduse ülevaates toodud andmed valgu RluF kohta pärinevad *E. coli*-st, kuna *P. putida*-s pole RluF-i uuritud. RluF modifitseerib *E. coli*-s türosiini tRNA-d positsioonis 35 ning 23S rRNA-d positsioonis 2604 (Limbach & Addepalli, B., 2016). Selleks, et leida RluF-i modifitseeritava türosiini tRNA nukleotiidsetes järjestuses samu sihtmärke bakteris *P. putida*, analüüsisin *P. putida* türosiini tRNA nukleotiidset järjestust tRNAscan-SE programmiga. *P. putida* RluF valgu (annotatsiooni järgi on *P. putida* RluF-i kodeeriv geen nimega *PP_1191*) ning *E. coli* RluF valgu aminohappelisi järjestusi joondades oli sarnasuse skoor 43%.

RluF modifitseerib *E. coli* 23S rRNA-s positsioonis 2604 asuvat uridiini. Joondades *P. putida* ning *E. coli* 23S rRNA nukleotiidseid järjestusi, selgus, et ka *P. putida* 23S rRNA-s on sarnases positsioonis uridiin, mida RluF potentsiaalselt modifitseerida võib. *E. coli* ja *P. putida* 23S rRNA nukleotiidseid järjestusi omavahel joondades selgus, et nende identsuse protsent on 84,22%. See näitab, et *E. coli* ja *P. putida* 23S rRNA on üsna konserveerunud, seda ka heeliksi 93 positsiooni 2604 läheduses, kus paikneb RluF-i modifitseeritav uridiin. tRNA substraatide analüüsil keskendusin *E. coli* kolmele türosiini kandvale tRNA-le, kuna kirjanduse andmetel modifitseerib RluF just nende tRNA-de antikoodonis paiknevaid uridiine. Bakteris *P. putida* leidub üks türosiini tRNA. Joondades *P. putida* türosiini tRNA ja kolme *E. coli* türosiini tRNA nukleotiidseid järjestusi, olid identsuse protsendid vastavalt 82,35%, 81,71% ning 81,18%. Programmiga tRNAscan-SE on võimalik nukleotiidse järjestuse põhjal ennustada tRNA sekundaarstruktuuri. *E. coli* ning *P. putida* türosiini tRNA-sid analüüsid selgus, et kõigi nelja tRNA antikoodonlingu struktuur ning väike osa antikoodonlingu õlast on sama nukleotiidse järjestusega, lisaks on ka *P. putida* türosiini tRNA-s uridiin positsioonis 35, mida RluF modifitseerib *E. coli*-s (lisad 1-4). Selle sarnasuse põhjal järeldan, et RluF võib modifitseerida ka *P. putida*-s türosiini tRNA-d.

Virtuaalse substraatide analüüsi põhjal on näha, et ka *P. putida*-s on olemas sihtmärgid, mida RluF *E. coli*-s modifitseerib. Geeni *rluF* puudumise mõju *P. putida* translatsioonitäpsusele ning mutatsioonisagedusele uurimiseks konstrueeriti *rluF* deletsioontüvi.

2.3.2 RluF mõju bakteri *P. putida* translatsioonitäpsusele

Translatsioonitäpsuse mõõtmiseks kasutati topeltlutsiferaasi testsüsteemi. Selles testsüsteemis on Rluc ja Fluc lutsiferaasid liidetud üheks valguks koos neid eraldava *linker*-regiooniga, aga mõlema valguga aktiivsust on võimalik eraldi mõõta. AD2 vektori puhul on eelnevalt suunatud mutageneesiga rikitud liitvalguga lugemisraam ning funktsionaalset Fluc valku toodetakse ainult juhul, kui *linker*-regioonis toimub translatsioonil raaminihe, mis kompenseerib rikitud lugemisraami. 304UAG ja 417UGA vektorite puhul on Fluc valgu kodeerivasse geeni sisse viidud enneaegsed stoppkoodonid ning funktsionaalset Fluc valku toodetakse ainult juhul, kui translatsiooni käigus toimub stoppkoodoni ülelugemine. Rluc valgu kodeerivat geeni ei ole geneetiliselt manipuleeritud ehk funktsionaalset valku toodetakse translatsioonivigadest olenemata ning see näitab operoni normaalset translatsiooni taset. Seetõttu saab Fluc ja Rluc suhte abil määrata uuritava translatsioonivea suhtelist sagedust. Käesolevas töös uurisin raaminihete toimumist (-1 raaminihe kasutades plasmidi pSEVA AD2) ning UGA ja UAG stoppkoodonite ülelugemist (kasutades vastavalt plasmide pSEVA 417 ja pSEVA 304).



Joonis 4. Translatsioonivigade suhteline sagedus bakteris *Pseudomonas putida*. Tulpade kohal on näidatud kasutatud vektori nimi. X-teljel on näidatud bakteritüved, sinisega on tähistatud metsiktüve PaW85 tulemused ning rohelisega deletsioontüve Δ rluF tulemused. Y-teljel on näidatud Fluc ja Rluc aktiivsuste suhte väärtuste aritmeetiline keskmine. Joonisel on toodud vähemalt kolme sõltumatu katse tulemuste keskväärtsed koos 95% usalduspiiridega. Igas katses oli mõõtmisel 4 bioloogilist replikaati.

