

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

***E.coli* 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid ja nende mõju ribosoomi biosünteesile**

Bakalaurusetöö

12 EAP

Anastassia Klink

Juhendaja PhD Aivar Liiv

TARTU 2020

INFOLEHT

E.coli 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid ja nende mõju ribosoomi biosünteesile.

Ribosoomi funktsiooniks on valgusüntees, see koosneb suurest ja väikesest subühikust ning ribosomaalsest RNA'st (rRNA) ja ribosoomi valkudest (r-valgud). Kõikide organismide ribosomaalne rRNA sisaldab suuremal või vähemal määral modifitseeritud nukleotiide.

Modifitseeritud nukleotiidide positsioonid ning modifikatsioonide arv on erinevate organismide lõikes varieeruv. *E.coli* ribosoomi 36 modifikatsioonidest 13 on koondunud 23S rRNA V domeeni. V domeenis asub peptidüültransferaasne tsepter (PTC), mis on ribosoomi katalüütiliseks tseptriks, kus toimub peptiidideme süntees. Vaatamata sellele, et modifikatsioonide täpne funktsioon on teadmata, asub enamik modifikatsioonidest funktsionaalselt olulistel kohtadel. mis osutab nende tähtsusele.

Käesolevas töös uuriti, kas *E.coli* 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid mõjutavad ribosoomi biogeneesi ja bakteriraku kasvu.

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees.

Märksõnad: *E. coli* ribosoom, rRNA modifikatsioonid, rRNA V domeen.

Modifications of E.coli 23S rRNA V domain and their effect on ribosome biosynthesis.

The function of the ribosome is protein synthesis and it consists of large and small subunits formed by ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins (r-proteins). All organisms contain rRNA modifications, but their positions and the number of modifications vary from organism to organism. Thirteen of the 36 modifications of the *E. coli* ribosome are concentrated in the V domain of 23S rRNA. The V domain contains peptidyltransferase center (PTC), which is an important catalytic site for peptide bond synthesis. Although the exact functions of the modifications are unknown, most of the modifications take place in a functionally important places, which may indicate their importance.

The aim of this study is to analyze how modifications in the V domain of *E. coli* 23S rRNA affect ribosome biogenesis and cell growth.

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis.

Keywords: ribosome, rRNA, modifications, rRNA V domain.

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. <i>E.coli</i> ribosoom.....	6
1.2. Ribosomaalne RNA.....	7
1.3. 23S rRNA struktuurelemendid.....	8
1.4. Ribosomaalse RNA modifikatsioonid.....	11
1.5. Pseudouridiin (Ψ).....	13
1.6. Metülatsioon.....	13
1.7. Pseudouridiin süntaasid.....	14
1.8. Metüültransferaasid.....	14
1.9. 23S rRNA V domeeni pseudouridiini süntaasid.....	14
1.10. 23S rRNA V domeeni metüültransferaasid.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1. Töö eesmärk.....	18
2.2. Materjal.....	18
2.3. Metoodika.....	21
2.3.1. <i>E.coli</i> tüvede konstrueerimine.....	21
2.3.2. Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosigradiendis.....	22
2.3.3. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniaja määramine.....	22
2.4. Tulemused ja arutelu.....	23
2.4.1. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniaja määramine.....	23
2.4.2. Ribosoomide analüüs in vivo.....	34
KOKKUVÕTE.....	41
SUMMARY.....	42
KASUTATUD KIRJANDUS.....	44
LIHTLITSENTS.....	48

KASUTATUD LÜHENDID

tRNA - transport RNA

mRNA - informatsiooni - RNA

nt- nukleotiid

A-sait - aminoatsüül-tRNA sait

PTC - peptidüültransferaasne tsenter

Ψ - pseudouridiin

snRNA - väike tuuma RNA

miRNA - mikro-RNA

D - dihydrouridiin

CAM - kloroamfenikool

SRL - sartsiin-ritsiin ling

βMER - β- merkptoetanool

SISSEJUHATUS

Ribosoom on keeruline “bioloogiline masin”, mis moodustub kahest osast: suurest 50S ja väikesest 30S subühikust ning mille ülesandeks on valgusüntees. Ribosoomi koostisesse kuuluvad ribosoomi valgud ja ribosomaalne RNA. Bakteriaalne ribosoom koosneb 5S, 16S, 23S rRNA-dest ja 54 r-valgust ning *E. coli* on kujunenud välja heaks mudelorganismiks valgusünteesi uuringutes.

Ribosomaalse RNA nukleotiidid on tihti modifitseeritud ning need modifikatsioonid on sageli erinevate organismide vahel konserveeritud. Kõige enam levinud modifikatsioonid on pseudouridiin ja metülatsioonid, kuid harva esinevad ka pseudouridiini metülatsioonid, hüdroksüütidiinid ja dihüdrouridiinid. *E. coli* rRNA's on 36 modifitseeritud nukleotiidi, millest suur hulk on koondunud suure subühiku 23S rRNA V domeeni, kus asub peptidüültransferaasne tsenter (PTC). Vaatamata modifikatsioonide rohkustele ning nende koondumisele katalüütiliselt tähtsatesse piirkondadesse, on modifikatsiooniensüümide ning modifikatsioonide füsioloogiline tähtsus ebaselge.

E. coli $\Delta 10$ tüvi on uurimistöö aluseks. Antud tüvi on J. Remme labori poolt konstrueeritud ning selles on inaktiveeritud kõik teadaolevad 23S rRNA V domeeni modifikatsioone sünteesivad ensüümid. $\Delta 10$ tüvi on heaks mudelsüsteemiks, mis võimaldab uurida individuaalsete modifikatsioonide rolli ekspresseerides seal üksahaaval modifikatsiooniensüüme.

Uurimistöö põhieesmärgiks on selgitada 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide rolli ribosoomide biogeneesil ja valgusünteesil.

Töö kirjanduslikus osas antakse lühiülevaade 23S rRNA erinevatest domeenidest, V domeeni modifikatsioonidest ja neid katalüüsivatest modifikatsiooniensüümidest.

Eksperimentaalselt ekspresseeritakse $\Delta 10$ tüves *in trans* üksahaaval modifikatsiooniensüüme kodeerivaid gene ning analüüsitakse tüvede kasvu erinevates kasvutingimustes. Teiseks, uuritakse modifikatsioonide mõju ribosoomide biogeneesile *in vivo* kasutades ultratsentrifuugimist.

