

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Pavel Volõnkin

***Escherichia coli* ribosoomi valkude L36A ja L36B tähtsusest
translatsioonil**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Ph.D Aivar Liiv

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Prokarüootne ribosoom	6
1.2 50S alamühik	6
1.3 30S alamühik	8
1.4 Ribosomaalsed valgud	10
1.5 Ribosomaalsete valkude heterogeensus	11
1.6 Ribosomaalne valk L36	12
1.7 Sekretsiooni ehk Sec translokatsiooni süsteem.....	14
EKSPERIMENTAALNE OSA	17
1. Töö eesmärk	17
2. Materjal ja meetodika.....	18
2.1 Bakteritüved ja plasmiidid	18
2.2 Söötmed	20
2.3 Generatsiooniaja määramine.....	21
2.4 Üleekspressiooni plasmiidide ja kompensatsioonitüvede konstrueerimine.....	21
2.5 Ribosoomide preparatiivne eraldamine	23
2.6 Ribosoomi profiili analüüs <i>in vivo</i>	25
2.7 Peptidüültransferaase aktiivsuse (e. PTC) test	25
2.8 <i>In vitro</i> translatsioonikatse	26
3. Tulemused ja arutelu	27
3.1 Kasvufenotüübi analüüs	27
3.2 <i>In vitro</i> translatsioon	33

3.3 Ribosoomide analüüs <i>in vivo</i>	35
KOKKUVÕTTE	38
SUMMARY	39
TÄNUSÕNAD	41
KASUTATUD KIRJANDUS	42
LIHTLITSENTS	48

KASUTATUD LÜHENDID

[3H]NacPhe – radioktiivse märgisega N-atsetüül-fenüülalaniin;

Amp – ampitsilliin;

DTT – Ditiotritool;

EF-G – elongatsiooni faktor G;

EF-Tu – elongatsiooni faktor Tu;

GFC filter – *glass microfiber* filtrid;

Km – kanamütsiin;

OV puhver – *overlay* puhver;

PheRS – fenüülalaniini tRNA süntetaas;

PM – *polymix* puhver;

PTC – peptidültransferaasne tsepter;

SISSEJUHATUS

Ribosoom on suur ribonukleoproteiin kompleks, mis vastutab valkude sünteesi eest nii prokarüootidel kui ka eukarüootidel. Prokarüootsed 70S ribosoomid koosnevad 54 r-valgust ja kolmest ribosomaalsest RNA-st. rRNA käivatab põhilisi ensümaatilisi protsesse ja r-valgud stabiliseerivad rRNA tertsiaalstruktuuri.

Kuigi ribosoomi koostist peetakse stabiilseks, on uuringud näidanud, et rakus võib esineda erinevaid ribosoomi subpopulatsioone. Üks viis ribosoomi heterogeensuse saavutamiseks on r-valkude geenide duplikatsioon ehk paraloogid. *E. coli*'l on senini tuvastatud L31 ja L36 paraloogsed valgud – vastavalt L31B ja L36B.

Eelnevad uuringud on näidanud, et L36 puudumine rakkus võib põhjustada struktuurseid muudatusi ribosoomis ja mõjutada rakkude kasvufenotüüpi. Samas teistes töödes arvatakse, et L36A deleteerimine mõjutab translokatsioonisüsteemi valgu SecY mRNA taseme langust.

Käesoleva bakalareusetöö kirjanduse osa annab ülevaate ribosoomi struktuurist, sh eriti r-valgust L36 ja tema võimalikest seostest Sec translokatsiooni süsteemi kuuluva SecY valguga.

Eksperimentaalse osa töö eesmärk on välja selgitada, kuidas L36 puudumine mõjutab ribosoomi valgusünteesivõimet. Lisaks uuriti võrdlevalt L36 paraloogide mõju translatsioonile ja seoseid L36 ja SecY valkude vahel. Eesmärgi saavutamiseks viidi läbi *in vitro* translatsiooni katseid, kasvufenotüübi ja 70S assosatsiooni analüüsid *in vivo*.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Prokarüootne ribosoom

Ribosoom on universaalne molekulaarne masin, mille funktsiooniks on geneetilise informatsiooni tõlkimine ehk translatsioon peptiidahela sünteesi kaudu valkude keelde.

Ribosoom on makromolekulaarne valk-RNA kompleks, mis koosneb kahest eri suurusega alamühikust, mida vastavalt nende sedimentatsioonikoefitsendile tähistatakse prokarüootide puhul väike 30S ja suur 50S alamühik. Translatsiooni initsiatsioonil alamühikud liituvad 70S ribosoomiks ja moodustavad koos kolm tRNA sidumispiirkonda: aminoatsüül-tRNA sait (*A-site*), peptidüül-tRNA sait (*P-site*) ja exit-tRNA sait (*E-site*) (Selmer *et al.*, 2006). *E. coli* 70S ribosoomi läbimõõt on ligikaudu 210 Å ning selle molekulmass on $2,5 \times 10^6$ Da (Schuwirth *et al.*, 2005; Ramakrishnan ja Moore, 2001), millest 1/3 moodustavad ribosoomi valgud ja 2/3 rRNA (Ramakrishnan ja Moore, 2001). *E. coli* ribosoomis on kolm ribosomaalset RNA-d (30S alamühikus – 16S; 50S alamühikus – 5S ja 23S) ja 54 ribosomaalset ehk r-valku (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wittman, 1982).

1.2 50S alamühik

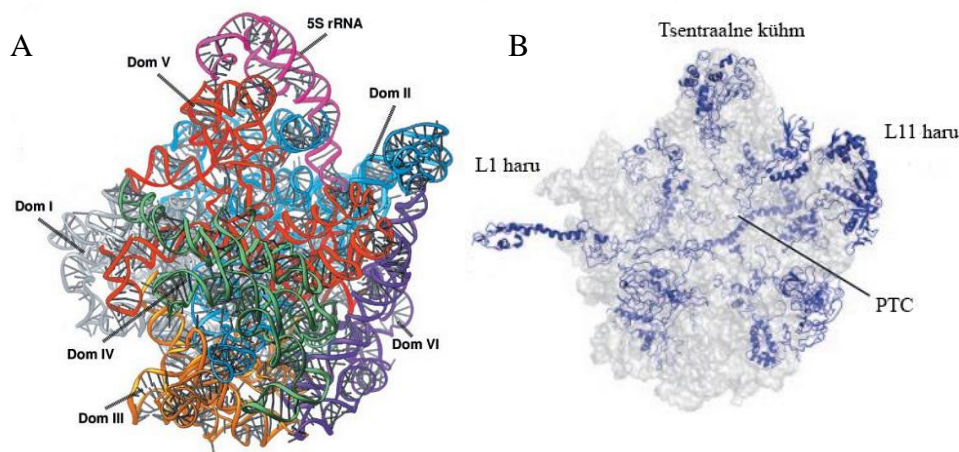
Prokarüootse ribosoomi suur, 50S alamühik molekulmassiga ligikaudu $1,5 \times 10^6$ Da, koosneb 23S ja 5S rRNA-st ning 33 (L1–36, L ehk *large*) r-valgust (Yonath, 2002; Wilson ja Nierhaus, 2005). 23S rRNA koosneb 2904 nukleotiidist, mida sekundaarstruktuuri alusel võib jaotada kuude domeeni (Wittman 1982) ja 120 nukleotiidi pikkusest 5S rRNA-st, mis moodustab iseseisva RNA struktuuri (Yusupov *et al.*, 2001). Suure subühiku 5S rRNA interakteerub 23S rRNA-ga valkude L25 ja L5 vahendusel (Wittman 1982; Yusupov *et al.*, 2001; Ban *et al.*, 2000). Kõik kuus 23S rRNA domeeni ja 5S rRNA moodustavad kompaktse ja monoliitse RNA tertsiaalstruktuuri (joonis 1A; Ban *et al.*, 2000).

Samas, ribosoomi suure alamühiku kompaktsest poolkerakujulisest tertsiaalstruktuurist eristuvad kolm väljaulatavat jätket – L1 haru, tsentraalne kühm ja L11 haru (joonis 1B) (Yusupov *et al.*, 2001; Schuwirth *et al.*, 2005). L1 haru asub subühikute kokkupuutepinna poolt vaadates vasakul küljel ja koosneb L1 r-valgust ning 23S rRNA heeliksitest 76, 77 ja 78 (Nikulin *et al.*, 2003; Tishchenko *et al.*, 2012). Selle haru interaktsioon E-saidis paikneva tRNA õla ja väikese

alamühiku S7 valguga võimaldab dünaamilist aktiivsust, mille tulemusel saab ribosoomist vabastada E-saidi tRNA (Nikulin *et al.*, 2003).

30S alamühiku poolt vaadates paremal poolel asub L11 haru, mida kutsutakse ka L7/L12 haruks (Diaconu *et al.*, 2005). See haru koosneb L10 ja L11 valkudest, millega interakteeruvad 23S rRNA heeliksid 42 ja 44, ning tetrameerist (L7/L12)₄, mis interakteerub otseselt L10-ga ((L7/L12)₄-L10 pentameer) (Diaconu *et al.*, 2005). 50S alamühik vahendab (L7/L12)₄ abil valkude biosünteesi ajal GTP-d siduvate regulaatorvalkude seondumist, mis osalevad sellistes translatsioonitsükli etappides nagu initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon (Ban *et al.*, 2000)

Tsentraalse kühmu moodustavad 5S ja 23S rRNA, eriti selle V domeeni heeliksid 80-88, ning sellega assotsieerunud r-valgud L5, L18, L25, L27 ja L31 (Ban *et al.*, 2000; Gongadze, 2011; Selmer *et al.*, 2006). Erinevalt L1 ja L11 harudest osalevad tsentraalse kühmu komponendid B1a ja B1b sildade tekitamises (Gao *et al.*, 2003).



Joonis 1. 50S alamühiku struktuur vaadatuna väikese subühiku poolt. (A) 50S alamühiku rRNA tertsiaalstruktuur, millel on erinevate värvidega välja toodud sekundaarstruktuuri domeenid ja 5S rRNA. Joonis kohandatud Ban *et al.*, 2000. (B) 50S subühiku moodustavad r-valgud (sinine) ja rRNA (hall). Joonisel on viidatud suure subühiku morfoloogilised tunnused - L1 haru, tsentraalne kühm ja L11 haru. Samuti on näidatud peptidüültransferaasne tsepter (PTC), kus katalüüsitakse peptiidsideme sünteesi. Joonis on kohandatud artiklist Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007.

Ribosoomi peptidüültransferaasne tsenterist, kus toimub peptiidsideme süntees, asub 23S rRNA V domeenis ning paikneb ruumiliselt 70S ribosoomi keskel (joonis 1B; Noller, 1991).

Peptidüültransferaasest tsentrist algab ~100 Å pikkune sünteesitava peptiidi väljumistunnel.

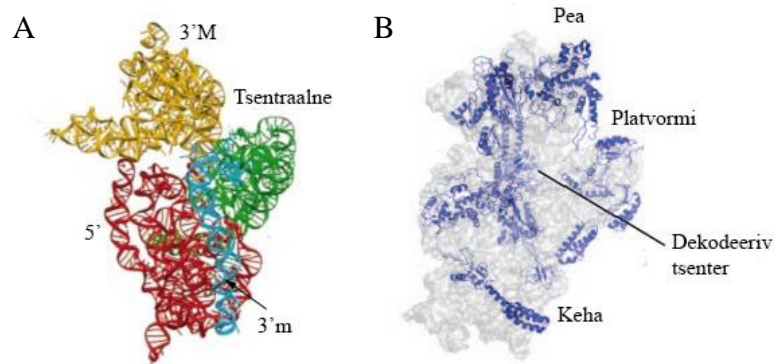
Tähtsat osa tunneli seina moodustamises mängivad r-valkude L4, L22 ja L39e r-valkude mitte-globulaarsed osad (Nissen *et al.*, 2000).

1.3 30S alamühik

30S alamühik koosneb 21 (S1–S21, S ehk *small*) r-valgust ja 16S rRNA-st (1542 nukleotiidi) (Wittman, 1982). Väikese alamühiku molekulaarmass on ligikaudu $8,5 \times 10^5$ Da (Yonath, 2002).

30S alamühiku kuju on määratud 16S rRNA poolt, mida stabiliseerivad r-valgud (Wimberly *et al.*, 2000). 16S rRNA võib sekundaarstruktuuri alusel jagada nelja domeeni (5', 3' minoorne, 3' mažoorne ja tsentraalne), mis erinevalt 50S subühikust moodustavad omaette üksused ka tertsiaalstruktuuris (joonis 2A; Ban *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). R-valkude paiknemist võib määratleda nende rRNA domeenide järgi, millega nad interakteeruvad. (Wimberly *et al.*, 2000; Wilson ja Nierhaus, 2005). 16S rRNA sekundaarstruktuur ja temaga assotsieerunud r-valgud moodustavad kolm selget 30S alamühiku tertsiaalstruktuuri üksust (joonis 2B; Wimberly *et al.*, 2000; Wilson ja Nierhaus, 2005):

- 1) 30S subühiku „keha“ (*body*) moodustavad 5' ja 3' minoorne domeen ja S4, 5S, S12, S16, S17 ja S20 r-valgud
- 2) „pea“ (*head*) moodustavad 3' mažoorne domeen ja järgmised valgud: S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14 ja S19
- 3) „platvormi“ (*platform*) koosneb tsentraalsest domeenist, millega interakteeruvad valgud S1, S6, S8, S11, S15 ja S18



Joonis 2. 30S alamühiku struktuur vaadatuna suure subühiku poolt. (A) 16S rRNA sekundaarsed struktuursed domeenid - tsentraalne, 5', 3' mažoorne (3[']M) ja 3' minoorne (3' m) Joonis on kohandatud artiklist Wimberly *et al.*, 2000.(B) 16S rRNA (hall) ja r- Valkude (sinised) poolt moodustatud tersiaalstruktuurid – pea, platvorm ja keha. Joonis on kohandatud artiklist Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007.

30S alamühiku organisatsioon, kus iga struktuurne domeen moodustub ühe 16S rRNA sekundaarse domeeni põhjal (joonis 2A), on erinev 50S alamühiku organisatsioonist, kus struktuursed domeenid moodustavad ühtse monoliitse struktuuri (joonis 1A; Ban *et al.*, 2000). Selline 30S organisatsioon viitab alamühiku suuremale konformatsioonilisele paindlikusele (Ban *et al.*, 2000), mis on vajalik tRNA antikoodoni efektiivseks dekodeerimiseks ja tRNA-de ning mRNA translatsiooniks (Demirci *et al.*, 2013; Ratje *et al.*, 2010).