Joonisel 4 on näha, et kõikide vaadeldud translatsioonivigade puhul on metsiktüve ja *ArluF* tüve translatsioonivigade esinemise suhtelised sagedused omavahel võrreldavad (statistiline erinevus puudus). Tulemustest saab järeldada, et valgu RluF puudumine ei mõjuta *P. putida* translatsioonitäpsust, vähemalt uuritud kontekstis. Siiski toimuvad erinevad translatsioonivead *P. putida*-s erineva sagedusega, kuna raaminihke esinemine on palju sagedasem kui kummagi uuritud stoppkoodoni ülelugemine. -1 raaminihe toimus ligikaudu 10 korda sagedamini kui stoppkoodoni UGA ülelugemine ning ligikaudu 60 korda sagedamini kui stoppkoodoni UAG ülelugemine. Stoppkoodoni UGA ülelugemine toimus 6-7 korda rohkem kui stoppkoodoni UAG ülelugemine. Sellised tulemused ühtivad varasemalt näidatud andmetega ka teiste bakterite puhul – *E. coli*-s ning *P. aeruginosa*-s toimub samuti UGA ülelugemine vastavalt 500 või 272 korda sagedamini kui UAG ülelugemine ning ka üldiselt toimub raaminihe mainitud bakterites suurema sagedusega kui stoppkoodoni ülelugemine (Jürgenstein *et al.*, 2022). RluF-i modifitseeritav 23S rRNA positsioon 2604 paikneb ribosoomi tertsiaarstruktuuris peptidüültransferaases tsentris, üsna lähedal A-saidile, kus toimub aminohapete lisamine sünteesitavasse valku. Käesoleva töö tulemuste puhul ei mõjuta Ψ2604 puudumine translatsioonitäpsust. Kuigi translatsioonitäpsus ei ole uuritud kontekstis RluF-i puudumisest mõjutatud, oleks tulevikuks sobiv uurimissuund RluF puudumise mõju rohkete türosiinikoodonitega mRNA translatsiooni täpsusele. Sellise mRNA puhul mängiks türosiini tRNA translatsioonil suuremat rolli ning võimalikud RluF puudumise mõjud tuleksid selgemalt välja.

Varasemalt on näidatud pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA mõju eri bakterite translatsioonitäpsusele. *P. putida* TruA deletsioontüves toimus -1 raaminihe pea 2,5 korda tihedamini kui metsiktüves. Viies deletsioontüvesse katalüütiliselt inaktiivset TruA valku kodeeriva geeni, toimus -1 raaminihe siiski ligikaudu kaks korda tihendamini kui metsiktüves, ehk raaminihet põhjustas otseselt TruA antikoodoni lähedusse sünteesitavate pseudouridiinide puudumine. Bakteris *Pseudomonas aeruginosa* ei olnud translatsioonitäpsus TruA või RluA puudumisest mõjutatud, välja arvatud TruA deletsioontüve puhul UAG stoppkoodoni ülelugemisel, kus translatsiooniviga toimus metsiktüvega võrreldes kaks korda sagedamalt, kuigi see erinevus ei olnud statistiliselt oluline. *E. coli* TruA deletsioontüves toimus -1 raaminihe kolmes erinevas uuritud geneetilises kontekstis 1,5 korda rohkem kui metsiktüves, samuti toimus UGA ja UAG stoppkoodoni ülelugemine vastavalt 1,3 ja 2,2 korda rohkem. *E. coli* RluA deletsioontüves aga vähenes nii -1 raaminihke toimumise sagedus vektori AD2 kontekstis kui ka UGA ja UAG ülelugemine 0,7-0,8 korda. (Jürgenstein *et al.*, 2022). Kokkuvõttes mõjutab TruA translatsioonitäpsust rohkem kui RluA, tõenäoliselt põhjusel, et

TruA modifitseerib *E. coli* näitel lausa 17 erineva tRNA positsioone 38-40 (Hur & Stroud, 2007), kuid RluA modifitseerib *E. coli*-s kõigest viie tRNA positsiooni 32 ja 23S rRNA positsiooni 746 (Hoang *et al.*, 2006). Arvestades, et RluF on võimeline *E. coli*-s modifitseerima ainult kolme türosiini tRNA-d positsioonis 35 ning positsiooni 2604 23S rRNA-s, mis avaldaks kumulatiivselt väiksemat mõju kui RluA või TruA sünteesitud modifikatsioonid, võib oletada, et RluF modifitseerib lihtsalt liiga väheseid tRNA-sid, et see translatsiooni olulisel määral mõjutaks. Samuti tundub *E. coli* olevat pseudouridiinide puudumisele tundlikum kui *P. putida*. Kuna käesoleva töö katsed toimusid just *P. putida*-ga, võib efekti puudumine tuleneda seni kirjeldamata eripärast, mistõttu mõjutab pseudouridiinide puudumine *P. putida*-t *E. coli*-st vähem.

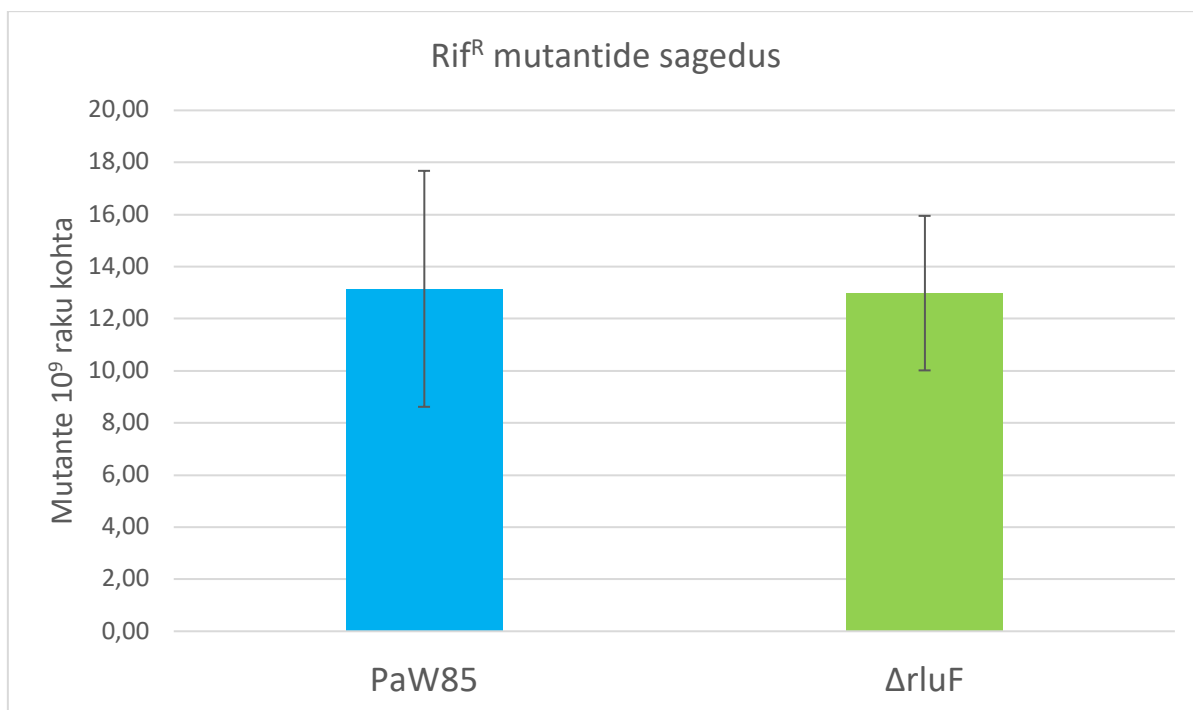
Täielikult sekveneeritud genoomide tRNA andmebaasi GtRNAdb uurides selgub, et nii *E. coli*, *P. putida*, *Saccharomyces cerevisiae* kui ka paljude teiste organismide genoomis leidub ainult GUA/GΨA antikoodoniga türosiini tRNA-sid ning AUA antikoodoniga türosiini tRNA-de esinemine on pigem haruldane. Sellele vaatamata esineb geenides AUA antikoodonile vastavat türosiini koodonit TAT. Järelikult peavad organismid kasutama GUA/GΨA antikoodoniga tRNAd ka TAT koodonil, kuhu antikoodon ideaalselt ei seondu. Kuna pseudouridiinid on võimelised moodustama rohkem vesiniksidemeid kui uridiin, võib pseudouridiinide funktsiooniks antikoodonis olla just antikoodoni interaktsioonide stabiliseerimine koodonitega, mis ei moodusta traditsioonilisi Watson-Crick paardumisi.