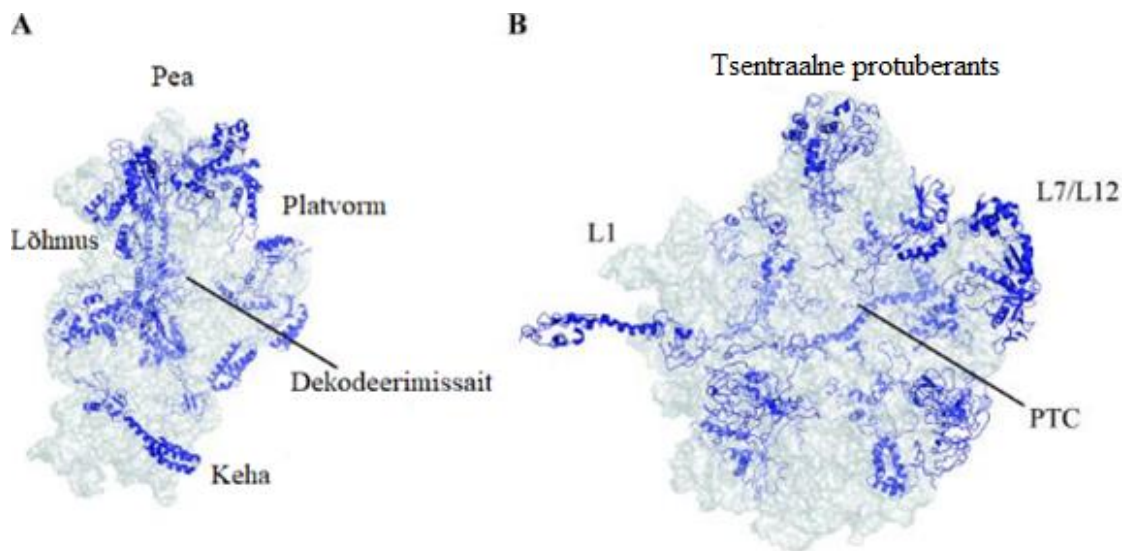
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *E.coli* ribosoom

Ribosoom on suur (≥ 2 MD) organell, mille ülesandeks on valgusüntees. *E.coli* ribosoom koosneb kahest subühikust – väikesest 30S ja suurest 50S, mis moodustavad translatsiooniliselt aktiivse 70S ribosoomi. Väike alaühik (30S) koosneb 16S rRNAst (1,542nt) ja 21 valgust; suur alaühik (50S) koosneb kahest rRNA molekulist – 23S rRNA-st (2,904 nt) ja 5S rRNAst (120 nt) ning 33 valgust (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). Kahe subühiku liitumine toimub molekulidevaheliste sildade kaudu, mis moodustuvad nende kahe subühiku interaktsiooni ajal (Yusupov et al., 2001). Valgusünteesi käigus interakteerub ribosoom erinevate liganditega nagu tRNA, mRNA, initsiatsiooni/elongatsiooni/terminatsiooni fakrotitega ning läbib mitmeid konformatsioonilisi muutusi, selleks et kergendada protsesside läbiviimist (Agrawal et al., 1999).

30S ja 50S ribosoomi alaühikud on erinevate ülesannetega. 30S subühikul on 2 peamist ülesannet: mRNA-ga interaktsiooni initsieerimine translatsiooni ajal ja mRNA dekodeerimine. 30S subühiku molekulmass on ligi kaks korda väiksem kui 50S subühiku molekulmass ning tema struktuuri põhielementideks on ülemine osa, kuhu kuulub pea ja alumine osa, kus on ülejäänud keha ja platvorm (joonis 1) (Yusupov et al., 2001). Pea allpool asuv kael on natuke painutatud ja põhjustab sügava lõhmuse („*cleft*“) teket. Dekodeerimissait asub lõhmuse all (joonis 1). Dekodeerimispiirkond on pandlikum, võrreldes alumise subühiku piirkonnaga ja see hõlbustab struktuurseid ümberkorraldusi, mis on vajalikud õige tRNA valimiseks A-saidis. Samuti võib paindlikkus mängida olulist rolli mRNA ja tRNA liikumiste kontrollimisel translokatsiooni ajal (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). 30S subühiku RNA ja valkude jaotus on ebasümmeetriline, valgud asuvad enamasti ülemises, alumises ja külgnevates alades (Wimberly et al., 2000).

50S subühik on poolkerakujuline ja koosneb 3-st põhilisest struktuurelemendist: L7/L12 kühmusest („*stalk*“), tsentraalsest protuberantsist ja L1 kühmusest (Joonis 1). L7/L12 struktuur koosneb neljast laiendatud ja volditud L7/L12 valgu vormist (Agrawal et al., 1999). Tsentraalne protuberants asub subühiku keskel ja sisaldab 5S rRNA-d ja sellega seotud valke (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). 50S subühiku koosseisu kuulub peptidüütransferaasentsenter (PTC), mis katalüüsib 2 olulist keemilist reaktsiooni: peptiidideme moodustumist ja peptiidi vabanemist (Polacek & Mankin, 2005).



Joonis 1. *E.coli* 30S ja 50S subühikute tertsiaarne struktuur. A. 30S subühiku tertsiaarstruktuur. Joonisel on näidatud põhilised struktuurelemendid: pea, platvorm, keha. Samuti on näha lõhmuse ning selle all asuva dekodeerimispiirkonda. B. 50S subühiku tertsiaarstruktuur. Joonisel on esitatud 3 põhipiirkonda: tsentraalne protuberants, L1 kühmus, L7/L12 kühmus ning peptidüültransferaasne tseenter. Joonisel sinisega märgitud ribosomaalsed valgud ja läbipaistva värviga rRNA (Joonis on kohandatud artiklist Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007)

1.2. Ribosomaalne RNA

Ribosomaalne RNA hõimab 80% kogu raku RNA-st ja on ribosoomi põhikomponent (Blanco & Blanco, 2017). Ribosoomi RNA moodustab 2/3 ribosoomi kogumassist (Blanco & Blanco, 2017). *E.coli* ribosoom koosneb kolmest RNA molekulist: 5S, 16S ja 23S rRNA-st. Igaüks nendest rRNA molekulist on oma nime saanud vastavalt oma sedimentatsiooni koefitsiendile, mis iseloomustab molekuli suurust. Ribosomaalne RNA osaleb tRNA /mRNA sidumises, peptiidsideme sünteesis (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). Ribosomaalses RNA-s osasid nukleotiide modifitseeritakse ning neid modifikatsioone sünteesivad spetsiaalsed ensüümid. Suur osa modifikatsioonidest on koondunud ribosoomi aktiivsetesse tsentritesse, nendeks on PTC ja dekodeerimis-tseenter (K.-T. Wang et al., 2012).

16S rRNA sekundaarstruktuur koosneb kolmest kompaktselt domeenist (5', tsentraalne ja 3' mažoorne domeen) ja ühest laiendatud 3' minoorsest domeenist (Stagg et al., 2003). Sekundaarstruktuuris hõlmab domeen I keha, domeen II moodustab platvormi, mažoorne 3' domeen moodustab peapiirkonda ja minoorne 3' domeen moodustab kõige pikkema üksiku lünga 30S subühikus, sest see ulatub keha kaelapiirkonnast keha põhjani (Kaczanowska & Rydén-Aulin, 2007). 23S rRNA on kaks korda suurem võrreldes 16S rRNA-ga, seob kaks korda rohkem valke ja lisaks peab ta interakteerida ka 5S rRNA-ga. Sekundaarstruktuuri alusel koosneb 23S rRNA seitsmest domeenist (0-VI). Kaheksandaks domeeniks loetakse

5S rRNA-d (Petrov et al., 2013) (joonis 2). Väikese subühiku 16S rRNA domäänid on iseseisvad ja nad moodustavad omavahel diskreetse struktuuri. 23S rRNA struktuuri puhul sellist korrapära ei esine, domäänid on omavahelises sõltuvuses.

1.3. 23S rRNA struktuurelemendid

Domeen 0 - Struktuurselt koosneb nukleotiididest 562-586, 1251-1270, 1648-1678, 1990-2057, 2611-2625 ning seda peetakse 23S rRNA domeenide südamikuks („*core*“), millest hargnevad kõik ülejäänud domeenid (Petrov et al., 2013). Domeen I sisaldab ühe modifikatsiooni m^6A2030 (Sergeeva et al., 2015).