30S alamühik mängib otsustavat rolli mRNA dekodeerimisel, kontrollides õiget aluspaardumist mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vahel (Wimberly *et al.*, 2000). See saavutatakse 16S rRNA kolme konserveerunud nukleotiitidega A1492, A1493 (mõlemad asuvad 3' minoorses domeenis) ja G530 (tsentraalses domeenis), mis kontrollivad kolme koodon-antikoodon aluspaari geomeetriat, et eristada õiget aluspaardumist valepaardumisest (Dunkle ja Cate, 2013). Koos initsiatsioonifaktoritega IF1, IF2 ja IF3 mängib 30S alamühik otsustavat rolli translatsiooni initsiatsiooni kompleksi moodustamisel ja õige start-koodoni otsimisel, mida saavutatakse mRNA 5' mittetransleeritava Shine-Dalgarno järjestuse seondumisel 16S rRNA-s paikneva anti-Shine-Dalgarno järjestusega (Kozak, 1999; Yusupova *et al.*, 2001).

1.4 Ribosomaalsed valgud

Ligikaudu kolmandiku 70S ribosoomi massist moodustavad r-valgud. Ribosoomi valgud ehk r-valgud on vajalikud ribosoomi struktuuri ja funktsionaalsuse hoidmiseks ja neid võib defineerida kui valke, mis esinevad ribosoomis stöhhiomeetrilises koguses (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Ribosomaalsed valgud on esindatud ribosoomis ühes korduses, välja arvatud tetrameerne (L7/L12)₄ (Yusupov *et al.*, 2001; Wilson ja Nierhaus, 2005). Samal ajal on translatsioonifaktorid ribosoomis esindatud vähem kui ühe koopiaga ribosoomi kohta (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Ribosomaalsed valgud on üldiselt aluselised (keskmine pI ~10,1), mis viitab nende põhilisele funktsioonile – neutraliseerida rRNA fosfaatrühmade negatiivseid laenguid. Eranditeks on happelised S1, S6 ja L7/L12 r-valgud, mille pI väärtus varieerub 4–5 vahel ja mis rRNA asemel interakteeruvad teiste r-valkudega (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Ribosomaalsed valgud asuvad valdavalt hajutatult partikli solvendi poolisel küljel (Ban *et al.*, 2000; Wilson ja Nierhaus, 2005). Paljud r-valgud koosnevad vähemalt ühest globulaarsest domeenist (enamasti asub ribosoomi solvendi poolisel küljel), ja struktuuritust jätkest, mis omandab struktuuri alles subühiku koosseisus (Wilson ja Nierhaus, 2005). Kõik 30S (v.a S4 ja S15) r-valgud ja 50% 50S alamühiku r-valkudest omavad pikka jätket, mis on kas N- või C-terminaalse otsa struktuuritu ling, α -heeliks või β -lehtstruktuur valgu keskosas (Wilson ja Nierhaus, 2005). Jätked sisaldavad mitut glütsiini jääki, mis annab painduvust ja võimaldab neid tihedasti pakkida (Wilson ja Nierhaus, 2005). Lisaks sellele on jätkete koostises palju aluselisi aminohappeid, mis võimaldab neil interakteeruda rRNA-ga (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Märkimisväärne osa ribosomaalsete valkude geenidest on koondunud transkriptsioonilistesse üksustesse ehk operonidesse, millest suuremad on L11, β , *str*, S10, *spc* ja α operon (Watson *et al.*, 2004; Mattheakis ja Nomura, 1988). Üldjuhul on paljude *E.coli* r-valkude süntees stöhhiomeetrilises tasakaalus ning otseselt reguleeritud ribosoomide biogeneesi protsessi poolt (Mattheakis ja Nomura, 1988). Valdavalt on r-valkude süntees reguleeritud posttranskriptsioonilise tagasiside mehhanismi kaudu, sest igas operonis sisaldub ühe r-valgu geen, mille produkt on võimeline käituma translatsiooni regulaatorina (Mattheakis ja Nomura, 1988). Juhul kui r-valke sünteesitakse liias, on regulaatorina käituv r-valk võimeline seonduma oma polütsistronse mRNA-ga ning inhibeerima kõikide r-valkude translatsiooni, mis on kodeeritud selle mRNA poolt (Mattheakis ja Nomura, 1988).

Mitte kõik r-valgud ei ole olulised küpse ribosoomi normaalseks funktsioneerimiseks. On näidatud, et valgud S6, S9, S13, S17, S20, L1, L9, L11, L15, L19, L24, L27–31, L33 ja L36 ei ole translatsiooni funktsiooniks hädavajalikud, kuna vastavad *E. coli* deletsioonitüved on eluvõimelised (Baba *et al.*, 2006; Wilson ja Nierhaus, 2005). Vaatamata sellele, et paljude valkude funktsioon pole välja selgitatud, on olemas palju ribosomaalseid valke, mille funktsioon on teada. Näiteks valgud S3, S4 ja S5 moodustavad mRNA sisenemiseks poori ja arvatavasti omandavad helikaasset aktiivsust, et lahti keerata mRNA sekundaarstruktuure (Wilson ja Nierhaus, 2005). Suure alamühiku valgud L1 ja L16/L27 võivad moduleerida tRNA seondumist ribosoomile (Wilson ja Nierhaus, 2005).

1.5 Ribosomaalsete valkude heterogeensus

Levinud arusaama kohaselt on prokarüootse ribosoomi r-valguline koostis stabiilne, sõltumata rakkude kasvukeskkonnast (Robertson *et al.*, 1977). Samas, uuringud näitasid juba 1970-ndatel, et ribosoomide r-valkude koostis võib stöhhiomeetriliselt erineda (Robertson *et al.*, 1977). Nähtust, kus rakus esinevad struktuurselt erinevad ribosoomide alampopulatsioonid, nimetatakse ribosoomide heterogeensusseks (Ramagopal, 1992). Ribosoomide heterogeensus on näidatud nii rRNA kui r-valkude tasemel (Byrgazov *et al.*, 2013), kusjuures r-valkude puhul avaldub see stöhhiomeetriliste erinevuste, post-translatsiooniliste modifikatsioonide ja geeniduplikatsioonide (paraloogide) kaudu (Nesterchuk *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2001). Lähtuvalt käesoleva töö fookusest L36 paraloogidele leiab pikemat käsitlust just paraloogide teema.

Üks võimalus ribosomaalse heterogeensusse tekitamiseks on r-valkude geeniduplikatsioon. Täielikult sekveneeritud bakterigenoomide analüüs näitas, et nelja r-valgu (L31, L33, L36, S14) geeniduplikatsioonid on toimunud mitme bakteriliigi (sh *E. coli*) genoomis ja kuue r-valgu geenid (L11, L28, L7/L12, S1, S15, S18) on duplitseerinud ühes genoomis (Makarova *et al.*, 2001). Tüüpiliselt sisaldab paraloogide paaris üks valk kaht paari konserveerunud tsüteiini jääkidega motiivi (CxxC), mis võimaldab siduda metallioone, kusjuures üks tsüsteiini jääkidest võib olla asendatud histidiiniga. Teisel r-valgu paraloogil puudub CxxC-motiiv, mille tõttu nad ei saa siduda metallioone (Makarova *et al.*, 2001).

Bioinformaatilised uuringud on näidanud, et r-valkude L31, L33, L36, S14 üks paraloogne geen asub ZUR repressori kontrolli all (Panina *et al.*, 2003). ZUR, mis kasutab kofaktorina Zn^{2+} , osaleb tsingi metabolismi regulatsioonis, represserides tsingi transportvalke tsinkiooni üle hulga

puhul (Patzner ja Hantke, 2000). Tsingidefitsiidi korral derepresseeritakse need r-valkude paraloogide geenid, mille produktid ei vaja funktsioneerimiseks Zn^{2+} (Hemm *et al.*, 2010). Panina ja kolleegid (2003) spekulatsioonid, et kui seda r-valku lülitada ribosoomi koosseisu, siis vabastatakse selle tsinki siduv paraloog, mille lagundamisel võiks vabaneda tsinkioon. Autorid püstitasid hüpoteesi, et niisuguse tsingist sõltuva regulatsiooni süsteemi rakendamine võimaldaks välistada tsingi puudust teistel olulistel valkudel nagu DNA polümeraas ja primaas (Panina *et al.*, 2003). Kuna ribosoomide, sellega ka r-valkude hulk on mitu korda suurem kui eelpoolnimetatud valkude oma, siis Zn^{2+} -defitsiidi keskkonnas võimaldaks Zn^{2+} -sõltuvate paraloogide asendamine Zn^{2+} -sõltumatutega taastada teistes olulistest valkude tsingi taset (Panina *et al.*, 2003).

1.6 Ribosomaalne valk L36

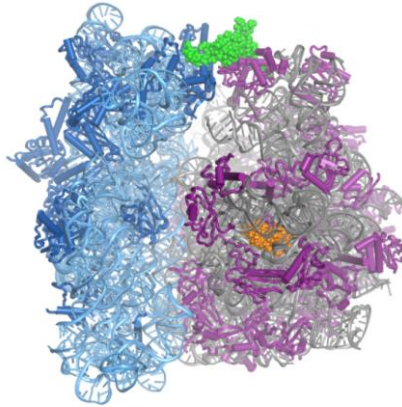
L36A on kõrgelt konserveerunud tsinki siduv bakteriaalne valk, mida võib leida kõikides eubakterite harudes ning ka mitokondri ja kloroplastide ribosoomide (Cummings *et al.*, 2002). Tegemist on kõige väiksema ribosomaalse valguga (4400 Da), võrdluseks: suurim r-valk on S1 (61 200 Da) (Makarova *et al.*, 2001; Stelzl *et al.*, 2001).

E. coli L36A geen asub *spc* operonis, mis kodeerib 11 ribosomaalset valku (L14, L24, L5, S14, S8, L6, L18, S5, L30, L15 ja L36) ning membraaniseoselist valku SecY (Mattheakis ja Nomura, 1988). Operoni ekspressiooni reguleerib valk S8 (Dean *et al.*, 1981; Yates *et al.*, 1980). S8 on võimeline seonduma kolmanda tsistroni (L5) translatsiooni initsatsiooni piirkonnaga ning seega inhibeerima kõikide distaalselt kodeeritud r-valkude geenide translatsiooni (Mattheakis ja Nomura, 1988).

L36A on 38 aminohappe pikkune ja tugevalt aluseline (ligi 30% on lüsiini ja arginiini) valk (Maeder ja Draper, 2005). Vastavalt bioinformaatilistele ennusustele sisaldab L36A CxxC motiivi, mille *Thermus thermophilus*'es loovad Cys11, Cys14, Cys27 tiolrühma väävliaatomid ja His32 δ1 lämmastik (Härd *et al.*, 2000).

Ribosoomis paikneb L36 rRNA-st moodustunud „taskus“ (joonis 3A), olles ümbritsetud ümbritsetud mitmest 23S rRNA konserveerunud ning funktsionaalselt olulisest regioonist (Maeder ja Draper, 2005). L36A vahetus läheduses paikneb peptidültransferaasne tsepter (heeliks 89 ja 91), L10–11 sidumisdomeenid (domeen II) ja domäänis VI asetsev sartsiin-ritsiin-ling (heeliks 95) (Maeder ja Draper, 2005). L36A valgu struktuur ning aluselised laengud

viisid oletusele, et see võib stabiliseerida rRNA tertsiaalstruktuuri selles piirkonnas (Maeder ja Draper, 2005).



Joonis 3. L36 asukoht *E. coli* 70S ribosoomis. R-valkude paralooide asukohad *E. coli* 70S ribosoomis (kõlgvaade): L36B (oranž) asub 50S subühiku sees, L31B (roheline) osaleb subühikute vahelistes kontaktides (avaldamata andmed Pulk, 2014)

Eksperimentaalselt on näidatud, et L36A puudumisel väheneb *E. coli* kasvukiirus ligikaudu 40%, mis viitaks sellele, et L36A on vajalik raku normaalse kasvufenotüübi saavutamiseks (Maeder ja Draper, 2005). Lisaks sellele on näidatud, et valguga puudumine mõjutab olulisel määral rRNA ruumilist struktuuri ligikaudu 60 Å ulatuses ribosoomi pinnalt peptidüültransferaase tsentri suunas (Maeder ja Draper, 2005). Hüpoteesi kohaselt mõjutab L36 ribosoomi ruumilist struktuuri, interakteerudes lokaalselt 23S rRNA heeliksiitega 95–91, 42–97, 90–91–92–72 (Maeder ja Draper, 2005). Heeliksil 42 asub valgu L10 seondumispõirkond, mis on otseselt seotud L11 valguga sidumispõirkonnaga ning mis omakorda interakteerub elongatsioonifaktoritega (Valle *et al.*, 2003; Moazed *et al.*, 1988). Biokeemilised ja krüoelektronmikroskoopia uuringud näitasid, et L36 puudumine mõjutab otseselt sartsiiin-riitsiin lügu (heeliks 95) ruumilist struktuuri, mis omakorda võiks mõjutada elongatsioonifaktorite seondumist ribosoomile ja alandada valgusünteesi kiirust (Maeder ja Draper, 2005).

Vaatamata sellele, et valk on väga konserveerunud bakterite hulgas, puudub L36 arhedel ja eukarüootidel (Cummings *et al.*, 2002). Oletatakse, et RNA järjestuses on toimunud muutusi, mis võivad kompenseerida nimetatud r-valgu puudust ja sellega takistada vale rRNA

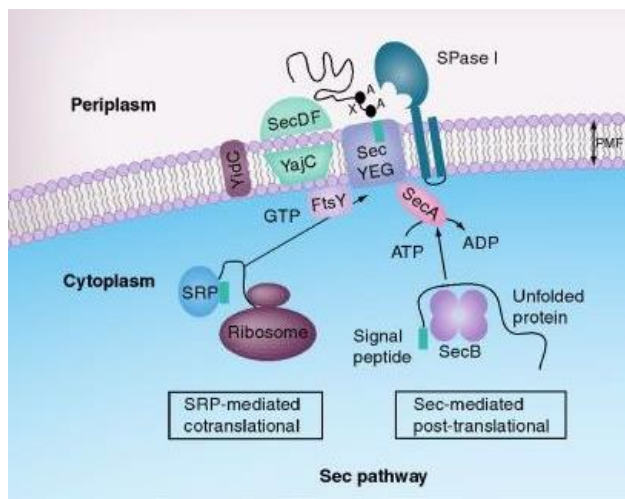
konfirmatsiooni teket (Maeder ja Draper, 2005). Samas võivad L36A puudumist neis organismides kompenseerida arhebakteritele ja eukarüootide ribosoomidele spetsiifilised ribosoomi valgud, mida *E. coli* ribosoomis ei ole (Maeder ja Draper, 2005).