Türosiini tRNA antikoodoni keskel asuv pseudouridiin võib kindlates kontekstides stimuleerida stoppkoodoni UAG ülelugemist. *Nicotiana* perekonna taimede türosiini tRNA-s, millel on antikoodon GΨA, toimub UAG koodoni ülelugemine, aga sama ei toimu türosiini tRNA-s, millel on QΨA antikoodon (Q – hüpermodifitseeritud nukleotiid quenosiin). Sünteesitud GUA antikoodoniga türosiini tRNA samuti ei käitu UAG supressorina ehk supressoraktiivsus tuleneb antikoodoni pseudouridiinist. Kui asetada stoppkoodoniga GΨA *Nicotiana* türosiini tRNA tubaka mosaiikviiruse konteksti, toimub seal ka stoppkoodoni UGA ülelugemine. Kui sisestada *Nicotiana* türosiini tRNA GΨA antikoodonit piiravatesse koodonitesse mutatsioone, siis katkes translatsioon UAG stoppkoodonil ehk ülelugemist ei toimunud. Seega on Ψ sisaldava tRNA antikoodoni efekt suuresti mõjutatud koodonkontekstist. (Zerfass & Beier, 1992). Käesoleva töö tulemuste põhjal võib oletada, et selline pseudouridiinidest ning kontekstist sõltuv stoppkoodoni ülelugemine ei kehti *P. putida*-s ning seetõttu olid metsiktüves ja *ΔrluF* tüves stoppkoodoni ülelugemise sagedused võrreldavad. On ka võimalik, et RluF ei sünteesigi *P.*

putida türosiini tRNA antikoodoni 35. positsiooni pseudouridiini, kuna UAG stoppkoodoni ülelugemist ei toimunud deletsioontüves metsiktüvega võrreldes arvestatavalt sagedamini.

2.3.3 RluF mõju bakteri *P. putida* mutatsioonisagedusele

Selgitamaks välja RluF mõju *P. putida* eksponentsiaalse faasi rakkude mutatsioonisagedusele kasutati Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Selle testsüsteemiga on võimalik mõõta spontaansete mutatsioonide tekkesagedust, kasutades antibiootikumi rifampitsiin omadust seonduda RNA polümeraasi β subühikuga, mis põhjustab sünteesitava valguga elongatsiooni enneaegset terminatsiooni. Geen *rpoB* kodeerib RNA polümeraasi β subühikut. Kui selles geenis on toimunud mutatsioone, mis takistavad rifampitsiini molekuli seondumist RNA polümeraasi β subühikule, on bakterirakud rifampitsiinile resistentsed. Katses lisati LB tardsöötmesse rifampitsiini kontsentratsiooniga 100 $\mu\text{g/ml}$, mis on *P. putida* rakkudele letaalne. Kui eksponentsiaalse faasi rakkude mutatsioonisagedus on tõusnud, on ka toimunud rohkem mutatsioone *rpoB* geenis ning seetõttu ilmub rifampitsiini sisaldavale tardsöötmele rohkem resistentsed kolooniad. Katses võrreldi *P. putida* metsiktüve PaW85 ning geeni *rluF* deletsioontüve ΔrluF eksponentsiaalfaasi rakkude mutatsioonisagedusi.



Joonis 5. Rif^R mutantide tekkesagedus bakteris *P. putida*. Y-teljel on näidatud bakteritüve nimed, sinisega on näidatud *P. putida* metsiktüve PaW85 andmed ning rohelisega deletsioontüve ΔrluF andmed. X-teljel on mutantide arv 10⁹ raku kohta. Joonisel on toodud kolme sõltumatu katse tulemuste keskväärtused koos 95% usalduspiiridega. Igas katses oli mõõtmisel 4 bioloogilist replikaati.

Joonisel 5 on näha, et *P. putida* metsiktüve PaW85 ja RluF deletsioontüve $\Delta rluF$ mutatsioonisagedused on ligikaudu võrdsed ning statistilised erinevused tulemuste vahel puuduvad. Tulemustest võib järeldada, et RluF puudumine ei mõjuta *P. putida* mutatsioonisagedust eksponentsiaalses kasvufaasis.