Domeen I koosneb nukleotiididest 1-561, 2895-2904 ja asub subühiku välimises piirkonnas, L1 kühmu all (Ban et al., 2000; Petrov et al., 2013).

Domeen II koosneb nukleotiididest 587-1250 ja on seistmest 23S rRNA domeenidest kõige suurim (Petrov et al., 2013). Sellel 23S rRNA domeenil on kolm eendit, mis ulatuvad subühiku liide saidist edasi. Üheks etteulatavaks osaks on heeliks 42-44, mis kuulub L7/L12 kühmu RNA koostisesse ja interakteerub elongatsioonifaktoritega. Teiseks eendiks on heeliks 38, mis on pikim hargnemata vars („*stem*“) 50S subühikus. See algab subühiku tagaosast, paindub 90° kraadini ja ulatub väikese subühiku poole V domeeni ja 5S rRNA vahel. Kolmandaks etteulatavaks osaks on heeliks 32-35,1 ja ta ulatub väikese subühiku poole (Ban et al., 2000). Domeen II sisaldab 4 modifikatsiooni: m^1G745 , $\Psi 746$, m^5U747 , $\Psi 955$ (Sergeeva et al., 2015).

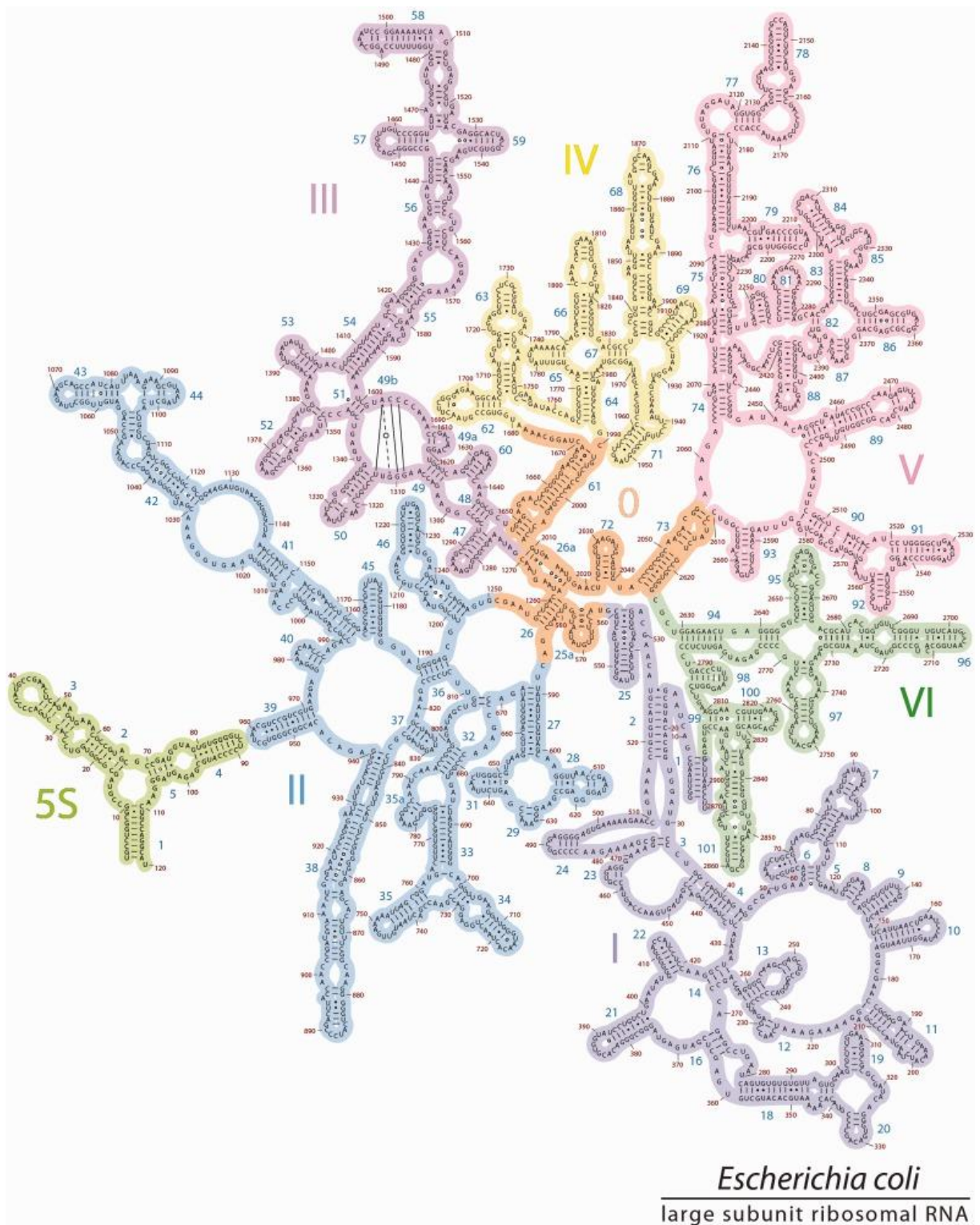
Domeen III on kompaktne globulaarne 23S rRNA domeen, mis koosneb nukleotiididest 1271-1647 (Ban et al., 2000; Petrov et al., 2013). Kõige enam ta interakteerub domeen II-ga, kuid samuti esinevad kontaktid domeenidega I, VI, IV. Võrreldes kõikide teiste 23S rRNA domeenidega, tal on väga vähe kontakte V domeeniga (Ban et al., 2000). Domeenis III on leitud 1 modifikatsioon m^6A1618 (Sergeeva et al., 2015).

Domeen IV koosneb nukleotiididest 1679-1989. See on üks väheseid piirkondi 23S rRNAs, mis ei ole ribosomaalsete valkude poolt ulatuslikult stabiliseeritud (Ban et al., 2000; Petrov et al., 2013). Domeen IV sisaldab 6 modifikatsiooni: m^2G1835 , $\Psi 1911$, $\Psi 1917$, $m^3\Psi 1915$, m^5U1939 , m^5C1962 (Sergeeva et al., 2015).

Domeen V (nukleotiidid 2058-2610), mis on selle uurimistöo põhilise tähtsusega, asub 50S subühiku keskel IV ja II domeeni vahel ning on tihedalt seotud peptidüültransferaase aktiivsusega ribosoomis (Ban et al., 2000). Struktuurselt jaguneb see domeen kolmeks

piirkonnaks. Esimene on heeliks 75, mis moodustab L1 valgu sidumissaidi. Teine piirkond koosneb heeliksitest 80-88, need moodustavad suurema osa tsentraalset protuberantsi piirkonnast. Kolmandaks komponendiks on heeliksid 89-93, mis ulatuvad VI domeeni poole ja aitavad stabiliseerida ribosoomi elongatsioonifaktorite siduva regiooni (Ban et al., 2000). *E. coli* 23S rRNA-s kaardistatud 25 transkriptsioonijärgse modifikatsiooni seast asuvad 13 modifitseeritud nukleotiidi V domeenis (Toh & Mankin, 2008). V domeenis leidub järgmiseid modifikatsioone: m⁷G2069, Gm2251, m²G2445, hU2449, Ψ2457, Cm2498, oh⁵C2501, m²A2503, Ψ2504, Um2552, Ψ2580, Ψ2604, Ψ2505 (Sergeeva et al., 2015).