L36B (5,467 Da) valku kodeerib *ykgO* geen, mis asub *ykgMO* operonis, mis asub ZUR repressori kontrolli all (Hemm *et al.*, 2008; Hemm *et al.*, 2010). Geenijärjestuse põhjal on ennustatud, et erinevalt L36A-st sisaldab selle paraloog L36B tsinki siduvat CxxC motiivi (Makarova *et al.*, 2001). *ykgO* geeni produkt puudub kiiresti jagunevatel rakkudel, kus enamus r-valgude sünteesitase on kõrge (Hemm, 2008) ja vastupidi, L36B tase on kõrge statsionaarses faasis, kus enamus r-valkude sünteesi tase on langenud (Hemm, 2008). Proteoomikakatseted näitasid, et L36B kuulub r-valkude hulka (Tammsalu, 2012).

1.7 Sekretsiooni ehk Sec translokatsiooni süsteem

Geneetilise informatsiooni tõlgitakse bakteritel tsütosoolis ribosoomide poolt, samas vähemalt 10% bakterivalkudest peavad läbima rakumembraani enne, kui nad jõuavad oma sihtmärgini (periplasmaatilised ja sekreteeritavad valgud) (Mori ja Ito, 2001). Seega, valgusüntees rakumembraanil ei ole mitte ainult huvitav biokeemiline reaktsioon, vaid ka lahutamatu osa raku füsioloogiast (Mori ja Ito, 2001). Üheks viisiks sekreteerida valke on Sec translokaas kompleks (Mori ja Ito, 2001).

Sec translokatsiooni süsteem on ainukene senini teada translokatsiooni süsteem, mis on väga konserveerunud ja funktsioneerib bakterite rakumembraanis, eukarüootide kloroplastide tülakoidmembraanidel ja endoplasmaatilises retikulumis (Albers *et al.*, 2006). See koosneb rajast, mille abil suunatakse valk translokaasi juurde, ja mitmesubühikulisest translokatsioonikompleksist, mille kaudu liiguvad lahti volditud valgud läbi membraani välja või integreeruvad membraani (Mori ja Ito, 2001, Albers *et al.*, 2006). Sec süsteemi keskne osa on valkude transporti läbiviiv kanal. Bakterite puhul see on SecYEG, arhedel – SecYE β ja eukarüootidel – Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (Albers *et al.*, 2006).



Joonis 4. Sec translokatsiooni süsteemi masinavärk. SecB – seotud valgu ekspordiga (tšaperon); SecA – ATPaas, mis juhib valgu liikumist mööda rakumembraani; SecY, SecE, SecG (SecYEG) – transmembraanne heterotrimeerne kompleks, mis moodustab kanali; Sec D ja SecF – vajalikud edukaks translokatsiooniks *in vivo*, YidC – osaleb valkude integreerimisel rakumembraani; SRP ja FtsY – valgud, mis on vajalikud kotransiooniliseks translokatsiooniks (Rao CV ja Anné, 2011).

Sec translokatsiooni süsteem (joonis 4) koosneb valkude transpordikanalist, mis koosneb kolmest valgust (SecY, SecE, SecG), moodustades Sec translokaasi. Transpordikanaliga on perifeerselt assotsieerunud ATP-d siduv SecA valk. SecD, SecF ja YajC moodustavad translookoniga assotsieerunud kompleksi. YidC osaleb valkude integreerimisel rakumembraani (Rao CV ja Anné, 2011).

Sec translokatsiooni süsteemis toimub voltumata valgu transport kas post-translatsiooniliselt või kotranslatsiooniliselt. Esimese translokatsioonitüübi puhul toimub lõplikult sünteesitud valgu juhendamine Sec translokaasi juurde SecB tšaperoni poolt. Kotranslatsioonilises transpordis toimub SRP (ingl. k. *signal recognition particle*) seondumine sünteesiva valgu signaal järjestusega ja kogu kompleks (SRP/ribosoom/uus peptiid) ühineb Sec translokaasiga tänu SRP retseptorile (kas SR või FtsY). SecA võtab vastu lahtivolditud valgu ja liigub neid ATP abil mööda SecYEG kanali. (Rao CV ja Anné, 2011)

SecY/ PrIA on esimesena identifitseeritud integraalne translokatsioonifaktor prokarüootide ja eukarüootide hulgas (Ito *et al.* 1983; Emr *et al.* 1981; Ito, 1992). *E.coli* SecY omab 10 transmembraanset segmenti, 6 tsütplasmilist domeeni ja 5 periplasmaatilist piirkonda (Ito, 1992).

Eeldatav SecY rakuline kontsentratsioon on 300 molekuli raku kohta ning tema molekulaarmass on 49 kDa (Ito, 1992; Ueguchi *et al.*, 1989). *E. colis* on SecY kasvuks oluline, kuna Ikegami ja kolleegide uurimistööst (2005) selgus, et selle geeni ekspressiooni vähenemisel langeb raku kasvukiirus järsult.

secY ja temast pärisuunaline järjestus *rpmJ*, mis kodeerib valgu L36A, asuvad *spc* operoni promootorist distaalselt (Ikegami *et al.*, 2005). *In vivo* eksperimenid näitasid, et kui *spc* operon on häiritud *secY* ja *rpmJ* vahel, siis väheneb SecY mRNA kogus raku tunduvalt (Ikegami *et al.*, 2005). Selle põhjuseks on tõenäoliselt transkriptsiooni enneaegne katkestamine, mis tekitab suuremas koguses väiksema pikkusega mRNA-d (Ueguchi *et al.*, 1989; Ikegami *et al.*, 2005). Nendes tüvedes on tuvastatud madalam Sec valkude (SecY, SecE, SecG) tase rakumembraanis, samas kui SecA valgu tase oli normaalsest oluliselt kõrgem (Ikegami *et al.*, 2005). See on kooskõlas nähtusega, kui SecA tase tõuseb translokatsiooni defektsuse puhul (Murakami *et al.*, 2004; Bieker *et al.*, 1990). Uurijad arvavad, et just SecY valgu koopiaarvu vähendamine põhjustab temperatuuritundlikkust ja filamentatsiooni (Ikegami *et al.*, 2005). See viis hüpoteesini, et SecY mRNA tase vähenemine põhjustab SecY valgu taseme langust, mis omakorda põhjustab teiste Sec valkude taseme langust (Ikegami *et al.*, 2005).

Ikegamei ja kolleegide uurimis tulemused näitasid, et $\Delta rpmJ$ tüvedel on valkude sünteesi tase samasugune kui metsiktüübil (Ikegami *et al.*, 2005). See viis järelduseni, et L36A ei mõjuta ribosoomi terviklikkust ega translatsiooni, kuigi ta on väga levinud prokarüootide hulgas (Ikegami *et al.*, 2005). Samas, C. Maederi ja D. E. Draperi uurimistöö tulemused (2005) on näidanud, et L36A eemaldamine ribosoomist põhjustab 23S rRNA väga olulise regiooni struktuurihäired. Seega ei ole selge, kuidas L36A puudumine võib mõjutada ribosoomi funktsionaalsust (Maeder ja Draper, 2005). Käesoleva töö raames prooviti selgeks teha, kuidas L36 puudus mõjutab translatsiooni efektiivsust ja rakkude kasvukiirust ning kas L36 paraloogid võivad kompenseerida teineteist, mis võiks kaudselt viidata L36 valgu rollile.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärk on panustada *E. coli* ribosomaalse r-valgu L36 paraloogide funktsioonide uurimisse. Lähtuvalt geeniduplikatsioonide esinemisest ribosomaalsetel valkudel on töö eesmärgiks selgitada erinevate L36 paraloogide rolli valgusünteesil *in vivo* ja *in vitro*.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on vastata järgmistele küsimustele:

1. Milline on L36 paraloogide geenideletsioonide mõju rakkude kasvufenotüübile,
2. Kuidas mõjutavad L36A ja L36B 70S ribosoomide moodustamist *in vivo*,
3. Kas L36 paraloogid mõjutavad ribosoomide translatsioonivõimet.

2. Materjal ja metoodika

2.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Bakalaureuse töö eksperimentaalses osas kasutatud *E. coli* tüved on toodud tabelis 1 ja oligonukleotiidid tabelis 2.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
MG1655	<i>F' lambda⁻ ilvG⁻ rfb⁻ 50 rph-1</i>	Balattner et al., 1997
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> ehk $\Delta 36A$	Keio kollektsoonist pärit <i>ΔrpmJ::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655	Kai Virumäe
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> ehk $\Delta 36B$	Keio kollektsoonist pärit <i>ΔykgO::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655	Kai Virumäe
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> ehk $\Delta 36AB$	<i>ΔrpmJ::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655 <i>ΔykgO::kan</i>	Aivar Liiv
MG1655 + pBT3	pBT transformatsiooni teel viidud MG1655 - kontroll	Käesolev töö
MG1655 + pBT- <i>secY</i> ehk MG1655 + pSecY	pBT- <i>secY</i> transformatsiooni teel viidud MG1655 – SecY üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 + pBT- <i>secY-rpmJ</i> ehk MG1655+pSecY/A	pBT- <i>secY-rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud MG1655 – SecY/L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 + pBT- <i>rpmJ</i> ehk MG1655 + pA	pBT- <i>rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud MG1655 – L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 + pBT3- <i>ykgO</i> ehk MG1655 + pB	pBT3- <i>ykgO</i> transformatsiooni teel viidud MG1655 – L36B üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBT ehk del36Ab+pBT3	pBT transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> - kontroll	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBT- <i>secY</i> ehk del36AB + pSecY	pBT- <i>secY</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBT- <i>secY-rpmJ</i> ehk del36AB+pSecY/A	pBT- <i>secY-rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY/L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBT- <i>rpmJ</i> ehk del36AB+pA	pBT- <i>rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36A üleekspressioon	Käesolev töö

MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBT- <i>ykgO</i> ehk del36AB+pB	pBT- <i>ykgO</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36B üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> + pBT ehk del36A + pBT3	pBT3 transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – kontroll	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> + pBT- <i>secY</i> ehk del36A + pSecY	pBT- <i>secY</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> + pBT- <i>secY-rpmJ</i> ehk del36A + pSecY/A	pBT- <i>secY-rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY/L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> + pBT- <i>rpmJ</i> ehk del36A + pA	pBT- <i>rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJ::kan</i> + pBT- <i>ykgO</i> ehk del36A + pB	pBT- <i>ykgO</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36B üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> + pBT ehk del36B + pBT3	pBT transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> - kontroll	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> + pBT- <i>secY</i> ehk del36B + pSecY	pBT- <i>secY</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> + pBT- <i>secY-rpmJ</i> ehk del36B + pSecY/A	pBT- <i>secY-rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY/L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> + pBT- <i>rpmJ</i> ehk Δdel36B + pA	pBT- <i>rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36A üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔykgO::kan</i> + pBT- <i>ykgO</i> ehk del36B + pB	pBT- <i>ykgO</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – L36B üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBAD- <i>secY</i> ehk Δ36AB + pBAD-SecY	pBAD- <i>secY</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY üleekspressioon	Käesolev töö
MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> + pBAD- <i>secY-rpmJ</i> ehk Δ36AB + pBAD-SecY-L36A	pBAD- <i>secY-rpmJ</i> transformatsiooni teel viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmJΔykgO::kan</i> – SecY/L36A üleekspressioon	Käesolev töö
TOP10	<i>F⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara⁻leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG></i>	Life Technologies
Plasmiidid	Iseloomustus	Viide allikale
pBADMycHisC	Arabinoosiga reguleeritav retsipientplasmiid L36A, L36B ja SecY	<i>Invitrogen</i>

	üleekspressioonivektorite tegemiseks	
pBAD- <i>rpmJ</i>	Plasmiidil pBADMycHisC põhinev L36A üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv
pBAD- <i>secY</i>	Plasmiidil pBADMycHisC põhinev SecY üleekspressiooniplasmiid	Käesolev töö
pBAD- <i>secY-rpmJ</i>	Plasmiidil pBAD põhinev SecY üleekspressiooniplasmiid	Käesolev töö
pBT	Retseptientplasmiid L36A, L36B ja SecY üleekspressiooni vektorite tegemiseks	Aivar Liiv
pBT- <i>secY</i>	Plasmiidil pBT põhinev SecY üleekspressiooniplasmiid	Käesolev töö
pBT- <i>rpmJ</i>	plasmiidil pBT põhinev L36A üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv
pBT- <i>secY-rpmJ</i>	plasmiidil pBT põhinev SecY/L36A üleekspressiooniplasmiid	Käesolev töö
pBT- <i>ykgO</i>	plasmiidil pBT põhinev L36B üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Oligi nimi	järjestus	
L36A REV BglII	aggcgagatcttcagccttggcgctgtttatg	Geeni kloneerimise oligo
SecY DIR Esp3I	cgccatcgtctccc atggctaaacaaccgggattag	Geeni kloneerimise oligo
SecY REV BglII	cgcctagatct ttatcgccgtagcctttcagg	Geeni kloneerimise oligo
pBAD-R	gatacagattaaatc	pBAD plasmiidi kontrollimise oligo
pBAD-L	ctactgtttctccatacccg	pBAD plasmiidi kontrollimise oligo

2.2 Söötmed

LB (Luria broth) – 1% trüptooni, 0,5% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl, 1,5% agarit (Bertani, 1951) kasutati *E. coli* tüvede kasvatamisel säilituskultuurist.

2xYT (*Yeast Extract Tryptone*) söödet – 1,6% trüptooni, 0,5% NaCl, 1% pärmiekstrakti (Sambrook ja Russel, 2001) – kasutati ribosoomi eraldamiseks kasvukõverate mõõtmisel .

Söötmele lisati vastavalt bakteritüve resistentsusele kanamütsiini (Km, lõppkontsentratsioon – 50 µg/ml) ja sõltuvalt plasmiidi olemasolust ampitsilliini (Amp, lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml)

2.3 Generatsiooniaja määramine

Kaks kolooniat inokuleeriti vastavalt bakteritüve antibiootikumresistentsusele vedelsöötmesse 2xYT+AMP (100 µg/ml) ruumalaga 2 ml ja kasvatati öö läbi loksutil. (180 rpm, 37°C INFORS HT Multitron). Üleöö kultuurist valmistati 100-kordne lahjendus samasse vedelsöötmesse ruumalaga 1 ml, millest omakorda tehti 20kordne lahjendust 2xYT söötmesse. Mõlema lahjenduse puhul sööde sisaldas ampitsilliini (100µg/ml). Igast 20-kordsest lahjendusest pipeteeriti kolme mikrotiiterplaadi kannu 100 µl ja inkubeeriti 18 tundi 37°C juures mikrotiiterplaadilugejas (BMG POLARstar Omega), mis mõõtis iga 7 minuti järel bakterikultuuri optilist tihedust A_{600} juures. Generatsiooniaja määramisel lahutati mõõtmistulemusest foon (ilma bakteriteta söötme mõõtmistulemuste keskmine), OD 600 näitajad logaritmiti alusel 2 ja saadud graafikute lineaarse osa tõusu (funktsioon *slope*) pöördväärtuse alusel arvutati pooldumisaeg minutites vastavalt valemile $(1/slope)*60$.