Pseudouridiini süntaaside seost mutatsioonisagedusega on eelnevalt uuritud samuti TruA ja RluA näitel. *P. putida* TruA deletsioontüve mutatsioonisagedus suurenes metsiktüvega võrreldes viis korda ning RluA deletsioontüve mutatsioonisagedus suurenes kolm korda. Mõlemasse deletsioontüvesse vastavat katalüütiliselt inaktiivset valku kodeerivat geeni sisse viies jäi mutatsioonisagedus võrreldavaks täieliku deletsioontüvega ehk mutatsioonisageduse tõus tuleneb otseselt TruA ja RluA sünteesitavatest pseudouridiinidest. *P. aeruginosa* TruA deletsioontüve puhul suurenes mutatsioonisagedus taas, kuigi vaadeldud efekt oli väiksem kui *P. putida*-s. *P. aeruginosa* RluA deletsioontüves ei nähtud efekti mutatsioonisagedusele. (Tagel *et al.*, 2021). TruA puudumine mõjutab mutatsioonisagedust rohkem kui RluA puudumine, tõenäoliselt nende substraatide arvu erinevuse tõttu, mida kirjeldati täpsemalt eelnevas alapeatükis. RluF modifitseerib nii TruA kui RluA-ga võrreldes vähem substraate ning potentsiaalselt just selle tõttu ei ilmnenud käesolevas töös RluF puudumise efekti *P. putida* mutatsioonisagedusele. RluA puudumise mõju mutatsioonisagedusele erines drastiliselt *P. putida*-s ning *P. aeruginosa*-s, millest võib järeldada, et pseudouridiinide mõju mutatsioonisagedusele ning üldisemalt bakteri elutegevusele sõltub pseudouridiinide kontekstist ning spetsiifiliselt bakterist.

Katsetest selgus, et RluF puudumine ei avalda mõju *P. putida* translatsioonitäpsusele ega mutatsioonisagedusele. Arvestades, et *E. coli* ja *P. putida* RluF valkude aminohappeliste järjestuste vahel on vähe sarnasust, võib fenotüübilise mõju puudumise põhjuseks olla see, et RluF-i tRNA modifitseerimine on lisafunktsioon, mille on omandanud *E. coli* RluF, aga mitte *P. putida* RluF. *E. coli* ja *P. putida* RluF valkude sihtmärgid omavahel sarnased, kuid nende piirkondade nukleotiidsete järjestuste vahel leidub siiski väikseid erinevusi. Kuna RluF-i sihtmärgi äratundmise mehhanism ei ole täpselt teada, võivad just need mõnenukleotiidsed erinevused mängida olulist rolli RluF-i sihtmärgile seandumisel. Kui joondada omavahel *P. putida* ning *P. fluorescens*-i RluF valkude aminohappelisi järjestusi, on identsuse protsent 88,98%, mis näitab, et pseudomonaadide *rluF* geenid on omavahel üsna sarnased, aga mitte sarnased *E. coli*-ga. Kuna ka *P. fluorescens*-is pole RluF-i uuritud, on võimatu praeguse info põhjal kindlaid väiteid teha, aga on võimalik, et RluF tRNA-d modifitseeriv funktsioon *E. coli*-s on pigem erand kui reegel.

Kokkuvõte

RNA modifikatsioonide tõttu on RNA roll organismides väga mitmekesine. Pseudouridiinid on levinuim RNA modifikatsioon ning neid leidub kõikides elusorganismides. Pseudouridiinid võivad organismis olulised olla mitmete eri protsesside korrektsel toimimisel, stabiliseerides näiteks RNA tertsiaarstruktuuri ning lämmastikaluste *stacking*'ut. Pseudouridiine sünteesivad bakterites ensüümid nimega pseudouridiini süntaasid.

Varasemalt on meie laboris leitud, et pseudouridiini süntaaside TruA ja RluA puudumisel tõuseb bakteri *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedus ning TruA katalüütilise aktiivsuse puudumisel väheneb translatsioonitäpsus. Käesoleva töö eesmärgiks oli leida pseudouridiini süntaasi RluF mõju *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele. Tulemused näitasid, et:

1. RluF puudumine ei mõjuta *Pseudomonas putida* translatsioonitäpsust.
2. RluF puudumine ei mõjuta *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedust.

„Construction of a *Pseudomonas putida rluF* deletion mutant and its effects on translational fidelity and mutation frequency“

Carol Luhaäär

Summary

Modifications help RNA fulfill diverse roles, which are necessary for the efficient execution of many different processes in all living organisms. Pseudouridines are the most abundant RNA modification, found in various different forms of RNA. It has been previously established that pseudouridines help stabilize the tertiary structures of RNA, as well as provide additional hydrogen bonds to stabilize the interactions between nucleotides. In bacteria, pseudouridines are synthesized by special enzymes called pseudouridine synthases.

In our research group, previous work has shown that lack of catalytic activity of the pseudouridine synthases TruA and RluA increases mutation frequency in *Pseudomonas putida*. Lack of catalytic activity of the enzyme TruA also reduces translational fidelity. Thus, the aim for this dissertation was to construct an *rluF* deletion strain of *Pseudomonas putida* and study the effects of the deletion on translational fidelity and mutation frequency. The results of this study can be summarized as follows:

1. Translational fidelity in RluF-deficient *Pseudomonas putida* cells is not shown to have changed significantly as a result of the deletion.
2. RluF-deficient *Pseudomonas putida* cells do not have a noticeably different mutation frequency in comparison to wild-type *Pseudomonas putida* cells.

Tänuõnad

Soovin südamest tänada oma juhendajat Karl Jürgensteini kannatlikkuse, heade nõuannete ja toetuse eest. Tänan ka teisi laborikaaslasid, eriti Heili Ilvest, abivalmiduse eest.