Domeen VI koosneb nukleotiididest 2626-2894 ning on kõige väiskem 23S rRNA domeen. Selle domeeni kõige olulisemaks struktuurseks osaks on sartsiin-ritsiin ling (SRL). See ling on oluline erinevate faktorite sidumiseks ning selle lingu eemaldamine võib põhjustada ribosoomi inaktiveerimist. SRL konformatsiooni stabiliseeritakse läbi interakteerimist domeen V-ga (Ban et al., 2000; Petrov et al., 2013).



Joonis 2. *E. coli* 23S rRNA sekundastruktuur. Joonisel on näidatud domeenid 0, I, II, III, IV, V, VI, VII ja 5S rRNA ja numbritega tähistatud heelksid ja lingud (Petrov et al., 2013).

1.4. Ribosomaalse RNA modifikatsioonid

RNA modifitseeritud nukleotiidid esinevad kõikides eludomeenides: arhedel, bakteritel ja eukarüootidel (Purta et al., 2009). Enam esineb pseudouridiin ja metülatsioon, kuid esinevad ka hüdroksüuridiinid, dihydrouridiinid, pseudouridiini metülatsioonid. Sageli varieeruvad nende modifikatsioonitüübid ja positsioonid erinevate organismide vahel (Mizutani et al., 2004). Bakteris modifitseeritakse põhiliselt lämmastikaluseid (aluse modifitseerimine ja isomeriseerimine), eukarüootides aga on kõige sagedasem riboosi 2'OH metüleerimine (riboosi modifitseerimine). Enam(ik) RNA modifikatsioon on rRNAs ja tRNAs, kuid neid esineb ka mRNAs, snRNAs ja miRNAs (Li & Mason, 2014). Nii RNA kui ka riboosi kohaspetsiifiliste modifikatsioonide teostamiseks kuulub väga palju energiat ja geneetilist materjali (Agris, 1996).

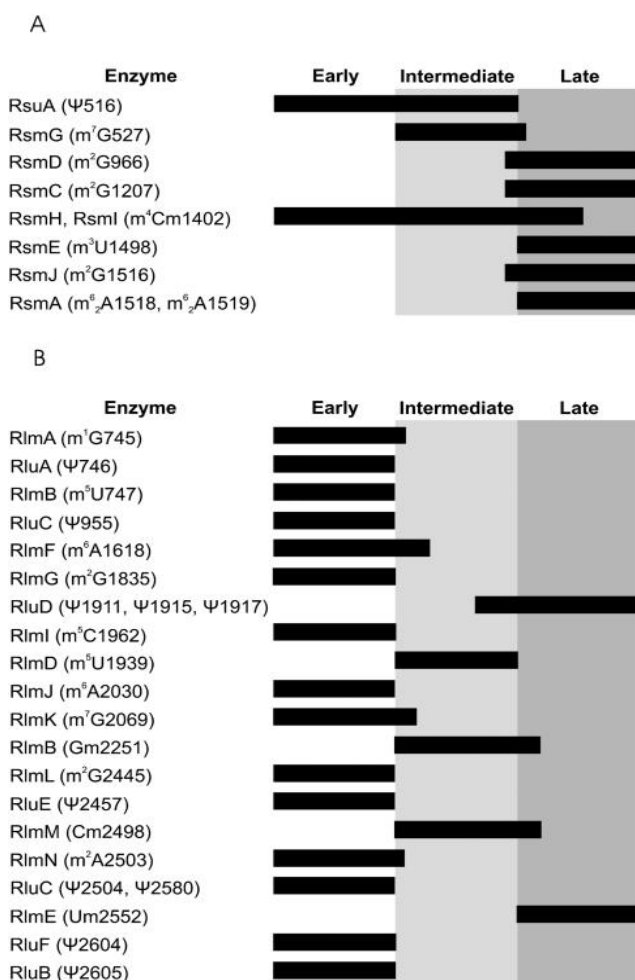
Paljud modifitseeritud nukleotiidid on bakteriliikide hulgas konserveerunud, osad neist univertsalselt, mis viitab otseselt nende funktsionaalsele tähtsusele. Samas valdava enamiku modifikatsioonienamuste spetsiifiline funktsioon ei ole teada. Üldiselt arvatakse, et modifikatsioonid võiksid mõjutada nukleotiidide keemilisi omadusi, mis omakorda muudavad või suunavad ribosoomi kokkupanemist ja valgusünteesivõimet (Sergeeva et al., 2015).

Escherichia coli 70S ribosoom sisaldab 36 modifitseeritud nukleotiidi, nendest 23 metülatsiooni, 10 pseudouridiini, 1 metüleeritud pseudouridiin, 1 dihydrouridiini ja 1 hüdroksüüridiini (Purta et al., 2009). Enamik modifitseeritud nukleotiidid asub piirkondades, mis täidavad ribosoomi põhifunktsioone, need on dekodeeriv ja peptidüültransferaasne tšenter (PTC) ning ribosoomi subühikute vahelises piirkonnas. Modifikatsioonide paiknemine nendes kohtades võib vihjata sellele, et mõned modifikatsioonid võivad ribosoomi funktsioone peenhäälestada (Mizutani et al., 2004).

Ribosoom on üks evolutsiooniliselt eelistatud antibiootikumi sihtmärke. Suur hulk looduslike antibiootikumide seonduvad ribosoomiga ja pärivad valkude sünteesi, täpsemalt seonduvad PTC, mis on ribosoomi peamine katalüütiline koht. PTC moodustatakse peamiselt 23S rRNA V domeeni segmendite poolt, millele modifitseeritakse paljud rRNA modifitseerivad ensüümid. Kuna bakterite resistentsus antibiootikumite suhtes on nendele kasulik, siis võiks arvata, et evolutsiooni käigus säilisid rRNA modifitseerimise mehhanismid, et kaitsta ribosoomi antibiootikumi seondamise eest (Toh & Mankin, 2008).

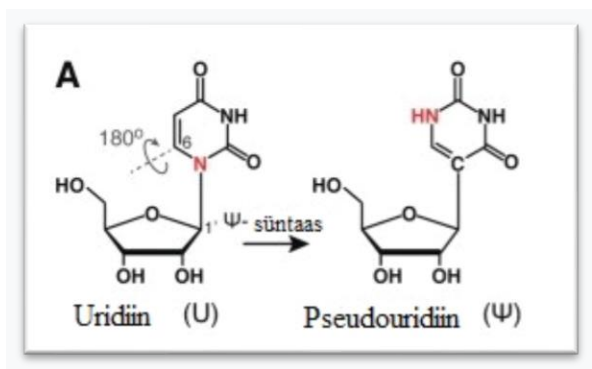
E. coli 16S rRNA-s on 11 modifitseeritud nukleotiidi, nendest 10 on metülatsioonid ja 1 pseudouridiin (Purta et al., 2009). Suurem osa modifikatsioonidest sünteesitakse 30S subühiku kokkupanemise viimastel etappidel (Siibak & Remme, 2010). Huvitav on see, et ükski 16S rRNA modifikatsioonidest pole funktsionaalse aktiivse ribosoomi jaoks vajalik (Sergeeva et al., 2015).