2.4 Üleekspressiooni plasmiidide ja kompensatsioonitüvede konstrueerimine

Plasmidi kättesaamine ja puhastamine. pBADMycHisC plasmiidne DNA eraldati vastavalt *Invisorb Plasmid Midi kit* protokollile ja sellele kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* spektrofotomeetriga. Eraldatud plasmiidide identsust kontrolliti restriksiooniensüümiga *AvaI* abil. Reaktsioonisegu (15 µl) sisaldas 1mg DNA-d, 1x ensüümipuhvri Tango Y (Yellow), 0,5U *AvaI*. Reaktsioonisegu inkubeeriti ~1 h 37°C juures ja restriksioonil tekkinud DNA fragmente analüüsiti analüüsiti 1% agarosgeelil 1xTBE puhvis (90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA)

***E. coli* geenide *secY*, *secY/rpmJ* amplifikatsioon.** *E. coli* tüve MG1655 tüve genoomse DNA pealt amplifitseeriti PCR-ga *secY* ja *secY/rpmJ* geenid kasutades tabelis 1 kirjeldatud oligonukleotiide. PCR reaktsiooni segu (75 mkr) viidi puhvis Y (75 mM Tris pH8.8; 20 mM NH₂SO₄; 0,01% tritonX 100; 0,5% ficoll 400; 1mM tartazine), mis sisaldas 0,2 mM igat desoksünukleotiidi, 100 ng kromosomaalset DNA-d, 0,75 mM oligonukleotiide ja 1U Pfu DNA polümeraasi (J. Sedmani kingitus). PCR teostati termotsükleris (UNO II Biomtera) käivitati järgmist programmi:

1. 94C – 3 min
- 32X { 2. 93C – 30 s
3. 56C – 40 s
4. 72C – 7 min

5. 72C – 7 min

PCR produktide eraldamine ja ekspressioonikonstruktide konstrueerimine. PCR

reaktsiooniproduktid lahutati 1% agarosgeelelektroforeesil (Metaphor) 1xTBE puhvril ja fragmendid eraldati geelist vastavalt *ThermoScientific GeneJET Gel Extraction Kit*'i juhendile. PCR produktide kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetri abil.

Puhastatud PCRi produkte ja plasmidi pBADMycHisC töödeldi BglII ja Esp3I või NcoI/BglII restriksiooni ensüümidega vastavalt tootjapoolsele protokollile. Kuna kasutati restriktase, mille optimaalsed reaktsioonitingimused on erinevad, siis viidi restriksiooni läbi kahe etapina. DNA vahepuhastamiseks kasutati DNA ekstraheerimise komplekti. Mõlema ensüümiga lõigatud DNA fragmendid eraldati 1% agarosgeelelektroforeesil 1xTBE puhvril. DNA puhastati geelist. DNA puhastati geelist *ThermoScientific GeneJET Gel Extraction Kit*'i abil ja mõõdeti kontsentratsioon. DNA ligatsioon viidi läbi vastavalt tootjapoolse protokolliga järgi.

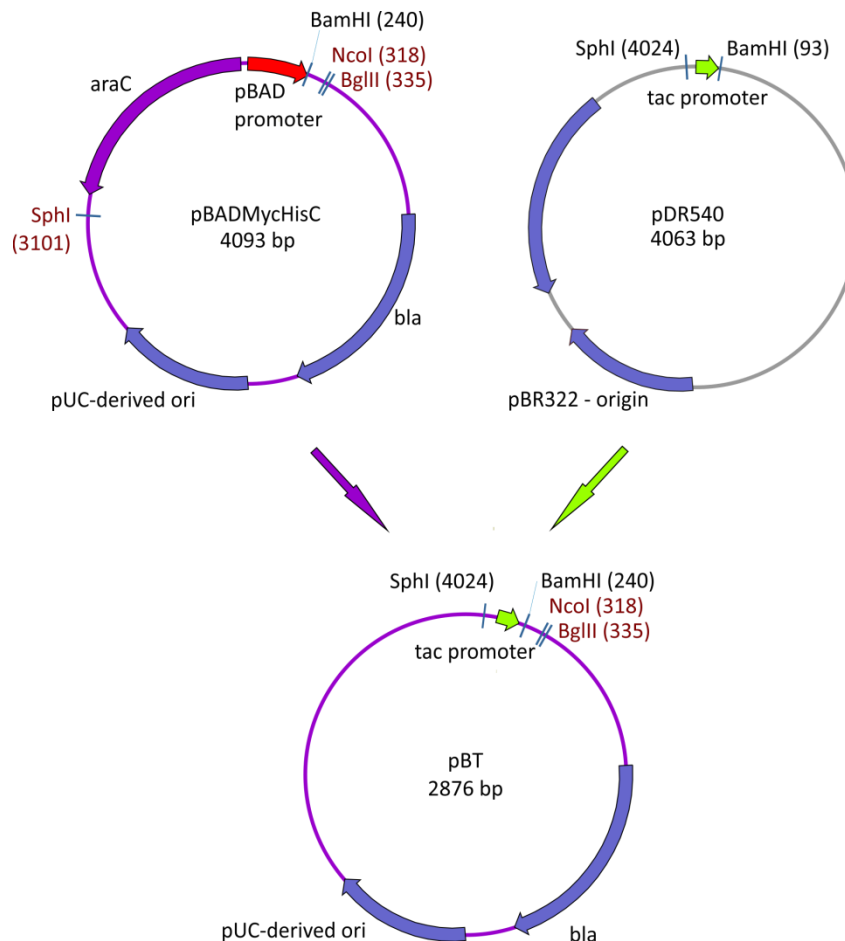
Transformatsioon. *E. coli* TOP 10 rakud segati jääl kokku 5 µl kas vastavalt pBAD-*secY* või pBAD-*secY-rpmJ* ligatsiooniseguga ja inkubeeriti 30 minutit millele järgnes kuumašokk (1,5 min; 42°C). Rakke hoiti jääl 5 minutit ning tehti väljakülv LB+Amp (200 µg/ml) tarsöötmele, mida inkubeeriti üle öö (37°C).

Koloonia PCR. Ligatsiooni efektiivsust kontrolliti esmalt koloonia PCR-iga. Tassidelt valiti 2 eristunud kolooniat, mille rakud pandi koos 10 µg MQ-ga 10 minutiks termotsüklerisse (95°C). Lüüsunud rakkude lisati 15 µl reaktsioonisegu: (750 mM Tris (pH=8,8), 200 mM NH₂SO₄, 0,1% TX-100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin), 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 10 pmol mõlemat oligonukleotiidi (pBAD-R ja pBAD-L), 0,5 µl 10 mM dNTP-d ja 5U Taq DNA polümeraasi. PCR teostati termotsükleris (UNO II Biomtera) vastavalt järgmisele programmile:

1. 95C – 10 min
- 32X { 2. 93C – 40 s
3. 55C – 40 s
4. 72C – 2 min 20 sek
5. 72C – 7 min

PCR produktide vastavust meie geenile kontrolliti elektroforeesiga 1% agarosgeelis 1xTBE puhvril.

Kloneerimise tulemusena saadi pBADMycHisC baasil põhinevad esmased ekspressioonikonstruktid pBAD-SecY; pBAD-SecY-L36A (tabel 1). Antud plasmide modifitseeriti ning töös kirjeldatud katsete puhul kasutati edaspidi pBADMycHisC-l baseeruvat hübriidkonstrukti pBT variante (vt. tabel 1) milliste arabiinooosi promootorala ja *araC* geen (SphI-BamHI fragment) oli asendatud sünteetilise *tac* promootoriga (hübriidkonstruktid konstrueeriti A. Liivi poolt; joonis 5).



Joonis 5. pBT ekspressiooniplasmiidi plasmiidi konstrueerimise skeem. Plasmiidis pBADMycHisC asendati SphI-BamHI promootor-regulaatorala *tac* promootorit sisaldav ala plasmiidist pDR540. Töös kasutatud ekspressioonikonstruktid konstrueerimisel viidi meid huvitav geen NcoI-BglII pBT plasmiidi restriksioonisaitide vahele.

2.5 Ribosoomide preparatiivne eraldamine

Rakkude kasvatamine ja 70S ribosoomide eraldamine. Tüved külvati esmalt LB tardsöötmele, millele oli lisatud deletsioonitüve puhul kanamütsiini (lõppkontsentratsiooniga 50 mkr/mg/ml) ja pBT sisaldavete tüvede puhul ampitsilliini (200 mkr/mg/ml) ja inkubeeriti üleöö

kuumkapis. Üks koloonia inokuleeriti 20 ml 2xYT, kuhu d36AB puhul lisati kanamütsiin (50 µg/ml) ning del36AB+pA ja del36AB+pB ampitsilliini (100 µg/ml). Rakukultuuri kasvatati öö läbi loksutil (180 rpm, 37°C). Üleöökultuurist tehti lahjendus ($A_{600\text{nm}} \sim 0,05$) samasse vedelsöötmesse mahuga 1 l ja kasvatati kuni $A_{600\text{nm}} \sim 2,0$. Rakud koguti lauatsentrifuugis Hettich Rotina 420R (4500 rpm, 20min, 4 °C).

Esimeses etapis eraldati 70S (nn „*crude*“ 70S) ribosoomid, kasutades läbi 20% suhkrupadja (20 mM Tris (pH=7,5), 500 mM NH₄Cl, 10 mM MgOAc, 20% sahharoos, 6 mM β-merkaptopetaanol) tsentrifuugimist. Rakud resuspendeeriti 20 ml 1xOV-10 puhvris (OV-10: 20 mM Tris pH=7,5, 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgOAc, 6 mM β-merkaptopetaanol), millele lisati oli lisatud lütsotsüüm (lõppkontsentratsioon 1mg/ml) ja DNAas I (lõppkontsentratsioon 40U/ml). Pärast seda, kui rakud oli segatud 45 min rotaatoril, lüüsisiti rakus kõrgsurve homogenisaatoris STANSTED (10 ml silinder, 100 mPa) ning rakususpensioon klaariti ultratsentrifuugis (rootor Ti-45, 16 000 rpm, 30 min, 4°C). Klaaritud lüsaat kanti täismahuses 35 ml suhkrupadjale peale ning ultrasentrifuugiti rootoris Ti-45 ($\omega^2t = 8 \times 10^{11}$; 33 500 rpm, 18 h).

Läbi sahharoosipadja fraktsioneeritud ribosoomide sadet pesti 5 ml 1xOV-1 ribosoomide dissotsiatsioonipuhvriga (20mM Tris (pH=7,5), 100mM NH₄Cl, 1mM MgOAc, 6mM β-merkatoetnaool). Ribosoomid lahustati 10 ml 1xOV-1 ja segades rotaatoril 4h 4°C juures. Ribosoomide hulga määramiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus lainepikkusel $A_{260\text{nm}}$.

50S ja 30S subühikute dissotsiatsioon. Subühikute eraldamiseks kasutati 10–25% sahharoosi gradienti OV-1 puhvris. Ühele 10–25% gradiendile kanti ~150U ($A_{260\text{nm}}$) ribosoomide lahust ning ultrasentrifuugiti ($\omega^2t = 2,8 \times 10^{11}$; 21 000 rpm, 16 h, SW 28).

Subühikute fraktsioonid eraldati gradiendi profiili alusel. Fraktsioonid visulaiseeriti UVis 920 läbivooluspektrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$) ja REC112 isekirjutaja abil (GE Healthcare). Kogutud 50S ja 30S fraktsioonid kanti üle Ti-45 rootori tuubidesse ja viidi ruumala 65 ml-ni. 1M MgOAc lisamisega tõsteti magneesiumioonide kontsentratsioon 10 mM-le. Subühikute hulga määramiseks mõõdeti lahuste optiline tihedus 260 nm juures. Ribosoomid kontsentreeriti tsentrifuugimisega ($\omega^2t = 1,2 \times 10^{12}$; 3000 rpm, 4C). Subühikute sademeid pesti 2 ml 1xOV-10. Subühikute lahuseid klaariti lauatsentrifuugis (13 000 rpm, 20 min 4C) ja mõõdeti nende optiline tihedus A_{260} juures. 50S ja 30S jaotati laiali 100 µl suuruste alikvootidena ja kiirkülmutati vedela lämmastikuga. Ribosoomide säilitati -80C juures.

2.6 Ribosoomi profiili analüüs *in vivo*

Rakkude kasvatamine. Säilituskultuuridest tehti väljakülvid LB tardsöötmele, millele oli lisatud sõltuvalt tüvest vastavat antibiootikumi (lõppkontsentratsioonid amp 200 µg/ml või kan 25 µg/ml). Bakterikultuuri inkubeeriti 37°C juures üleöö. 25 ml 2xYT söödet inokuleeriti ühe kolooniagagi ning kasvatati üleöö loksutil (180 rpm, 37 °C). Üleöö kultuuriga inokuleeriti 250 ml värsket 2xYT söödet. 50 ml Proovid võeti mõõtmistulemuste järgi järgmistel rakukultuuri tihedustel: OD A₆₀₀ 1,0 (logaritmiline kasv) ja OD A₆₀₀ 3,0 (varajane statsionaarne faas). Statsionaarse faasi ajapunktide proovid koguti järgi 24h ja 48h möödumisel peale kasvatamise algust. Rakud siis koguti tsentrifuugimisega ROTINA 420R lauatsentrifuugis (4500 rpm, 20 min, 4°C)

E. coli rakumass suspendeeriti ribosoomi lüüsihuvris (50mM Tris (pH=7,5), 100mM NH₄Cl, 10mM MgOAc, 16% sahharoos, 6 mM β-merkaptotoetanool). Lahuse lõppruumala sõltus ajapunktist: OD 1,0 – 0,8 ml, OD 3,0 – 1,5 ml, 24h – 1,5 ml, 48h – 1,5 ml. Lüsaaat kanti 2 ml tuubidesse, kuhu oli lisatud 0,5 ml 0,1mm diameetriga klaaskuulikesi (Glass beads 0,1mm, Biospec Products) ning lisati lüsotsüüm ja DNAasi (lõppkontsentratsioonidega vastavalt 2 mg/ml ja 50 U/ml). Rakud lüüsi Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisaatoril 3x60s, 5-10°C. Rakulüsaaate tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 20 min 13 000 rpm, 4°C. Supernatanti kanti üle uude tuubi ning materjali optiline tihedust mõõdeti NanoDropi abil.

Ligikaudu 30U (A_{260nm}) rakulüsaaati kanti 15–30% sahharoosgradiendile OV-10 puhvris ning ultratsentrifuugiti ($\omega^2t = 2,7 \cdot 10^{11}$ rad²/s, sw 28 rootor; 4°C; Beckman L90K ultratsentrifuug). Fraktsioonid visulaiseeriti UVis 920 läbivooluspektrofotomeetri (A_{260nm}) ja REC112 isekirjutaja abil (GE Healthcare).