Kasutatud kirjandus

- Agris, P. F., Narendran, A., Sarachan, K., Väre, V. Y. P., & Eruysal, E. (2017). Chapter One - The Importance of Being Modified: The Role of RNA Modifications in Translational Fidelity. In G. F. Chanfreau (Ed.), *The Enzymes* (Vol. 41, pp. 1–50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.03.005>
- Alian, A., DeGiovanni, A., Griner, S. L., Finer-Moore, J. S., & Stroud, R. M. (2009). Crystal Structure of an RluF–RNA Complex: A Base-Pair Rearrangement Is the Key to Selectivity of RluF for U2604 of the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, *388*(4), 785–800. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.029>
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, *154*(2), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF00330838>
- Björk, G. R., & Hagervall, T. G. (2014). Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function. *EcoSal Plus*, *6*(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013>
- Boccaletto, P., Machnicka, M. A., Purta, E., Piątkowski, P., Bagiński, B., Wirecki, T. K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P. A., Kotter, A., Helm, M., & Bujnicki, J. M. (2018). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(Database issue), D303–D307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030>
- Campo, M. D., Kaya, Y., & Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA*, *7*(11), 1603–1615.
- Charette, M., & Gray, M. W. (n.d.). *Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why*. 11.
- Conrad, J., Niu, L., Rudd, K., Lane, B. G., & Ofengand, J. (1999). 16S ribosomal RNA pseudouridine synthase RsuA of *Escherichia coli*: Deletion, mutation of the conserved Asp102 residue, and sequence comparison among all other pseudouridine synthases. *RNA*, *5*(6), 751–763. <https://doi.org/10.1017/S1355838299990167>
- Davis, D. R. (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic Acids Research*, *23*(24), 5020–5026. <https://doi.org/10.1093/nar/23.24.5020>
- Davis, F. F., & Allen, F. W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, *227*(2), 907–915.
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Dennis, P. P., Omer, A., & Lowe, T. (2001). A guided tour: Small RNA function in Archaea. *Molecular Microbiology*, *40*(3), 509–519. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02381.x>

- Dunkle, J., Xiong, L., Mankin, A., & Cate, J. (2010). Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*, 17152–17157. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007988107>
- Gutgsell, N. S., Campo, M. D., Raychaudhuri, S., & Ofengand, J. (2001). A second function for pseudouridine synthases: A point mutant of RluD unable to form pseudouridines 1911, 1915, and 1917 in Escherichia coli 23S ribosomal RNA restores normal growth to an RluD-minus strain. *RNA*, *7*(7), 990–998. <https://doi.org/10.1017/S1355838201000243>
- Gutgsell, N. S., Deutscher, M. P., & Ofengand, J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in Escherichia coli. *RNA*, *11*(7), 1141–1152. <https://doi.org/10.1261/rna.2550105>
- Hamma, T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Pseudouridine Synthases. *Chemistry & Biology*, *13*(11), 1125–1135. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.009>
- Hoang, C., Chen, J., Vizthum, C. A., Kandel, J. M., Hamilton, C. S., Mueller, E. G., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Crystal Structure of Pseudouridine Synthase RluA: Indirect Sequence Readout through Protein-Induced RNA Structure. *Molecular Cell*, *24*(4), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.017>
- Hur, S., & Stroud, R. M. (2007). How U38, 39, and 40 of Many tRNAs Become the Targets for Pseudouridylation by TruA. *Molecular Cell*, *26*(2), 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.027>
- Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., & Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rifr mutations in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *683*(1), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>
- Jürgenstein, K., Tagel, M., Ilves, H., Leppik, M., Kivisaar, M., & Remme, J. (2022). Variance in translational fidelity of different bacterial species is affected by pseudouridines in the tRNA anticodon stem-loop. *RNA Biology*, *19*(1), 1050–1058. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2121447>
- Kaya, Y., & Ofengand, J. (2003). A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *RNA*, *9*(6), 711–721. <https://doi.org/10.1261/rna.5230603>
- Kierzek, E., Malgowska, M., Lisowiec, J., Turner, D. H., Gdaniec, Z., & Kierzek, R. (2014). The contribution of pseudouridine to stabilities and structure of RNAs. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), 3492–3501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1330>
- King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., & Fournier, M. J. (2003). Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs that Form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center. *Molecular Cell*, *11*(2), 425–435. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00040-6)

- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal*, 20(14), 3617–3622. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>
- 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(12), 2411–2415. <https://doi.org/10.1093/nar/24.12.2411>
- Lázaro, E., Rodríguez-Fonseca, C., Porse, B., Ureña, D., Garrett, R. A., & Ballesta, J. P. G. (1996). A Sparsomycin-resistant Mutant of *Halobacterium salinarum* Lacks a Modification at Nucleotide U2603 in the Peptidyl Transferase Centre of 23 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 261(2), 231–238. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0455>
- Li, J., Esberg, B., Curran, J. F., & Björk, G. R. (1997). Three modified nucleosides present in the anticodon stem and loop influence the in vivo aa-tRNA selection in a tRNA-dependent manner 11 Edited by D. E. Draper. *Journal of Molecular Biology*, 271(2), 209–221. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1176>
- Li, S., & Mason, C. E. (2014). The pivotal regulatory landscape of RNA modifications. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15, 127–150. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025405>
- Lilleorg, S., Reier, K., Remme, J., & Liiv, A. (2017). The Intersubunit Bridge B1b of the Bacterial Ribosome Facilitates Initiation of Protein Synthesis and Maintenance of Translational Fidelity. *Journal of Molecular Biology*, 429(7), 1067–1080. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.015>
- Limbach, P. A., & Addepalli, B. (2016). Pseudouridine in the Anticodon of *Escherichia coli* tRNA^{Tyr}(QΨA) Is Catalyzed by the Dual Specificity Enzyme RluF. *Journal of Biological Chemistry*, 291(42), 22327–22337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.747865>
- Lin, T.-Y., Mehta, R., & Glatt, S. (2021). Pseudouridines in RNAs: Switching atoms means shifting paradigms. *FEBS Letters*, 595(18), 2310–2322. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14188>
- Liu, M., & Douthwaite, S. (2002). Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14658–14663. <https://doi.org/10.1073/pnas.232580599>
- Long, K. S., & Vester, B. (2009). Antibiotics resistance in bacteria caused by modified nucleosides in 23S ribosomal RNA. In H. Grosjean (Ed.), *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (pp. 537–549). Plenum Publishing Corporation.
- Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: Integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44(Web Server issue), W54–W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>

- Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-Rodríguez, M., & de Lorenzo, V. (2011). pBAM1: An all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*, *11*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-38>
- Miller, J. H. (1992). *Short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=short+course+in+bacterial+genetics&author=Miller%2C+Jeffrey+H.&publication_year=1992
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, *57*(4), 585–597. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90128-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90128-1)
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Letters*, *514*(1), 17–25. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02305-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02305-0)
- Ofengand, J., & Del Campo, M. (2004). Modified Nucleosides of Escherichia coli Ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, *1*(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.4.6.1>
- Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Bereczki, Z., & Blattner, F. R. (1999). Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Research*, *27*(22), 4409–4415. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4409>
- Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B. G., & Ofengand, J. (1998). A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of Escherichia coli. *RNA*, *4*(11), 1407–1417. <https://doi.org/10.1017/S1355838298981146>
- Raychaudhuri, S., Niu, L., Conrad, J., Lane, B. G., & Ofengand, J. (1999). Functional Effect of Deletion and Mutation of the Escherichia coli Ribosomal RNA and tRNA Pseudouridine Synthase RluA *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(27), 18880–18886. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.18880>
- Samuelsson, T., & Olsson, M. (1990). Transfer RNA pseudouridine synthases in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(15), 8782–8787. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38956-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38956-2)
- Smith, T. J., Tardu, M., Khatri, H. R., & Koutmou, K. S. (2022). mRNA and tRNA modification states influence ribosome speed and frame maintenance during poly(lysine) peptide synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *298*(6). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102039>
- Tagel, M., Ilves, H., Leppik, M., Jürgenstein, K., Remme, J., & Kivisaar, M. (2021). Pseudouridines of tRNA Anticodon Stem-Loop Have Unexpected Role in Mutagenesis in Pseudomonas sp. *Microorganisms*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010025>

- Toh, S.-M., & Mankin, A. S. (2008). An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 380(4), 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.027>
- Urbonavičius, J., Qian, Q., Durand, J. M. B., Hagervall, T. G., & Björk, G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *The EMBO Journal*, 20(17), 4863–4873. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4863>
- Volke, D. C., Friis, L., Wirth, N. T., Turlin, J., & Nickel, P. I. (2020). Synthetic control of plasmid replication enables target- and self-curing of vectors and expedites genome engineering of *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering Communications*, 10, e00126. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00126>
- Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>
- Zerfass, K., & Beier, H. (1992). Pseudouridine in the anticodon G psi A of plant cytoplasmic tRNA(Tyr) is required for UAG and UAA suppression in the TMV-specific context. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 5911–5918.
- Zhao, J., Leung, H.-C. E., & Winkler, M. E. (2001). The miaA Mutator Phenotype of *Escherichia coli* K-12 Requires Recombination Functions. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1796–1800. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1796-1800.2001>

Kasutatud veebiaadressid

<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

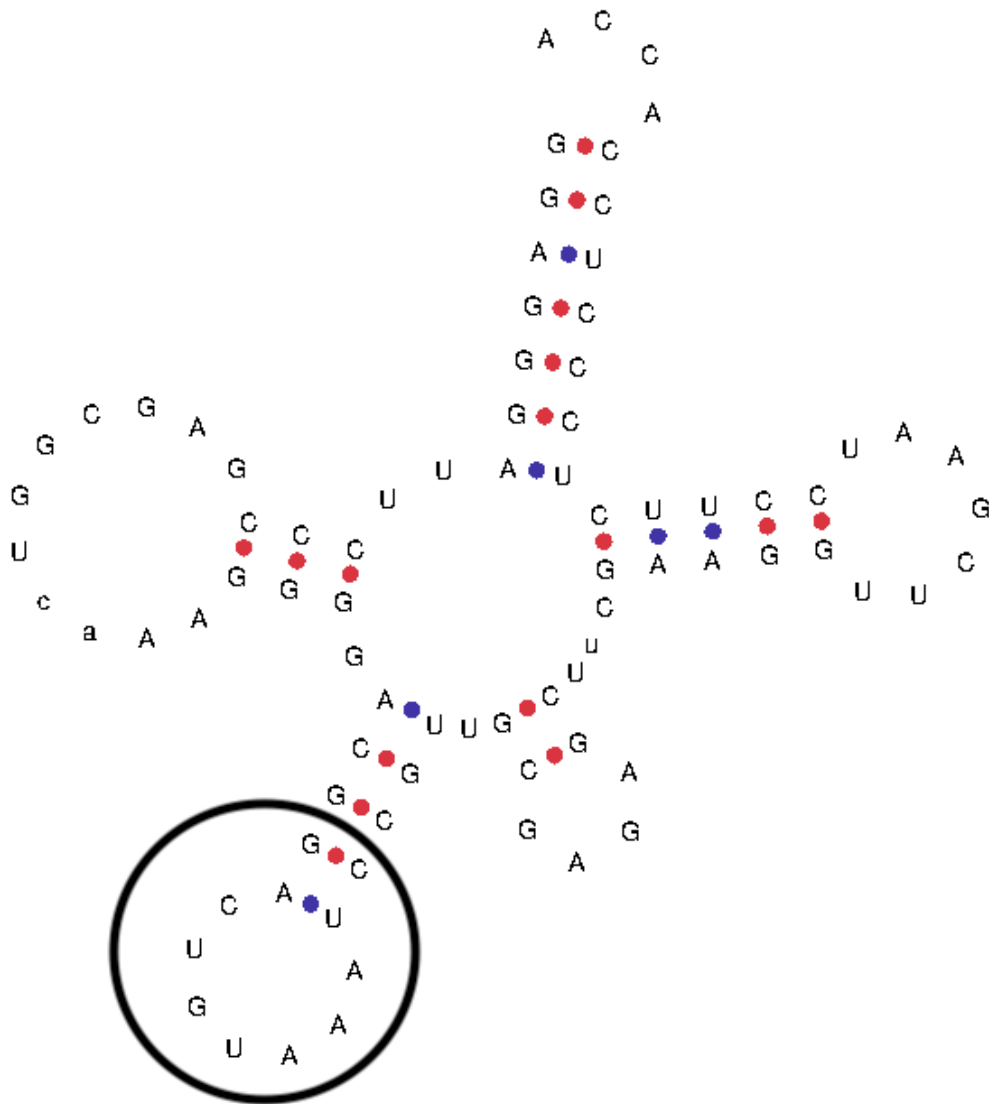
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://pseudomonas.com>