23S rRNA-s on 25 modifitseeritud nukleotiidi ja võrreldes 16S rRNA-ga sünteesitakse modifikatsioonid subühiku assambleerumisel varajastel etappidel (Siibak & Remme, 2010). 25-st modifitseeritud nukleotiidist on 13 metülatsiooni, 9 pseudouridiine, 1 metüülpseudouridiin, 1 dihüdrouридиin ja 1 hüdroksütsütidiin (Sergeeva et al., 2015) ning 2/3 nendest modifikatsioonidest asuvad PTC keskel (Mizutani et al., 2004). Hüdroksütsütidiin U2449 on ainuke D modifikatsioon, mis leidub *E. coli* rRNA's ning ensüümi, mis selle modifikatsiooni läbi viib praeguseks ajaks ei ole teada (O'Connor et al., 2001).



Joonis 3. 16S ja 23S rRNA modifikatsiooniensüümide aktiivsus ribosoomi assambleerumise erinevatel etappidel. Joonisel on tähistatud 3 assambleerumise etappi: varajane, keskmine, hiline. Joonisel on näha millisel assambleerumise etapil sünteesitakse rRNA modifikatsioone. **A.** 16S rRNA ja mustaga tähistatud etapp. **B.** 23S rRNA ja mustaga tähistatud etapp. Joonisel on esitatud RlmK ja RlmL eraldi, kuid praeguseks ajaks seda peetakse üheks ensüümiks – RlmKL, mis katalüüsib kaks modifikatsiooni ribosoomi 50S subühiku kokkupanemise varasel etapil (Joonis on võetud artiklist Siibak & Remme, 2010).

1.5. Pseudouridiin (Ψ)



Joonis 4. Uridiini isomeriseerimine pseudouridiiniks. Uridiinis esineb uratsiilialuse ja riboosi vahel C1'-N1 glükosiidside. Uratsiilialuse keerutatakse 180° C6-N3 telje ümber (näidatud nooltega) ning tekib uus C1'-C5 glükosiidside (pseudouridiin).

Pseudouridiin (Ψ) on uridiini 5-ribosüül-isomeer, mis esineb igat tüüpi rakulises RNAs: rRNA-s, tRNA-s, väikeses tuuma- ja nukleolaarses RNA-des, pikas kodeerimata RNA-s. Pseudouridiin on rRNA modifitseeritud nukleotiidide seas kõige sagedasemini esinev lämmastikualuse modifikatsioon ja seega tihti peetakse seda ka „viieandaks nukleotiidiks“ (Mizutani et al., 2004). Pseudouridiini ainulaadseks tunnuseks on C-C glükosiidsideme olemasolu – tavalise uridiini glükosiidside on C-N, mis seob alust ja suhkrut. C-C side põhjustab suuremat konformatsioonilist painduvust (Charette & Gray, 2000). Uridiini isomeriseerimist pseudouridiiniks teostavad nii RNA-st sõltumatud kui ka RNA-st sõltuvad ensüümid, seega katalüüsivad pseudouridüülimist kaks erinevat süsteemi: pseudouridiin süntaasid, mis esinevad kõikides eludomeenides, ning H/ACA ribonukleoproteiinid (RNP), mis esinevad ainult arhedel ja eukarüootidel (Tillault et al., 2018). Paljude pseudouridiinide täpne funktsioon rRNA-s on teadmata. Üldiselt arvatakse, et pseudouridiinid mängivad rolli RNA stabiliseerimisel ja RNA korrektsel voltimisel. Pseudouridiin võimaldab moodustada uridiinil ühe lisa vesiniksidet (Sergeeva et al., 2015). Hoolimata pseudouridiinide rohkusest rRNA-s ei mõjuta üksikute pseudouridiini süntaaside eemaldamine märkimisväärselt bakteri elutegevust in vitro (Sergeeva et al., 2015).

1.6. Metülatsioon

Nukleotiidide metüleerimine ribosomaalsetes RNA-des on üldlevinud modifikatsioon, mis esineb kõikides elusorganismides (Sergiev et al., 2018).

Metüleeritud nukleotiidid stabiliseerivad tõenäoliselt suure ribosomaalse subühiku struktuuri, samuti interakteeruvad pinnaga kokkupuutuvad modifitseeritud alused tRNA või translatsioonifaktoritega (Sergiev et al., 2018). Metüleerimine suurendab nukleotiidide hüdrofoobsust ja seega võib mõjutada aluste „stack’ingut“ (Sergeeva et al., 2015).

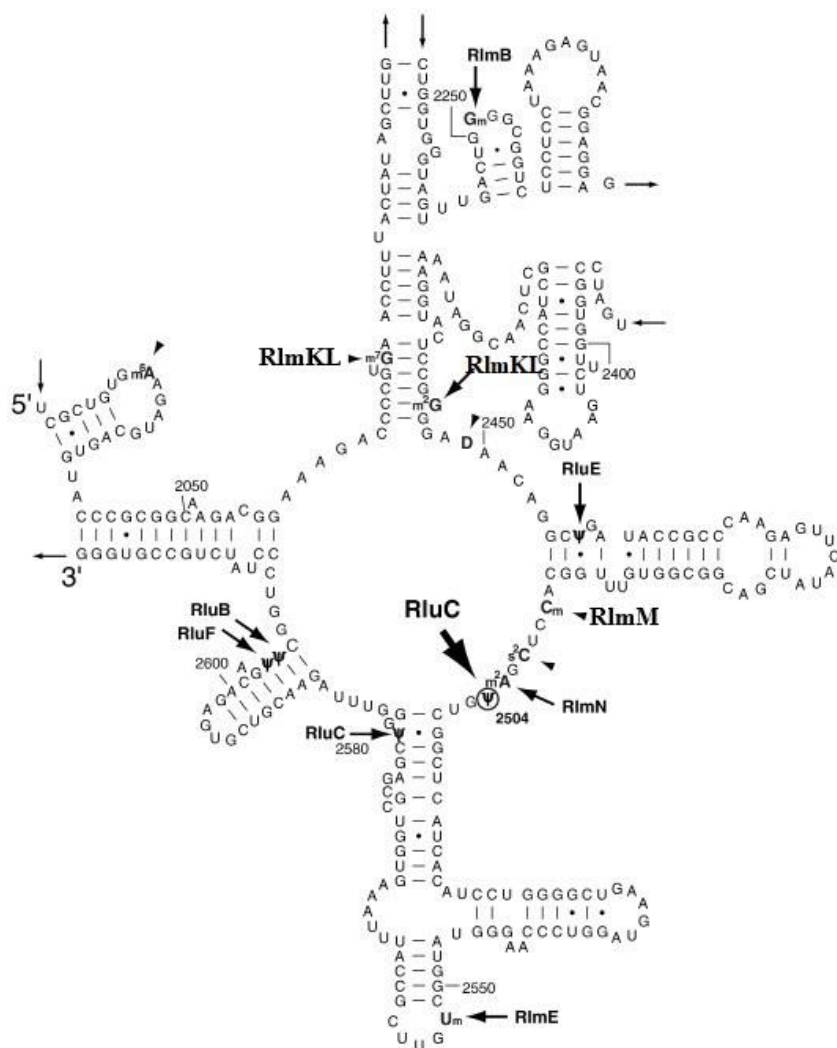
1.7. Pseudouridiin süntaasid

E.colis on pseudouridiinid sünteesitud saidispetsiifiliste ensüümide kaudu, mida nimetatakse pseudouridiini süntaasideks (Ofengand et al., 2001). Pseudouridiini süntaasid klassifitseeritakse kuude perekonda, tuginedes nende ühistele motiividele, mis on nimetatud tüüpiliste ensüümide järgi: RluA, RsuA, TruA, TruB, TruD ja Pus10 (Tillault et al., 2018). Lisaks on konserveerunud katalüütilisele domeenile mitmetel pseudouridiini süntaasidel täiendavaid N- või C-terminaalseid domeene, mis on seotud nende RNA substraatide ära tundmisega. Mõned pseudouridiini süntaasid on suunatud mitmele uridiinile (RluC, RluD) ülejäänud ensüümid modifitseerivad ainult ühe sihtmärk uridiini; see kehtib kõigi RsuA perekonna liikmete kohta, nimelt RsuA, RluB, RluE ja RluF (Tillault et al., 2018).