2.7 Peptidüültransferaase aktiivsuse (e. PTC) test

Ribosoomide võimet sünteesida peptiidsideid mõõdeti klassikalise puromütsiini mudelreaktsiooniga (Traut ja Monro, 1964). Nii puromütsiini katsed kui ka *in vitro* polü(U) katsed viidi läbi *high-fidelity polymix* puhvris (edaspidi 1xPM puhver) mis sisaldas järgmisi komponente: 20 mM Hepes pH7,6; 5 mM MgOAc; 5 mM NH₄Cl; 95 mM KCl; 8 mM putrescine; 1 mM spermiidiin, 1 mM DTT. Reaktsioonisegu (25 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 15 pmol 30S ja 10 pmol 50S subühikuid; 35 pmol [3H]NacPhe-tRNA^{Phe}, eriaktiivsusega 3300 dpm/pmol (lahustatud 1xpolümix ehk PM puhvris) ja 30 µg polü(U) mRNA analoogi (lahustatud 1xPM puhvris). Reaktsioonisegu eel inkubeeriti 15 min 37°C juures ning

alustati 20 mM puromütsiini lisamisega ja teostati 30 min 37°C juures. [3H]NAC-Phe-tRNA^{Phe} hüdrolüüsiti lisades segusse 3,8 µl 10 M KOH ja inkubeerides 42°C juures 20 min. Hüdrolüüsisegu neutraliseerimiseks lisati 200 µl HEPES pH=7,0. Reaktsiooniprodukt [H3]NAC-Phe-puromütsiin dipeptiidi analoog ekstraheeriti 1 ml etüülatsetaadiga intensiivselt segades. Etüülatsetaadi ja vee faas eraldati tsentrifuugimisega (13 000 rpm, 2 min, 4°C). Etüülatsetaadi faasist pipeteeriti 0,5 ml lahust radioaktiivsuse loendaja tuubi ja lisati 5 ml stsintsillatsiooni koteili ning loendati viimases sisalduv radioaktiivne [H3]NAC-Phe-puromütsiin kasutades radioaktiivsuse loenurit Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR. Kasutades eriaktiivsust arvutati aktiivsete ribosoomide osakaal tetaalsete ribosoomide populatsioonis.

2.8 *In vitro* translatsioonikatse

Polü(U) translatsiooni jaoks segati kokku kaks translatsiooni segu. Esimene (A) segu (25 µl), sisaldas: 10 pmol 50S (uuritavad ribosoomid), 15 pmol 30S (metsiktüüp) ja 30 µg polü(U) mRNA; 35 pmol [3H]NAC-Phe-tRNA^{Phe}, eriaktiivsusega 3300 dpm/pmol (lahustatud 1xPM puhvris). Teine (B) segu (75 µl), sisaldas: 3 mM ATP, 2 mM GTP, 8 mM fosfoenoolpüruvaat, 1mM dithioerütrool, 60 µg E. coli totaalne tRNA (lahustatud 1x PM puhvris), 1µg püruvaat kinaasi, 50 µM [C14]Phe (eriaktiivsusega 30-40 dpm/pmol), 2 µM EF-Tu, 0.4 µM EF-G ja 0.3 µM PheRS. A ja B segu inkubeeriti eraldi 15 min, 37 °C. Hoides mõlemat segu termostaadil (37 °C), segati kokku A ja B (ajapunkt 0 min). Proovid a 50 µl koguti ajapunktidel 15s, 30s, 60s, 2,5 min, 5 min, 10min ja 30 min. Reaktsioon peatati 2 ml 5% TCA lisamisega. Iga katseseeria reaktsioonisegust (100 µl) võeti lisaks 2 µl proov ning mõõdeti selles sisalduv radioaktiivsus, mida kasutati hiljem [C14]Phe eriaktiivsuse määramiseks. Reaktsioonisegu hüdrolüüsiti 20 min 95° C juures. Valgusade vaakumfiltreriti GFC filtrile ja pesti siis filter 5-10 ml 5 % TCA lahusega ning seejärel 3 ml 70 % etanooliga. Filtrid kuivatati termostaadis 65C juures misjärel lisati 5 ml stisinsillaatorit. Filtril olev radioaktiivsus loendati PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintsillatsiooni lugejaga abil.

Valgusünteesi protsessiivsuse määramisel kasutati polüpeptiidahelasse lülitunud Phe/NAC[3H]Phe moolide suhet. [14C]Phe eriaktiivsus arvutati individuaalselt igas katseseerias. Katsetulemuste analüüsil jagati mõõdetud [14C]Phe dpm väärtused arvutatud eriaktiivsusega mille kaudu määrati ahelasse lülitatud Phe hulk moolides. Sama meetodika abil määrati peptiidahelasse lülitunud NAC[3H]Phe kogus. Katsetulemused esitati Phe/NAC[3H]Phe (pmol) suhete ajasõltuvuse graafikuna.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Kasvufenotüübi analüüs

Antud katseseeriade eesmärgiks oli analüüsida L36 paraloogide deletsioonide mõju rakkude kasvufenotüübile. *E. coli* paraloogid *rpmJ* ja *ykgO*, mis kodeerivad vastavalt L36A ja L36B valku, kuuluvad mitte-essentsiaalsete geenide hulka (Baba et. al., 2006). Käesolevas töös kasutati J. Remme laboris eelnevalt konstrueeritud *E. coli* MG1655 tüvesid milles oli P1 transduktsiooni meetodil *rpmJ* ja *ykgO* geenid asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga (tabel 1; Materjalid ja meetodid). Lisaks analüüsiti ka *E. coli* tüve, milles olid deleteeritud mõlemad paraloogsed geenid. MG1655 deletsioonitüvede konstrueerimisel P1 transduktsiooni meetodiga kasutati doonortüvena Keio kollektiooni tüvesid JW3261 [*delrpmJ* (L36A)] ja JW5034 [*delykgO*(L36B)]. Keio kollektiooni kuuluvad ühe geeni deletsiooniga *E. coli* K-12 tüved, mida kokku on 3985 (Baba et. al., 2006). Antud tüvedes on vastav geen asendatud kanamütsiini resistentsust tagava geeniga ning nende tüvede elujõulisust on analüüsitud nii rikkal söötmel kui ka minimaalsöötmel (0,4% glükoos MOPS; Baba et al., 2006).

Kuna *rpmJ* ja *ykgO* deletsioonitüved ning *rpmJ/ykgO* topeldeletsioonitüvi on elujõulised tõstatus küsimus, kas erinevate paraloogide geenide ükshaaval või siis korraga deleteerimine mõjutab rakkude kasvufenotüüpi rikkas kasvukeskkonnas optimaalsel temperatuuril (37°C). On teada, et L36A geeni deletsioon suurendab olulisel määral rakkude generatsiooniaega (Ikegami et. al., 2005; Maeder ja Draper, 2005). Oluline on siinkohal fakt, et ajal kui vastavad uuringud tehti ei olnud *ykgO* geen veel identifitseeritud. L36B geen on kirjeldatud alles hiljuti ning see ekspresseerub koos L31B geeniga statsionaarses kasvufaasis Zn²⁺ limiteerivas kasvukeskkonnas (Hemm et al., 2008; Tammsalu, 2012). *rpmJ* on ribosoomi valkude *spc* operoni viimane geen millele eelneb mitteribosomaalse valguga SecY geen. *spc* operonile järgneb ribosoomi valkude α -operon. Väidetavalt toimub α -operoni transkriptsioon suures osas *spc* operoni promootorilt (Cerretti et. al., 1983). Kirjanduses seni avaldatud andmed L36 rolli kohta on paraku vastuolulised. Ikegami ja kolleegid (2005) katseandmed viitavad sellele, et *rpmJ* geeni deletsiooni efekt on kaudne ja ei ole otseselt seotud ribosoomi funktsioneerimisega ega valguga L36A. Seega kasvukiiruse aeglustumise peamiseks põhjuseks loeti *rpmJ* geeni deletsiooni mõju sellele eelneva secY geeni avaldumisele. Seega võiks olla oluline geenide vaheline intaktsus. Samas avaldasid Maeder and Draper (2005) töö milles avaldatud katseandmed viitavad otseselt sellele, et vajalik on eelkõige L36A (*rpmJ*) ning L36A ekspressioon *in trans* kompenseerib 85%

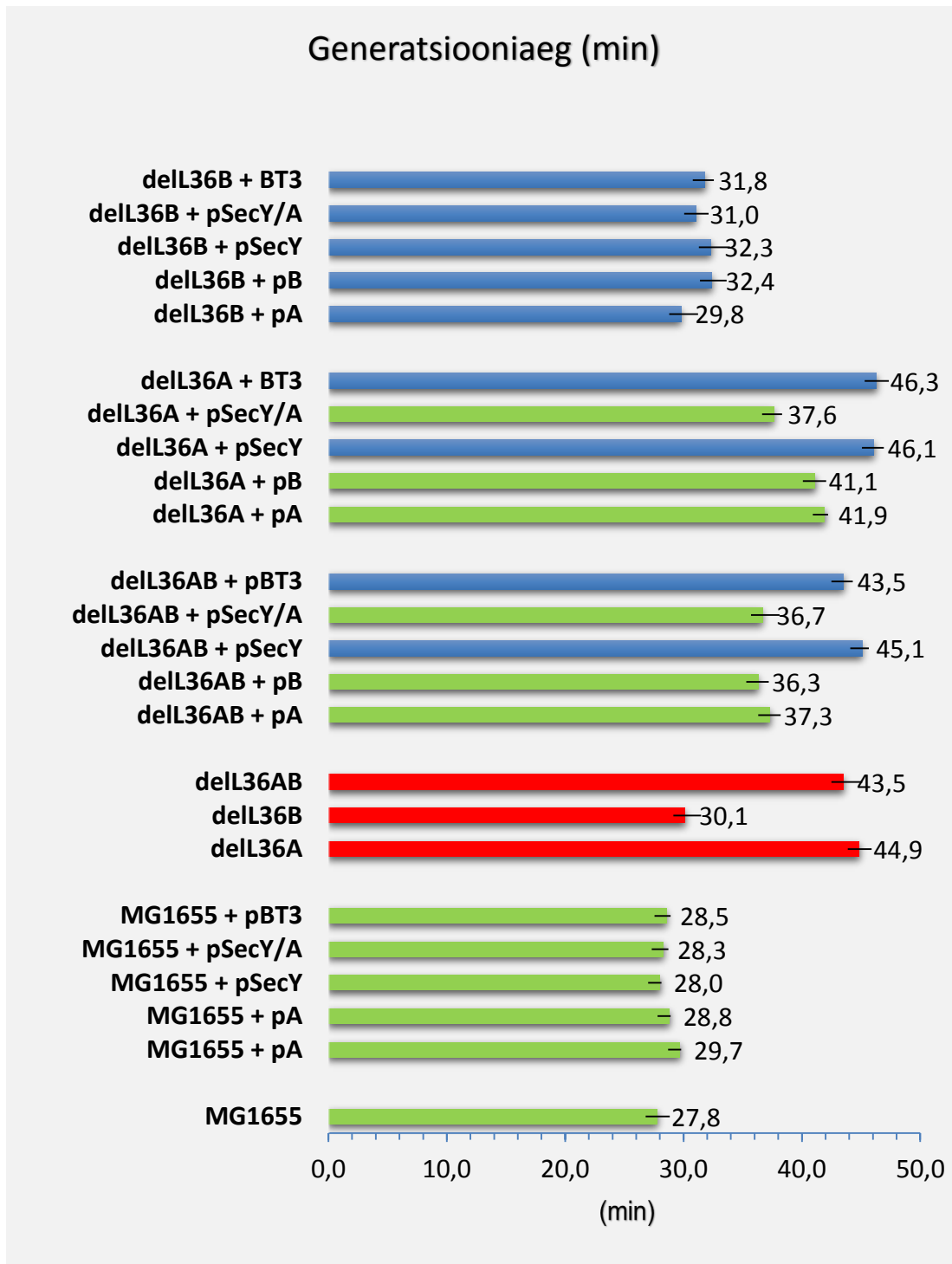
ulatuses defektse kasvufenotüübi. Kuna kompensatsioon ei olnud täielik siis ei saa välistada ka võimalust, et *rpmJ* deletsioon mõjutab teatud määral talle järgnevate geenide avaldumist (Maeder and Draper, 2005). *rpmJ* funktsioon ribosoomi kontekstis on hetkel käsitletud vaid struktuursest aspektist (Maeder ja Draper, 2005) ning hetkel puudub teave valgu rollist ribosoomi funktsioneerimisel ning L36A ja L36B paraloogide osast selles protsessis. Sellele küsimusele püüabki vastata käesolev uurimistöe.

Lähtuvalt vastuolulistest kirjanduse andmetest tõstavad järgmised küsimused: (1) milline on üksikute ja mõlema geeni üheaegse deletsiooni mõju rakkude kasvule; (2) kas *rpmJ* geeni deletsioonist tingitud kasvu aeglustumine on tingitud *secY* geeni ekspressioonist või pigem L36A olemasolust ribosoomis.

Vastamaks nendele küsimustele võrreldi esmalt geenide topelt ja üksikdeletsioonide mõju bakterikultuuri kasvukiirusele. Lisaks analüüsiti tüvesid kus vastavaid geenideletsioone püüti kompenseeritud plasmiidse geenikoopiaga (tabel 1, Materjal ja meetodika). Pilootkatsetes kasutati pBAD ekspressioonisüsteemil põhinevaid arabinoosiga indutseeritavaid konstrukte, mis hiljem vahetati välja Maeder and Draper, 2005 kasutatud konstitutiivse ekspressioonisüsteemi vastu. Käesolevas töös avaldatud katseandmete puhul kasutati ainult konstitutiivsel ekspressioonil põhinevaid ekspressiooniplasmiide (pBT derivaadid; konstrueeritud A. Liivi poolt, vt Materjal ja meetodika).

Rakkude kasvufenotüüpi analüüsiti soodsatel tingimustel (37°C) juures ja rikkal söötmel (2xYT). Üleöö kasvanud rakukultuurist tehti 2000 kordne lahjendus ning kasvu jälgiti mikrotiiterplaadi lugejas. Rakukultuuri optilist tihedust mõõdeti iga 7 minuti tagant mille põhjal koostati kasvukõverad ja arvutati generatsiooniaeg (ajavahemik mille vältel rakukultuuri tihedus kahekordistub; vt Materjalid ja meetodika). Kõikide tüvede puhul viidi läbi 3–5 sõltumatut mõõtmisseeriat kusjuures igas seerias monitooriti paralleelset omakorda vähemalt kahe sõltumatu kloni kasvu kolmes korduses.