<http://gtrnadb.ucsc.edu>

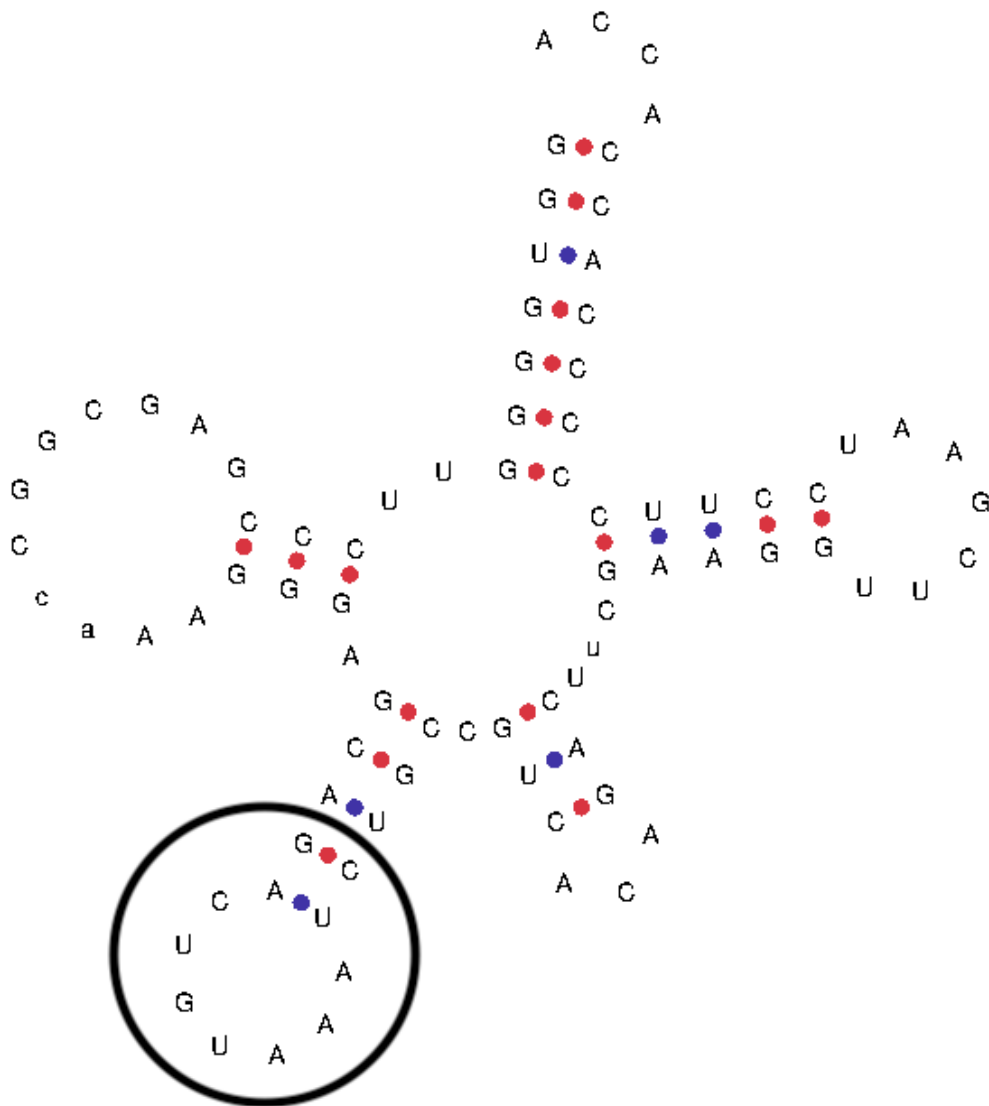
Lisad

putida.tma1 Tyr (GTA) 75.8 bits



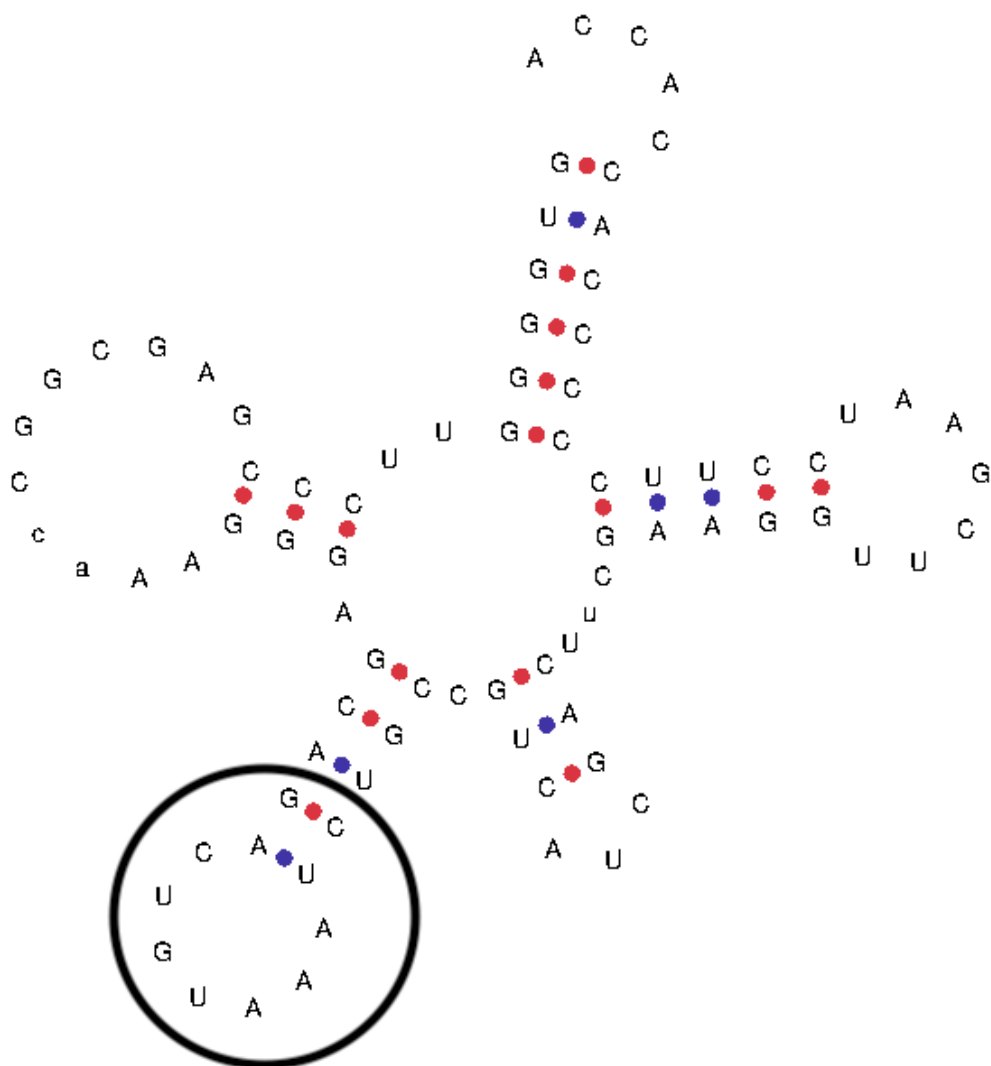
Lisa 1. *Pseudomonas putida* türosiini tRNA sekundaarstruktuur, ennustatud programmiga tRNAscan-SE. Ringiga on tähistatud antikoodoni ling-õla struktuuri osa, mis on sarnane nii *P. putida* kui *E. coli* türosiini tRNA-de nukleotiidses järjestuses.