1.8. Metüültransferaasid

Ribosomaalse RNA metüleerimist viivad läbi spetsiifilised ensüümid ehk metüültransferaasid, millest igäüks vastutab tavaliselt ühe või mõnikord kahe spetsiifilise nukleotiidi eest (Sergiev et al., 2018). Kui pseudouridiini süntaasid on tavaliselt spetsiifilised ühe uridiini või piiratud hulga uridiinide suhtes, millel on sarnane struktuuriline taust (üheks erandiks on RluC, millel on 3 sihtmärk uridiine), siis rRNA metüültransferaasid on substraadi äratundmisel veelgi rangemad ja tihti nõuab iga nukleotiidi metüleerimine kindlat ensüümi (Purta et al., 2008).

1.9. 23S rRNA V domeeni pseudouridiini süntaasid



Joonis 5. *E.coli* 23S rRNA V domeeni metüültransferaasid ja pseudouridiin süntaasid. Joonisel nooltega on näidatud nimetused ja katalüüsiva modifikatsiooni asukoht. Joonis on kohandatud artiklist Toh & Mankin, 2008.

23S rRNA V domeeni 5 pseudouridiini moodustamiseks on vaja 4 erinevat ensüümi: RluB (Ψ 2605), RluE (Ψ 2457), RluF (Ψ 2604), RluC (Ψ 955, Ψ 2504, Ψ 2580) (Del Campo et al., 2001)(Joonis 5).

RluE

Escherichia coli pseudouridiini süntaas RluE toimib iseseisva, väga spetsiifilise ensüümina, moodustades positsioonis 2457 universaalselt konserveerunud pseudouridiini, mis paikneb peptidüültransferaasi keskel heeliks 89 (H89). RluE tunneb ära suure osa 23S rRNA-st, mis sisaldab nii H89 kui ka üheaahelalisi külgnevaid piirkondi, ning see seletab RluE substraadi suurt spetsiifilisust. RluE geeni deleteerimise mõju *E. coli* pooldumisajale temperatuuril 25 °C, 37 °C või 42 °C on puudulik (Tillault et al., 2018).

RluC

Vastupidiselt enamikule bakteriaalsetele rRNA-d modifitseerivatele ensüümidele, mis on suunatud ühele spetsiifilisele nukleotiidile, teisendab RluC 23S rRNA-s kolm uridiinjääki (positsioonides 955, 2504 ja 2580) pseudouridiinideks. RluC geeni deletsioon ei toonud fenotüübilist efekti (Mizutani et al., 2004)

RluB

RluB modifitseerib 23S rRNA-s uridiine positsioonis 2605, kuulub RsuA perekonda. Tüves, kus RluB oli elimiteeritud, kasvuhäired temperatuuridel 25 ° C, 37 ° C ja 42 ° C ei esinenud (Del Campo et al., 2001).

RluF

23S rRNA V domeeni modifikatsiooniensüüm, mis modifitseerib uridiini positsioonis 2604 ning samuti kui RluB kuulub RluF RsuA perekonda. On täheldatud, et ta võib modifitseerida ka vähesel määral uridiini positsioonis 2605 (Alian et al., 2009).

1.10. 23S rRNA V domeeni metüültransferaasid

23S rRNA V domeeni 6 metüülatsiooni moodustamiseks on vaja 5 erinevat ensüümi: RlmKL (m⁷G2069, m²G2445), RlmB (Gm2251), RlmM (Cm2498), RlmN (m²A2503), RlmE (Um2552) (Joonis 5).

RlmN

Modifikatsiooniensüüm RlmN kuulub radikaalse S-adenosüülmetioniini (SAM) ensüümide hulka, mida tuntakse kõige paremini adenosüüli 2503 (A2503) C2 metüülimise katalüüsimisega 23S rRNA V domeenis. Konserveerunud nukleotiid A2503 asub ribosoomi peptidüültransferaasi (PTC) tsentris (Sergeeva et al., 2015). C2 modifikatsioon ei ole hädavajalik, kuid on teada, et selle puudumine võib põhjustada veaohtriku fenotüüpi. See tähendab, et m²A-l on roll translatsiooni täpsuse kontrollil (Benítez-Páez et al., 2012; Schwalm et al., 2016). Metüleeritud A2503 interakteerub peptidüültransferaasi keskuses paljude ribosoomi liganditega (Sergeeva et al., 2015). RlmN on topeltspetsiifiline RNA metülaas, mis katalüüsib m²A modifikatsiooni nii rRNA-s kui ka tRNA-s (Benítez-Páez et al., 2012).

RlmE

Metüültransferaas RlmE vastutab 2`O-metüüluridiin modifikatsiooni eest positsioonis 2552 (Um2552) (Arai et al., 2015). Um2552 modifitseeritud nukleotiid on hästi konserveerinud kõikides eludomeenides, mis võib täheldada, et tal on ribosoomi funktsioneerimisel oluline roll (Widerak et al., 2005). Um2552 modifikatsioon asub A-lingus (heeliks 92) PTC lähedal, mis on kriitiliseks kohaks tRNA A-saidi sidumiseks ja transpeptidatsioonis (Arai et al., 2015; W. Wang et al., 2020). Δ RlmE tüvedel on täheldatud aeglane kasvufenotüüp (Caldas et al., 2000). RlmE inaktiveerimine põhjustab kõige drastilisemat kasvu aeglustumist võrreldes teiste rRNA modifitseeritud ensüümide knock-out'ist (Pletnev et al., 2020).

RlmKL

See metüültransferaas katalüüsib kaks erinevat RNA modifikatsiooni – G2069 (m^7G2069) ja G2445 (m^2G2445). RlmKL koosneb 702 aminohappejärgist ja neljast domeenist, kus nii N kui ka C terminaalised domäänid omavad metüültransferaasset aktiivsust. N-terminaalne domään katalüüsib m^2G2445 modifikatsiooni ning C-terminaalne m^7G2069 modifikatsiooni (K.-T. Wang et al., 2012). Vastava modifikatsioonienüümi puudumine põhjustab probleeme 50S subühiku assambleerumises (Kimura et al., 2012).

RlmM

Katalüüsib C2498 nukleotiidi 2`O metüleerimise (Guo et al., 2013). See modifikatsioon ilmub enne 50S subühiku assambleerimist. Δ RlmM tüvi näitas aeglasemat kasvu võrreldes metsiktüüpi rakkudega, mis tähendab, et RlmM modifikatsioonienüümi defekt viib suhteliselt aeglase kasvukiirusele (Punekar et al., 2012).

RlmB

RlmB vastutab Gm2551 modifikatsiooni eest. RlmB geeni deletsioon ei toonud ribosoomi assambleerumisele mingit efekti (Lövgren & Wikström, 2001).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada 23S rRNA V domääni modifitseeritud nukleotiidide rolli ribosoomide biogeneesil ja valgusünteesil.