Esimeses katseseerias vaadeldi L36 paraloogide puudumise mõju rakkude kasvule. Selleks mõõdeti metsiktüübi (MG1655), *rpmJ* ja *ykgO* üksik ja nende topeltdeletantide kasvufenotüüpi. Katsetulemused näitasid, et L36B geeni deleteerimine ei põhjusta muutusi rakkude kasvufenotüübis võrreldes metsiktüübi rakkudega (joonis 6). Samas delL36A ja del36AB tüve puhul pikeneb rakkude generatsiooni aeg mõlemal juhul ligikaudu 1,6 korda (joonis 6) mis on kooskõlas Maeder and Draper (2005) poolt avaldatud andmetega. Seega võib järeldada et intaktne L36A geen on vajalik rakkude normaalseks kasvuks.



Joonis 6. Deletsioonitüvede generatsiooniajad. Üleöökultuurist (2xYT, 37°C) tehti samasse söötmesse 2000 kordne lahendus. Rakke kasvatati 2xYT söötmes 17 tundi (37°C), bakterikultuuri optilist tihedust (A_{600nm}) mõõdeti iga 7 minuti järel. Generatsiooniaja määramisel lahutati mõõtmistulemusest foon (ilma bakteriteta söötme mõõtmistulemuste keskmine), OD 600 näitajad logaritmiti alusel 2 ja saadud graafikute lineaarse osa tõusu (*slope*) pöördväärtuse alusel arvutati pooldumisaeg minutites.

Kuna delL36A tüve kasvudefekt on kirjanduse andmetel seostatud ka temale eelneva *secY* geeni ekspressiooni defektidega (Ikegami *et. al.*, 2005), viidi järgnevalt läbi kompensatsioonikatseted. Kompensatsioonikatsetes kasutati ekspressiooniplasmiidi pBT derivaate mis kodeerisid järgmiseid geenivariante: L36A, L36B, SecY ja SecY/L36A (tabel 1; Materjal ja meetoodika). Kontrollplasmiidina kasutati kõikides katsetes tühja vektorit pBT3.

Kontrollseerias kontrolliti võimalikku valkude üleekspressiooni mõju metsiktüüpi kontekstis (MG1655 koos vastava plasmiidiga). Selgus et valkude SecY ja SecY/L36A üleekspressioon ei mõjuta kasvufenotüüpi meie katsesüsteemis. L36A ja L36B üleekspressiooni võimalik mõju rakkude kasvule oli eelnevalt kontrollitud eelkatsete käigus A. Liivi poolt. Kõikide vaadeldud kultuuride generatsiooniaeg jäi samaks võrreldes MG1655 kontrollkultuuriga (joonis 6). Seega võime järeldada et meie kasutatav olev ekspressioonisüsteem ei põhjusta kõrval efekte ja on sobilik edaspidisteks kompensatsioonikatseteks.

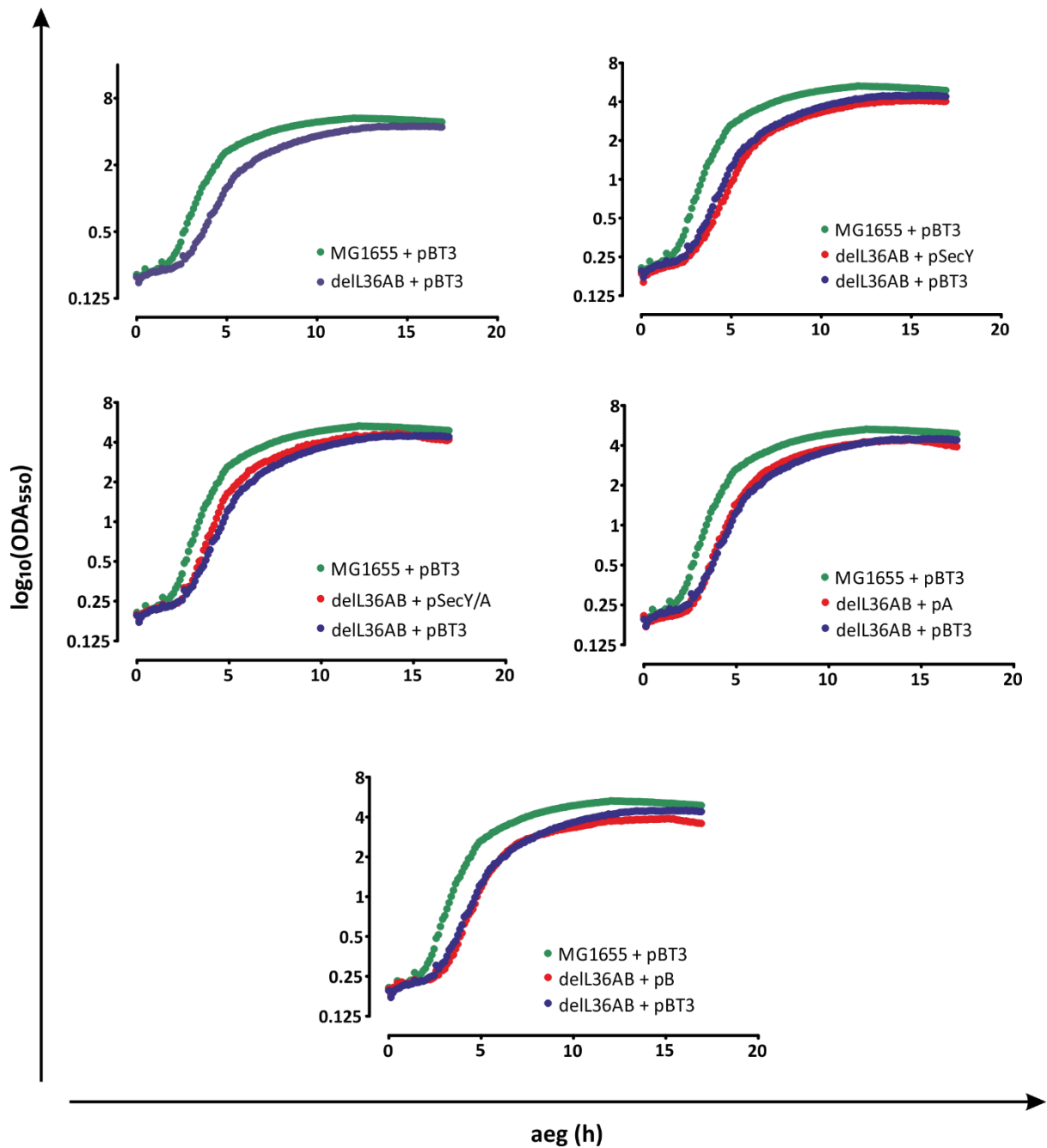
Edaspidised katseseeriad viidi läbi tingimustes, kus nii mõlema L36 paraloogi üksikdeletatsiooni kui ka topeltdeletatsiooni tüvedes ekspresseeriti *in trans* vastavalt L36A, L36B, SecY või SecY/36A valke plasmiidil pBT. Del36A tüve kasvudefekt kompenseeris SecY üleekspressioon koos L36A valguga mille puhul vähenes rakukultuuri generatsiooniaeg 45 minutilt 36 minutini. Teatav kasvukiiruse tõus oli detekteeritav ka juhul kui üleekspresseeriti kas L36A või L36B valku üksinda (joonis 6 ja 7). Samas ainult valgu SecY üleekspressioon kompenseerivat mõju ei omanud. Vaatamata sellele et tüve del36A + SecY/L36A (del36A + pSecYA) generatsiooniaeg vähenes jäi see siiski oluliselt suuremaks võrreldes MG1655 kontrollkultuuriga (joonis 6). Seega võib väita et del36A tüve kasvudefekt on osaliselt seotud valguga SecY. Kuna SecY üksinda kompensatoorset efekti ei omanud ning osaline kasvukiiruse tõus oli nähtav vaid SecY/L36A ja L36A plasmiidide korral võib väita et valk L36A on vajalik rakkude normaalseks kasvuks. Tüve delL36B puhul rakkude kasvukiirus olulisel määral ei muutunud (joonis 6 ja 7). Võiks eeldada et ühe L36 paraloogi puudumisel asendab seda teine ning ribosoomides on alati olemas kas L36A või L36B. Samas on teada et L36A ja L36B ekspresseerub erinevates kasvufaasides (vastavalt eksponentsiaalses ja stasionaarses kasvufaasis). Seega on meil nende tüvedes tegemist tõenäoliselt heterogeense ribosoomide populatsiooniga mis sisaldavad kas osaliselt või suures enamuses ka ribosoomes milles L36 puudub. Kuna generatsiooniaja määramine põhineb eksponentsiaalse kasvu faasi analüüsil siis on L36A deletsiooni märkimisväärne mõju rakkude kasvule kooskõlas raku füsioloogiaga. Tõenäoliselt puudub del36A tüve ribosoomides valk L36 kuna L36B ekspresseeritakse alles

statsionaarses kasvufaasis. Seevastu L36B puudumine varases kasvufaasis rakkude kasvu mõjutada ei tohiks mida kinnitavad ka meie katseandmed (joonis 6).

Topeldeletsioonitüvedes üleekspresseeritud L36A või L36B võimaldab meil vastata küsimusele kas ja millisel määral mõjutavad L36 paralooigid rakkude kasvu ehk kas valgu A ja B vormil võiks olla ka füsioloogiline roll. Erinevalt del36A tüvest võimaldab del36AB + pB tekitada kunstliku olukorra kus L36B ekspresseerub *in trans* konstitutiivselt erinevalt looduslikust seisundist kus L36B sünteesitakse alles statsionaarses faasis. Seega saame tekitada tingimused kus meil on kaks homogeenset rakukultuuri mis sisaldavad vastavalt 100% L36A või L36B valku.

Topelndeletsioonitüvega del36AB saadud katseandmed langevad suures osas kokku del36A tüvega (joonis 6 ja 7). Ka siin oli kompensatoorne efekt detekteeritav L36A; L36B ja SecY/36A üleekspressiooni puhul samas kui SecY valgu lisamisel *in trans* mõju puudub.

Võrreldes meie katseandmeid seni kirjanduses avaldatud väheste ja vastuoluliste tulemustega võib väita, et *rpmJ* deletsioon mõjutab otseselt rakkude füsioloogiat. Meie poolt määratud kasvukiiruse 1,6 kordne suurenemine on kooskõlas Maeder and Draper (2005) avaldatud tulemustega, mis viitavad L36A tähtsusele. Kompensatsioonikatsetes mõõdetud kasvukiiruse muutus L36A lisamisel *in trans* (75–80% osas kasvu taastumine kontrollkultuuri suhtes) toetab hüpoteesi, et eelkõige L36A on vajalik rakkude normaalseks kasvuks. Kuigi Ikegami *et. al.*, (2005) katseandmed näitavad et rakkude normaalse kasvu taastamiseks on vajalik ainult SecY valk siis meie katseandmed seda ei kinnita. Võimalik, et katsetulemuste selline vastuolulisus on tingitud erinevate ekspressioonisüsteemide kasutamisest. Meie uurimistingimustes omas kompensatoorset efekti ainult L36A, L36B ja SecY/L36A ekspressioon *in trans*. Kuna kasvufenotüübi taastumine ei olnud täielik siis ei saa välistada ka võimalust, et teatavat rolli selles protsessis omab ka *rpmJ* võimalik seotus teda ümbritsevate geenide transkriptsiooniga (*secY* ja α operon).



Joonis 7. Del36AB ja del36AB kompensatsioonitüvede kasvukõverad. Üleökultuurist (2xYT, 37°C) tehti 2000 kordne lahjendus. Rakke kasvatati 2xYT söötmes 17 tundi (37°C), bakterikultuuri optilist tihedust ($A_{600\text{nm}}$) mõõdeti iga 7 minuti järel. X-teljel on mõõtmisaeg tundides ja Y-teljel optiline tihedus 600 nm juures. Rohelise puntiiriga on tähistatud MG1655 kontrollkultuur, sinisega del36AB topeldeletsioonitüvi ja punasega kompensatsioonitüvede kasvukõver.

3.2 *In vitro* translatsioon

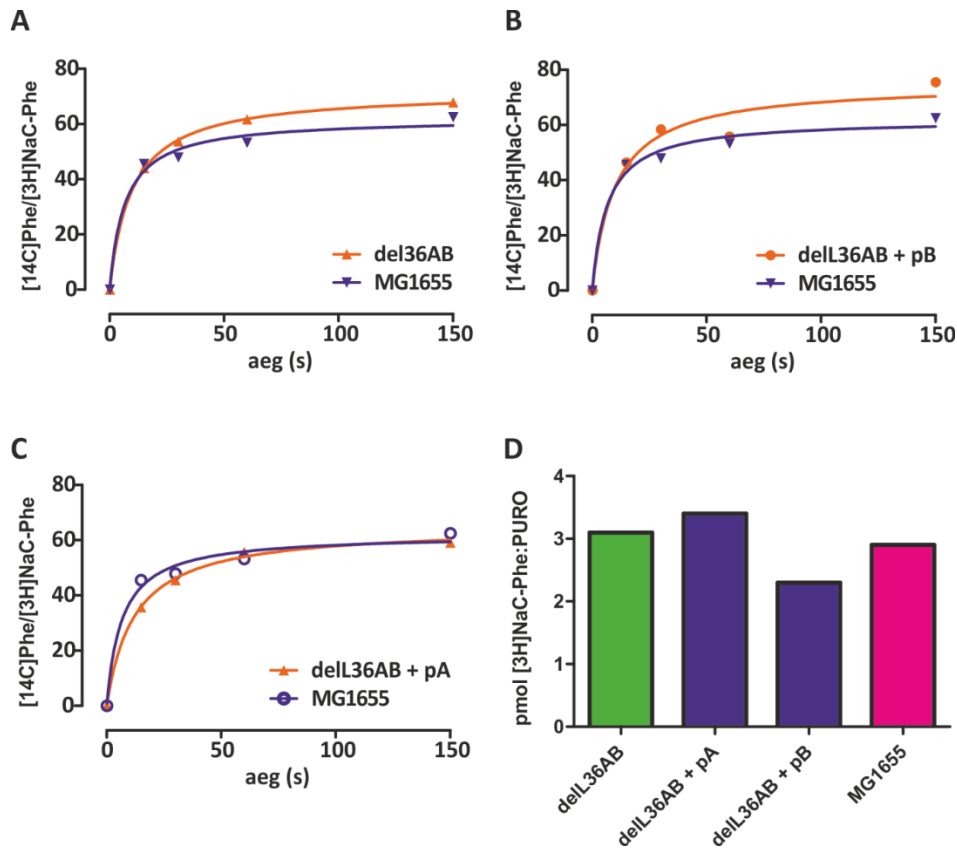
Kasvufenotüübi katse näitas meile, et r-valk L36 ekspressioon *in trans* on võimeline kompenseerima valgu puudumisest tingitud generatsiooniaja suurenemist. Lähtuvalt sellest otsustati kontrollida kas L36 puudumine mõjutab otseselt ribosoomide funktsionaalsust. Selleks analüüsiti esmalt ribosoomide peptiidsideme sünteesi võimet (peptidüültransferaas ehk PTC aktiivsust) ja ribosoomide üldist translatsioonivõimet polü(U) *in vitro* translatsioonisüsteemis. Translatsioonikatsetega püüame vastata küsimusele, kas ja millisel määral mõjutavad L36 paraloogide puudumine ribosoomide funktsioneerimist.