coli11.trna1 Tyr (GTA) 73.0 bits



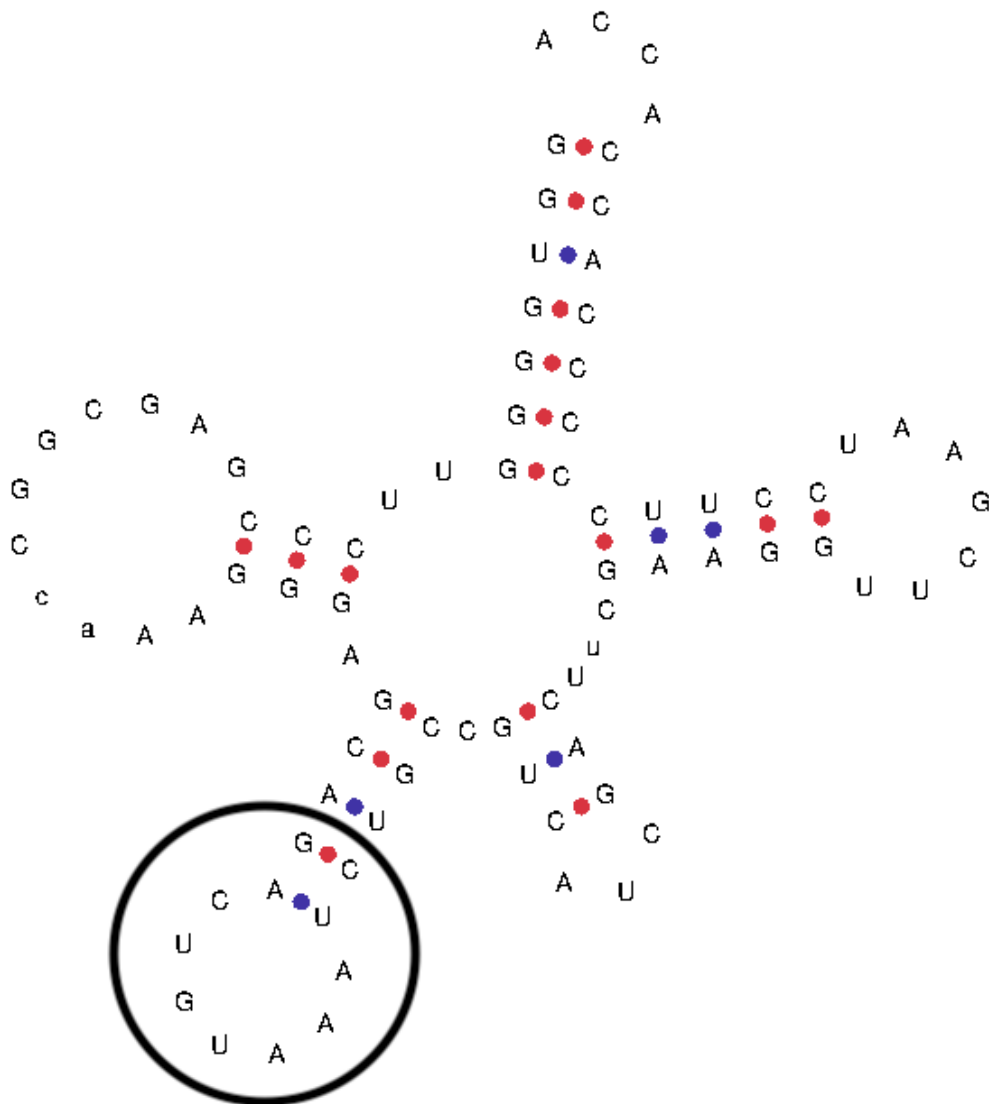
Lisa 2. *Escherichia coli* kolmest türosiini tRNA-st esimese sekundaarstruktuur, ennustatud programmiga tRNAscan-SE. Ringiga on tähistatud antikoodoni ling-õla struktuuri osa, mis on sarnane nii *P. putida* kui *E. coli* türosiini tRNA-de nukleotiidses järjestuses.

coli21.trna1 Tyr (GTA) 64.1 bits



Lisa 3. *Escherichia coli* kolmest türosiini tRNA-st teise sekundaarstruktuur, ennustatud programmiga tRNAscan-SE. Ringiga on tähistatud antikoodoni ling-õla struktuuri osa, mis on sarnane nii *P. putida* kui *E. coli* türosiini tRNA-de nukleotiidses järjestuses.

coli22.trna1 Tyr (GTA) 72.2 bits



Lisa 4. *Escherichia coli* kolmest türosiini tRNA-st kolmanda sekundaarstruktuur, ennustatud programmiga tRNAscan-SE. Ringiga on tähistatud antikoodoni ling-õla struktuuri osa, mis on sarnane nii *P. putida* kui *E. coli* türosiini tRNA-de nukleotiidses järjestuses.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Carol Luhaäär,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „*Pseudomonas putida rluF* deletsioontüve konstrueerimine ning deletsiooni mõju translatsioonitäpsusele ja mutatsioonisagedusele“,

mille juhendaja on Karl Jürgenstein, MSc,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Carol Luhaäär
24.05.2023