Püstitati tööhüpootees, mille kohaselt 23S rRNA V domeeni modifikatsioonid osalevad ribosoomi biosünteesil ja on vajalikud valgusünteesi normaalseks funktsioneerimiseks.

Hüpooteesi kontrollimiseks viidi läbi järgmised katseseeriad:

1. Kasutati eelnevalt meie labori poolt konstrueeritud *E. coli* $\Delta 10$ tüve, milles on inaktiveeritud kõik 23S rRNA domääni V modifikatsiooniensüümide geenid. Individuaalsete modifikatsiooniensüümide rolli analüüsimiseks ekspresseeriti neid ükshaaval $\Delta 10$ tüve mudelsüsteemis *in trans*.
2. Analüüsiti tüvede kasvufenotüüpi ning ribosoomide profiili *in vivo*.

2.2. Materjal

Töös kasutatud *Escherichia coli* tüved ja plasmiid.

Plasmiid

Modifikatsiooniensüüme ekspresseerivad plasmiidid olid konstrueeritud A. Liiv'i poolt. pHBT plasmidi (Lilleorg et al., 2017) olid kloneeritud ükshaaval 23S rRNA V domeeni modifikatsiooniensüümide geenid. pHBT plasmiid on madala koopiaarvuga (3-5 koopiat raku kohta). Plasmiid sisaldab *tac* promootorit, mis on *trp* ja *lac UV 5* promootori hübriid ning mida iseloomustab mõõdukalt tugev ekspressioon. Plasmidi replikatsiooni alguspunktiks on pCS101origin. Selektiivmarkeriks on kloroamfenikool.

Konstrueeritud tüved on esitatud tabelis 1.:

Tabel 1. Töös kasutatud E.coli tüved

Nimetus	Genotüüp	Allikas
MG1655	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1	(Blattner et al., 1997)
MG1655 Δ 10	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1 Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn	
MG1655 Δ 10+RluC	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-, Δ rlue, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT- rluc(cam ^r)	
MG1655 Δ 10+RluE	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT-rluE (cam ^r)	
MG1655 Δ 10+RluB	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT-rluB (cam ^r)	
MG1655 Δ 10+RlmE	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT-rlmE (cam ^r)	
MG1655 Δ 10+RlmM	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmm, pHBT-rlmM (cam ^r)	

MG1655 $\Delta 10$ +RlmB	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rluf, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT-rlmB (cam ^r)	
MG1655 $\Delta 10$ +RluF	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rlmkl, Δ rlmn, pHBT-rluF (cam ^r)	
MG1655 $\Delta 10$ +RlmKL	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmn, pHBT-rlmKL (cam ^r)	
MG1655 $\Delta 10$ +RlmN	F-, lambda-, rfb-50, ilvG-, rfb-, rph-1, Δ rlue, Δ rluc, Δ rlub, Δ rlme, Δ rlmm, Δ rlmb, Δ rluf, Δ rlmkl, pHBT-rlmN (cam ^r)	

Tabel 2. Kasutatud söötmed.

Sööde	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	Pärmiekstrakt 1%, trüptoon 1,6%, NaCl 0,5%	(Sambrook ja Russel, 2001)
M9	Vesi, M9 soolad (5X), glükoos 20%, 1 M MgSO ₄ , 1 M CaCl ₂	(Sambrook ja Russel, 2001)
LB	Pärmiekstrakt 0,5%, trüptoon 1%, NaCl 0,5%	Bertani, 1951

Söötmetele lisati vastavalt kasutatava plasmidi resistentsusele antibiootikum kloramfenikool (CAM) lõppkontsentratsioonis 15 µg/ml.

Tabel 3. Kasutatud puhvrid.

Puhver	Koostis
Tris, pH 7,5	6.05 g of Tris alust (base), destilleeritud vesi, HCl

2.3. Metoodika

2.3.1. *E.coli* tüvede konstrueerimine

Kompetentsete rakkude tegemiseks külvati *E.coli* Δ10 tüvi LB vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö 37°C juures loksutis. Üleöö kultuurist valmistati 50x lahjendus 2ml LB vedelsöötmesse ja kasvatati kuni OD ≈ 600 (umbes 3 tundi). Rakud koguti tsentrifugimise teel 4000 rpm 5 minutit, +4°C juures (lauatsentrifuug Heraeus Biofuge Fresco), misjärel sööde eemaldati rakusademelt. Rakud suspendeeriti 1ml RF1-s ning hoiti 10 minutit jääl. Pärast tsentrifugiti rakud 5 minutit 4000rpm, +4°C juures (Heraeus Biofuge Fresco) ning eemaldati rakusademelt RF1. Järgmiseks sammuks lisati 400µl RF2.

Transformatsiooniks lisati kompetentsetele rakkudele plasmid, mis sisaldas meid huvitavat geeni (tabel 4) ning inkubeeriti jääl 15 minutit. Peale inkubatsiooni tehti rakkudele kuumašokk ühe minuti vältel, temperatuuril +42°C. Järgnevalt jahutati rakke 5 minutit jääl. Peale jää inkubeerimist lisati 1,5 ml 2xYT söödet ja inkubeeriti loksutil 45 minutit, temperatuuril +37°C. Saadud tüved külvati kloramfenikooli (15µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeeriti üleöö +37°C.

Tabel 4. Tüvede konstrueerimisel kasutatud 23S rRNA V domeeni modifikatsiooniensüümid ja millise modifikatsiooni nad teevad.

Modifikatsiooniensüüm	Modifikatsioon
RluE	Ψ
RluC	Ψ
RluB	Ψ
RluF	Ψ
RlmE	Um

RlmM	Cm
RlmB	Gm
RlmKL	m ² G, m ⁷ G
RlmN	m ² A

2.3.2. Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosigradiendis

Üleöö kasvatatud rakukultuurid (2ml) inokuleeriti värskesse 100ml 2xYT vedelsöötmesse ning kasvatati 2-4 tunni jooksul, kuni optilise tiheduseni vahemikus 0,7-1,0 (eksponentsiaalne kasvufaas). Rakud koguti tsentrifugimise teel tsentrifuugis (Hettich Rotina 420) 15 minutit 4000 rpm. Sööde eemaldati ja rakud suspendeeriti 1ml 1x OV-10 (+21µl βMER) puhvrts. Suspendeeritud rakkudele lisati 0,5 ml klaaskuulikesi, 4µl DNAasi (10U/ml). Rakkude lüüsimiseks kasutasin Precellys24 Tissue Homogenizer masinat, tsükli arvuks on 3. Masin töötas 60 sekundit ja 60 sekundit paus ühe tsükli kohta, +4°C juures.

Järgmiselt tsentrifugiti rakukestad põhja 15 minutit 5000 rpm, 4°C kraadi juures. Rakulüsaat kanti suhkrugradiendile ja ultracentrifugiti 15 tundi ja 42 minutit kiirusel 22000 rpm ($\omega^2 t = 3, \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$), temperatuuril +4°C, kasutades *Beckman Coulter L90K* ultracentrifuugi. *Beckman Coulter L90K* rootoriks oli SW-28 rootor. Ribosoomid olid lahutatud 30% ja 10% suhkrugradiendis. Katse korduste arvuks on 3 (kahe tüve puhul 2 - Δ10+RlmM, Δ10+RluF).