Maeder ja Draperi katsetest selgus, et L36 r-valgu eemaldamine ribosoomist põhjustab struktuurseid muutusi, mis ulatuvad valgu seondumispiirkonnast otse PTC-ni. Selleks, et kontrollida kas ribosoomide peptiidsideme sünteesi võime võiks olla mõjutatud L36 puudumisest, kasutati puromütsiini mudelreaktsiooni katset. Samuti uuriti kas ribosoomi üldine valgusünteesivõime on mõjutatud L36 puudumisest (*in vitro* polü(U) sõltuv polü(Phe) sünteesi translatsioonikatse). *In vitro* katsed aitaksid selgitada L36 paraloogide mõju translatsioonimasinavärgile.

PTC aktiivsuse analüüsiks kasutati puromütsiini mudel reaktsiooni, mis iseloomustab ribosoomide võimet katalüüsida peptidüültransferaasit reaktsiooni A-saiti seondunud puromütsiini ja P-saiti seondunud [3H]NACpHe-tRNA^{Phe} vahel. Ühtlasi võimaldab antud mudelreaktsioon hinnata aktiivsete ribosoomide hulka ribosoomide preparatsioonis. Katsetulemused näitavad, et nii topeltdeltantüve kui ka kompensatsioonitüvede ribosoomide PTC aktiivsus ei sõltu valgu L36 paraloogide olemasolust ribosoomis (joonis D). Kõikidel variantidel jäi aktiivsete ribosoomide hulk vahemikku 40–50% totaalsest ribosoomide populatsioonist. Seega võime väita et L36 paraloogid ei mõjuta ribosoomide võimet sünteesida peptiidsidet.

Kuna eelnevast katsest selgus, et L36 puudumine ei mõju PTC aktiivsust ja A võiB paralooge sisaldavad ribosoomid või ribosoomid kus puudub täielikult L36 on võimelised võrdsel tasemel sünteesima peptiidsidet, otsustati analüüsida ribosoomi üldist translatsioonivõimet. Selleks kasutati polü(U)-sõltuvat polü(Phe) translatsioonisüsteemi (Nierhaus ja Dohme, 1979). Polü(Phe) peptiidahela sünteesi protsessiivsuse hindamiseks kasutati kahte erineva isotoop määrgisega fenüüalaniini. Initsiaator tRNA analoogina kasutati [3H]NACpHe-tRNA^{Phe}, mis seondub ribosoomi P-piirkonda. Kuna [3H]NACpHe N-terminus on blokeeritud atsetüülrühma poolt siis [3H]NACpHe-tRNA^{Phe} ei ole võimeline käituma elongaator tRNA-na ning kõik

peptiidahelad algavad alati [3H] märgitud Phe-ga. Elongatsioonietapis lülitatakse ahelasse [C14] märgitud radioaktiivne fenüülalaniin. Selline lähenemine võimaldab meil hinnata peptiidahela sünteesi protsessiivsust ajas kui me võtame katsetulemustest suhte [3H]/[14C] mis peegeldab ribosoomide üldist translatsioonivõimet.



Joonis 8. *In vitro* translatsiooni katse tulemused. Polü(U) translatsioonikatse tulemused.

Katsetulemuste esitamisel kasutati statistilise analüüsi programmi GraphPad Prism 5.0.

ajapõlvuvuse analüüsil kasutati mittelineaarset regressioonanalüüsi. Paneelil A, B ja C on y-teljel on esitatud peptiidahelasse lülitunud pikomoolide suhe [14C]Phe/[3H]NAC-Phe. Analüüsil kasutati ajapunkte 15, 30, 60 ja 150 sek. Sinise joonega on tähistatud metsiktüüpi kontrollribosoomid. Paneeli D on esitatud puromütsiinikatse tulemused. Iga katsepunkt sisaldas 10 pmol 50S ja 15 pmol 30S subühikuid.

Katse läbiviimiseks valiti topeldeltatsiooni tüvi del36AB ja kaks kompensatsiooni tüve – del36AB+pA ja del36AB+pB. Katsetulemuste visualiseerimiseks tehti graafikuid, kus võrreldakse metsiktüüpi ribosoomide valgusünteesivõimet erinevate mutantide vastu.

Üksikdeletsioonitüved ei sobi ribosoomide üldise translatsioonilise aktiivsuse määramiseks, kuna

nende ribosoomide populatsioon on suure tõenäosusega heterogeenne, s.t et see valk, mille geen ei ole deleteeritud, ei pruugi alati olla ribosoomi koosseisus ja ribosoomis puudub tegelikult valk L36. Ekspresseerides plasmiidil kas L36 valgu A või B paraloogi võimaldab meil vastata küsimusele kas ja millisel määral mõjutavad valgu A ja B vorm translatsiooni. Polü[U] translatsioonikatse tulemused on esitatud joonisel 8.

Tulemuste järgi on näha, et olulist erinevust võrreldes metsiktüübiga del36AB-l ja del36AB+pA või del36AB+pB tüvest eraldatud ribosoomidel ei ole. Lisaks sellele näitavad katsetulemused, et ribosoomi protsesiivsuse seisukohast ei oma tähtsust, kas ribosoomis esindatud L36A või L36B valk. Kuna polü(U) katsesüsteem on kunstlik ja iseloomustab eelkõige ribosoomitsükli elongatsioonifaasi siis ei saa me välistada võimalust et L36 mängib rolli mõnes teises translatsioonietapis millele peaksid vastama edaspidised *in vitro* eksperimendid (initsiatsioon, terminatsioon jne).

3.3 Ribosoomide analüüs *in vivo*

Kasvukõverate analüüsi tulemused viitasid sellele et L36 paraloogid võiksid on vajalikud rakkude normaalseks kasvuks. Selgitamaks L36 paraloogide mõju 70S ribosoomi moodustamisele *in vivo*, vaadeldi ribosoomide profiili muutust ajas. Rakke kasvatati rikkal (2xYT) söötmel ja nende kasvu kontrolliti optilise tiheduse mõõtmise abil (A_{600}). Proovide kogumisel oli eesmärgiks analüüsida ribosoomide profiile nii kiire kasvu kui ka statsionaarse faasi ajapunktides. Proovid koguti järgmistel ajapunktidel: OD $A_{600} \sim 1,0$ (logaritmiline kasv) ja $A_{600} \sim 3,0$ (varajane statsionaarne faas). Statsionaarse faasi proovid võeti ajapunktidel 24h ja 48 h peale kasvatamise algust. Rakud lüüsiiti homogenisaatoriga, lüsaat klaariti ja kanti 15–30% sahharoosgradiendile OV-10 puhvrts. Ribosoomid fraktsioneeriti ultratsentrifuugimisega ning gradiendiprofiilides sisalduv nukleinhape visualiseeriti UV-mõõtja ja isekirjutajaga.

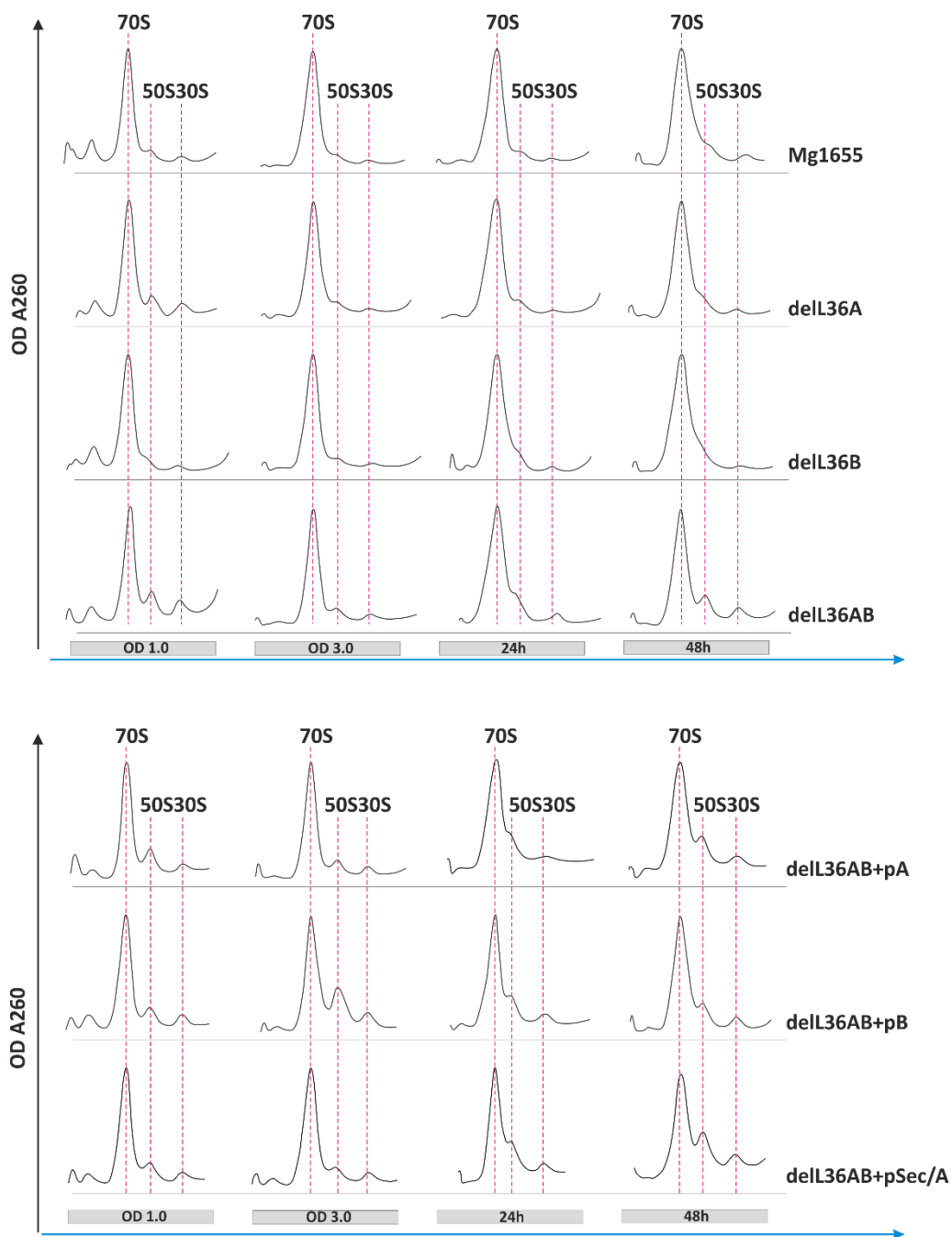
Esimeses katseseerias vaadeldi deletsioonitüvede del36A, del36B ja del36AB ribosoomide profiile (joonis 9). Teises katseseerias analüüsiti topeldeletsioonitüvesid, milles ekspresseeriti *in trans* kas L36A või L36B valku. Kuna antud katses eksisteerivad meil rakus ribosoomid, mis sisaldavad ainult kas L36 A või B vormi saame me hinnata erinevate paraloogide mõju ribosoomide jaotusele suhkrugradiendis (70S vs 50S vs 30S).

Nagu võis eeldada on polüribosoomide hulk logaritmilises faasis kõikidel tüvedel võrreldes hilisemate ajapunktidega faasidega suurem, mis peegeldab aktiivset valgusünteesi kiiresti

jagunevates rakkudes. Võrreldes disoomide fraktsioone võib väita, et L36 paraloogide puudumine ei mõjuta meie katsesüsteemis olulisel määral valgusünteesi (joonis 8A ja joonis 9, tulp OD 1). Teatavaid erinevusi on näha eksponentsiaalse faasi 50S vabade subühikute osas. Võrreldes deletsioonivariante metsiktüüpi tüve ribosoomide profiiliga on delL36A ja topeltdeletsioonitüve profiilidel suurenenud vabade 50S subühikute osakaal (joonis 9 tulp, OD 1). R-valgu L36B valgu puudumisel on gradiendiprofiil sarnane metsiktüübiga. Viimane on kooskõlas faktiga, et L36B ekspressioon toimub valdavalt just statsionaarses faasis (Tammsalu, 2012), kus esineb toitainete ja Zn^{2+} defitsiit. Suurenenud vabade subühikute hulka aktiivses ribosoomide assambleerumise faasis (rakkude kiire kasvu faas) võib põhjustada aeglustunud 50S subühikute biogenees. Eelnevalt on väidetud, et valk L36 osaleb lokaalse 23S RNA struktuuri stabiliseerimisel (Maeder and Draper, 2005). Seega võib oletada et juhul kui L36A puudub (del36A ja del36AB tüved) on 50S ribosoomide biogenees aeglasem võrreldes metsik tüüpi tüvega, mistõttu on suurenenud ka vabade 50S subühikute osakaal ribosoomide populatsioonis. Hilisemates ajapunktides kus ribosoomide süntees on minimaalne ei erine gradiendiprofiilid metsik tüüpi ribosoomide profiilidest (joonis 9, tulbad OD 3, 24h ja 48h).

Teises katseseerias vaadeldi topeltdeletsioonitüvede profiile tingimustes kus *in trans* ekspresseeriti L36 paralooge või SecY/L36A valku. Kõigil kolmel profiilil on eksponentsiaalses faasis detekteeritav teatav vabade 50S subühikute hulga suurenemine (joonis 9, tulp OD1) kuigi rakkudes peaks olema piisavalt L36A või L36B valku. Seega on esitatud katseandmetes teatav vastuolu, mis võib olla tingitud pigem katsetingimuste varieeruvusest ning fenotüübi kordumist tuleks korduskatsetega kontrollida.

Statsionaarses faasis (24h ja 48h) kasvukeskkonnas tekib toitainete ja muu kasvufaktorite defitsiit. Ribosomaalne profiil ei muutu tüvedes kus puudub r-valk L36A, mis esineb just eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudel ja toiduainete rikkas keskkonnas. del36B tüve puhul on suurenenud vabade 50S subühikute osakaal (joonis 9, tulp OD 3, 24h ja 48h). Sama seaduspära kehtib ka tüvede del36AB, del36AB+pA, del36AB+pB ja del36AB+pSec/A puhul, kuigi antud tüvedes ekspresseeritakse plasmiidilt vastavaid L36A paralooge (joonis 9, tulp OD 3, 24h ja 48h). Kõikide gradiendiprofiilide puhul võib väita, et kuigi osadel juhtudel täheldati teatavat vabade 50S subühikute osakaalu tõusu teatud kasvufaasis, on efekt valdavalt marginaalne. Seega võime väita et valgu L36 puudumine ei mõjuta olulisel määral ribosoomide profiili. Seega on kasvufenotüübi analüüsis nähtud mõju tingitud muudest faktoritest millele vastamiseks on vajalikud täiendavad *in vivo* ja *in vitro* katsed.



Joonis 9. Ribosoomide analüüs *in vivo*. Deletsioonitüvesid kasvatati rikkas (2xYT) söötmes loksutil ning võeti eksponentsiaalsel ja statsionaarsel ajapunktidel proovid. Rakud lüüsiiti homogenisaatoriga ning 30U ($A_{260\text{nm}}$) nukleinhapet sisaldavat rakulüsaati kanti 15–30% sahharoosigradiendile OV-10 puhvis ning lahutati ultratsentrifuugimisel. Ribosoomide profiilid on esitatud tulpades optilise tiheduse järgi proovi võtmise ajal (OD 1,0 – eksponentsiaalne faas ja OD 3,0 - varajane statsionaarne faas) või proovivõtmisaja järgi (24h ja 48h - statsionaarsed faasid). Punaste katkendjoontega on tähistatud 70S ribosoomide, 50S ja 30S subühikute vahelist kaugus profiil. X-teljel on märgistatud sedimentatsiooni suund, mis läheb paremalt vasakule, ja y-teljel optiline neelduvus $A_{260\text{nm}}$ juures.

KOKKUVÕTTE

E. coli ribosomaalne valk L36 on üks kahest ribosoomi valgust, mis on genoomis esindatud kahe paraloogse geenina. Hetkeseisuga on teadmised L36 ja tema paraloogide rollist ribosoomis puudulikud. Käesolevas töös kasutati erinevaid *in vivo* ja *in vitro* meetodikaid täitmaks seda teadmiste lünka. Töö põhieesmärgiks oli iseloomustada L36 paraloogide rolli eelkõige translatsiooni aspektist. Uuriti L36 paraloogide mõju kasvufenotüübile, translatsioonile ja 70S ribosoomide moodustumisele *in vivo*.

Näitasime, et rakkude kasvufenotüüpi mõjutab eelkõige L36A puudumine. Analüüsimaiks võimalikku L36 rolli viidi läbi kompensatsioonikatsed L36 paraloogide topelt- ja üksikdeletsioone sisaldavate tüvedega. Leidsime, et L36 paraloogide ekspressioon *in trans* on võimeline kompenseerima valgu puudumisest tingitud kasvudefekti. Kirjanduses avaldatud hüpotees, mille kohaselt on L36A puudumisest tingitud kasvudefekt on põhjustatud ainult temale eelneva SecY geeniekspressiooni häiretest, meie katsetes kinnitust ei leidnud. Näitasime, et SecY kompenseerib kasvudefekti *in trans* ainult koos L36A r-valguga.

In vitro katsetes analüüsiti L36 r-valgu puudumise mõju ribosoomi peptidüültransferaassele aktiivsusele ja üldisele translatsioonivõimele. Katsetulemused näitasid, et ribosoomide translatsioonivõime ei sõltu konkreetse L36 paraloogi olemasolust olles sarnane võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega.

In vivo analüüs näitas et L36 paraloogide puudumise mõju ribosoomide profiilile on marginaalne. Nii logaritmilises kui ka statsionaarses faasis on 70S, 50S ja 30S fraktsioonide suhted suures osas sarnased metsiktüüpi tüve ribosoomide profiiliga.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et L36 on vajalik rakkude normaalseks kasvuks. L36A paraloogi ekspressioon *in trans* kompenseerib suures osas valgu puudumisest tingitud kasvudefekti mis viitab tema olulisusele ribosoomis. Kuigi esmased translatsioonikatsed näitasid, et ribosoomide funktsionaalsuse aspektist ei mõjuta L36 puudumine oluliselt ribosoomide valgusünteesivõimet vajab antud aspekt detailsemat biokeemilist analüüsi.

On the importance of the *Escherichia coli* ribosomal proteins L36A and L36B in translation

Pavel Volõnkin

SUMMARY

Ribosome is a large ribonucleoprotein complex responsible for protein synthesis in prokaryotes as well as in eukaryotes. As the definition suggests ribosomes consist of r-proteins (“r” for ribosomal) and ribosomal RNA (rRNA) which makes up 2/3 of the ribosome itself. *E.coli* 70S ribosome comprises a large 50S subunit and a small 30S subunit. Ribosomes are considered to have a stable structure. However, the discovery of gene duplications of some prokaryotic r-proteins has caused the debate whether they are dynamically interchangeable depending on cells’ growth condition and therefore cause the heterogeneity of the ribosome population.

Ribosomal protein L36A is encoded by the *rpmJ* gene in the *spc* operon and the adjacent upstream *secY* gene codes for SecY protein that is a part of the SecYEG channel in the Sec protein-translocation pathway. Some researchers state that the disruption of the *rpmJ* gene causes phenotype defects by decreasing the stability of SecY mRNA and therefore inhibiting its translation. On the other hand, alternative research has suggested that namely L36A (has a Zn²⁺ binding motive) is responsible for the phenotype defects because of its location in a highly conserved region of ribosome. In addition, the paralog L36B which is encoded by the *ykgO* in the *ykgMO* operon is synthesised in stationary phase during Zn²⁺ depletion. Because of these contradictory speculations we aim to test the influence of L36 paralogs on the growth phenotype, translation and 70S association *in vivo*.

The results of this study can be summarised as follows:

1. In favourable conditions (rich media, 37°C) the absence of L36A paralog can cause growth defect (measured in doubling time and in the length of lag phase) in comparison with the wild type.
2. In case of absence of one paralog, both paralogs can compensate for each other *in trans* and improve growth defects in strains where one or both paralogs were missing

3. Overexpression of SecY did not improve growth defects as improvements were achieved during addition of SecY together with L36A *in trans*.
4. Deletion of L36 paralogous genes does not influence ribosome's peptidyl transferase center activity or processivity of the ribosome.
5. Neither L36A nor L36B are essential for subunit association *in vivo*.

Results of these studies suggest that L36 is required for cell growth. L36A paralog *in trans* addition can compensate for the most part the growth defect, which indicates r-proteins importance in ribosomes. In addition to this, we did not find evidence for the hypothesis that growth defect is caused by the lack of SecY. Although absence of L36 does not influence ribosome's peptide synthesis capability this aspect requires further investigation.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada enda juhendajat Aivar Liivi tema meisterliku õpetamise, kogemuse jagamise ja jumaliku kannatlikkuse eest. Tahan tänada kogu Molekulaarbioloogia ja Biokeemia labori kollektiivi sõbraliku keskkonna eest, eriti Silva Lilleorgu tema abi eest antud töö valmimisel. Loomulikult tänan enda isa Andreid ja ema Nataliat südamliku hoolitsuse ja lõpmatu armastuse eest, mis aitasid kõik kolm aastat tulest, veest ja vasktorudest läbi käia. Lõpuks tahan tänada Dvoretcki perekonda maitstva toidu eest, ilma milleta mõistuse töö ei oleks nii efektiivne.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Albers, S. V., Szabó, Z., and Driessen, A. J. (2006). Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 537-547.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner, H. Mori 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:1-11
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2000). The complex atomic structure of the large ribosomal subunit at 2,4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62: 293-300.
- Bieker, K. L., Phillips, G. J., and Silhavy, T. J. (1990). The *sec* and *prl* genes of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 291–310
- Byrgazov, K., Vesper, O., and Moll, I. (2013). Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Current opinion in microbiology*, 16(2), 133-139.
- Cerretti, D. P., Dean, D., Davis, G. R., Bedwell, D. M. & Nomura, M. (1983). The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucl. Acids Res.* 11, 2599–2616.
- Cummings, L., Riley, L., Black, L., Souvorov, A., Resenchuk, S., Dondoshansky, I. and Tatusova, T. (2002). Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol. Letters*, 216, 133–138.
- Dean, D., Yates, J. L., and Nomura, M. (1981). *Escherichia coli* ribosomal protein S8 feedback regulates part of the *spc* operon. *Nature (London)* 289:89-91.
- Demirci, H., Murphy IV, F., Murphy, E., Gregory, S. T., Dahlberg, A. E., and Jogle, G. (2013). A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. *Nature communications*, 4, 1355.

Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V. and Wahl, M. C. (2005). Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell*, 121(7), 991-1004.

Dohme, F. and Nierhaus, K. H. (1979). *J. Mol. Biol.* 107: 585 - 599.

Dunkle, J, Cate, J. (2013). *An Introduction to the Structure and Function of the Ribosome*, EcoSal Plus 2013; doi:10.1128/ecosal.2.5.2

Emr SD, Hanley-Way S, Silhavy TJ (1981). Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23 : 79-88

Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Roey, P. Van, Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S. and Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 113(6), 789-801.

Gongadze, G. M. (2011). 5S rRNA and ribosome. *Biochemistry (Moscow)*, 76(13), 1450-1464.

Hemm, M. R., Paul, B. J., Schneider, T. D., Storz, G., and Rudd, K. E. (2008). Small membrane proteins found by comparative genomics and ribosome binding site models. *Molecular microbiology*, 70(6), 1487-1501.

Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Ríos, J., Zhang, A., Soltanzad, N., & Storz, G. (2010). Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *Journal of bacteriology*, 192(1), 46-58.

Härd, T., Rak, A., Allard, P., Kloo, L., and Garber, M. (2000). The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold. *Journal of molecular biology*, 296(1), 169-180.

Ikegami, A., Nishiyama, K., Matsuyama, S. and Hajime, T. (2005). Disruption of rpmJ Encoding Ribosomal Protein L36 Decreases the Expression of secY Upstream of the spc Operon and Inhibits Protein Translocation in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (8), 1595–1602

Ito K, Wittekind M, Nomura M, Shiba K, Yura T, Miura A, Nashimoto H (1983). A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell* 32: 789-797

- Ito, K. (1992) SecY and integral membrane components of the Escherichia coli protein translocation system. *Molecular Microbiology* 6(17). 2423-2428
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2003. "Molecular biology of the Gene. 5th edition", p. 506–511. Pearson Education, Inc, San Francisco.
- Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 477-494.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187-208.
- Maeder, C. and Draper, D., E. (2005). A Small Protein Unique to Bacteria Organizes rRNA Tertiary Structure Over an Extensive Region of the 50 S Ribosomal Subunit. *J. Mol. Biol.* (2005) 354, 436–446
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A. and Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biol.* 2,0033.1–0033.14.
- Mattheakis, L. C. and Nomura, M. (1988). Feedback Regulation of the spc Operon in Escherichia coli: Translational Coupling and mRNA Processing *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Oct. p. 4484-4492
- Mori, H., and Ito, K. (2001). The Sec protein-translocation pathway. *Trends in microbiology*, 9(10), 494-500.
- Murakami, A., Nakatogawa, H., & Ito, K. (2004). Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12330-12335.
- Nesterchuk, M. V., Sergiev, P. V., and Dontsova, O. A. (2011). Posttranslational modifications of ribosomal proteins in Escherichia coli. *Acta naturae*, 3(2), 22.
- Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Piendl, W., Selmer, M., Liljas, A., Drygin, D., Zimmermann, R., Garber, M. and Nikonov, S. (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10(2), 104-108.

- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289(5481), 920-930.
- Noller, H. F. and Nomura, M. (1996) Ribosomes, p. 167-186. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia Coli and Salmonella*, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
- Noller, H.F. Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1991;60:191–227.
- Panina, E. M., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 9912-9917.
- Patzer, S. I., and Hantke, K. (2000). The Zinc-responsive Regulator Zur and Its Control of the *znu* Gene Cluster Encoding the ZnuABC Zinc Uptake System in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24321-24332.
- Ramakrishnan, V. and Moore, P. B. (2001). Atomic structure at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 144–154
- Rao CV, S. and Anné, J. (2011). Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets. *Future microbiology*, 6(11), 1279-1296.
- Ratje, A. H., Loerke, J., Mikolajka, A., Brünner, M., Hildebrand, P. W., Starosta, A. L., Dönhöfer, A., Connell, S. R., Fucini, P., Mielke, T., Whitford, P. C., Onuchic, J. N., Yu, Y., Sanbonmatsu, K. Y., Hartmann, R. K., Penczek, P. A., Wilson, D. N. and Spahn, C. M. T. (2010). "Head Swivel on the Ribosome Facilitates Translocation by Means of Intra-subunit TRNA Hybrid Sites." *Nature* 468.7324: 713-16.
- Robertson, W. R., Dowsett, S. J., and Hardy, S. J. S. (1977). Exchange of ribosomal proteins among the ribosomes of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 157(2), 205-214.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Liquid media for *E. coli*, p. A2.4. *In* J. Sambrook and D. W. Russell (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310: 827-834.

Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. 4th., Weixlbaumer, A., Petry., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complex with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942

Stelzl, U., Connell, S., Nierhaus, K. H. and Wittmann-Liebold, B. (2001). Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions. P. 1-12. In: eLS

Tammsalu, T. (2012) *E. Coli* ribosoomide heterogeensus – mida näitab proteoomik? Magistritöö. Tartu Ülikool.

Tishchenko, S., Gabdulkhakov, A., Nevskaya, N., Sarskikh, A., Kostareva, O., Nikonova, E., Sycheva, A., Moshkovskii, S., Garber, M. and Nikonov, S. (2012). High-resolution crystal structure of the isolated ribosomal L1 stalk. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(8), 1051-1057.

Ueguchi, C., Wittekind M., Nomura, M., Akiyama, Y. and Ito, K. (1989) The sec Y-rpmJ region of the spc ribosomal protein operon in *Escherichia coli*: Structural alterations affecting secY expression. *Mol Gen Genet* 217:1-5

Valle, Mikel, Andrey Zavialov, Wen Li, Scott M Stagg, Jayati Sengupta, Rikke C Nielsen, Poul Nissen, Stephen C Harvey, Måns Ehrenberg, and Joachim Frank. "Incorporation of Aminoacyl-tRNA into the Ribosome as Seen by Cryo-electron Microscopy." *Nat Struct Biol Nature Structural Biology* (2003): 899-906

Wilson, D. N. and Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 40: 243–267

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., Hartschk, T. and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327-339.

Wittman, H.G. (1982). Components of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem*. 51: 155-183.

Yates, J. L., Arfsten A. E., and Nomura M. (1980). In vitro expression of *Escherichia coli* ribosomal protein genes: autogenous inhibition of translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1837-1841.

Yonath, A. (2002). THE SEARCH AND ITS OUTCOME: High-Resolution Structures of Ribosomal Particles from Mesophilic, Thermophilic, and Halophilic Bacteria at Various Functional States. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:257–73

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. and Noller, H. H. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5,5 Å resolution. *Science*. 292: 883-896.

Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., and Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, 106(2), 233-241.

LIHTLITSENTS

Mina, Pavel Volõnkin

(sünnikuupäev: 20.02.1993)

1. Annan Tartu Ülikooli tasuta loa (lihtlitsents) enda loodud teose

Escherichia coli ribosoomi valkude L36A ja L36B tähtsuset translatsioonil

Mille juhendaja on Aivar Liiv, *Ph.D*

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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 25.05.2015