Ribosoomide partiklite visualiseerimiseks kasutati Heidolph Pumpdrive 5201 pumpa (4,0ml/min), GE Healthcare Monitor UVis-920 läbivoolu -spektrofotomeetrit (tundlikkus 02,00 mm) ja GE Healthcare rec 112 isekirjutajat (kiirus 20 mm/s).

Ribosoomi profiilide kvantitatiivseks analüüsiks olid gradiendipildid digitaliseeritud kasutades Wacom graafikalauda ja CorelDraw X8 programmi. Digitaliseeritud ribosoomide profiilid olid edaspidi töödeldud ImageJ arvutiprogrammis („polygon selection“ ja „analyze“). 70S, 50S ja 30S fraktsioonide piikide pindala määramiseks kasutati ImageJ programmi.

2.3.3. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniaja määramine

Üleöökultuuridest oli tehtud 1000-kordne lahjendus mikrotiiterplaadi – igasse kaevu pipeteeriti 120 µl söödet (2xYT või M9) ja 1µl rakukultuuri 1000 kordset lahjendust. Üleöökultuurile lisati antibiootikumi kloroamfenikool. Kasvukiiruse analüüsil pärast 1000-kordset lahjendust antibiootikumi ei lisatud, selleks et elimineerida kõrvalefekte, mis võivad olla seotud antibiootikumi toimega rakkudele. Rakukultuuri OD₆₀₀ mõõdeti 96 kaevuga plaadil mikroplaadilugejas BMG Labtech POLARstar Omega. Rakke kasvatati 20-40 tunni

jooksul, kus iga 7 minutit mõõdeti rakkude optiline tihedus (A_{600}), programmi loksutamiskiiruseks oli 500 rpm, ja loksutamisrežiim oli „orbitaal“. Kõik bakterikultuurid olid kasvatatud 4 bioloogilises ja 2 tehnilises kordustes. Katseid teostati rikas (2xYT) ja minimaalsöötmes (M9 ilma aminohapeteta) 30°C ja 37°C kraadi juures.

Generatsiooniaja määramiseks kasutati BMG Labtech POLARstar Omega saadud tulemused (optilised tihedused). Mõõtmistulemused olid töödeldud Exceli keskkonnas järgmiselt: mõõtmistulemustest oli lahutatud foon (fooniks oli puhta sööde optiline tihedus); lahutatud fooniga tulemustest võetud logaritmi alusega 2; nendest arvudest saadud lineaarne tõusu („slope“) pöördväärtus on pooldumisaeg. Tüvede pooldumisaegade alusel arvatati generatsiooniaja keskvaartused ja kõikumisvead („stdev“).

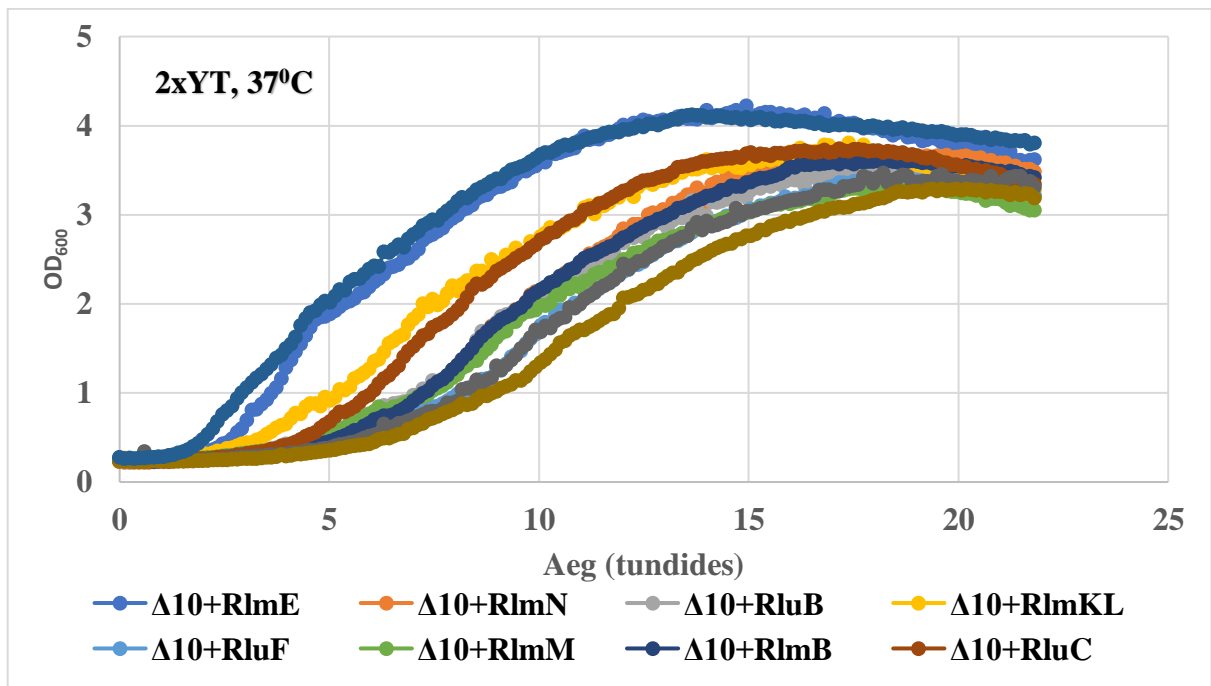
2.4. Tulemused ja arutelu

2.4.1. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniaja määramine

Selleks, et uurida 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide rolli, kasutati $\Delta 10$ tüve, millest oli deleteeritud kõik teadaolevad V domeeni modifikatsiooni kodeerivad geenid. Ükshaaval viidi modifikatsiooniensüüme kodeerivad geenid tagasi kasutades madala koopiaarvuga ekspressiooni vektorit. Selleks, kasutasin madala koopiaarvuga plasmide (pHBT), et vältida liiga tugevast üleekspressioonist tulenevaid võimalikke kõrvalefekte. Kõik tüved olid kasvatatud nii rikkas kui ka toitainetevaeses vedelsöötmes ning edaspidi oli hinnatud rakkude kasvufenotüüp.

2.4.1.1. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniaja määramine rikas keskkonnas

Käesoleva töö esmase eksperimendi käigus analüüsiti üksikute modifikatsioonide mõju rakkude kasvufenotüübile, kus rakendasin rakkude kasvuks soodsat keskkonda (rikas sööde-2xYT, 37°C juures). Analüüsitud kultuuride kasvukõverad on esitatud joonisel 6, kus igast tüvest on näidatud 1 kasvukõver.



Joonis 6. $\Delta 10$ tüve variantide kasvukõverad rikas söötmes 37°C juures. Üleöökultuurist (2xYT, 37°C) tehti 1000 kordne lahjendus värskesse 2xYT söötmesse. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti 21 tunni ja 48 minuti jooksul iga 7 minuti järel mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR. Joonise x-teljel on aeg tundides ja y-teljel optiline tihedus (A_{600} nm). Kõiki tüvesid kasvatati 4 bioloogilises ja 2 tehnilises korduses. Joonisel on näidatud üks iga tüve iseloomustav kasvukõver.

Uuritavad tüved, mis olid kasvatatud soodsates tingimustes, võib jagada 3 gruppi:

1. MG1655 ja $\Delta 10 + \text{RlmE}$
2. $\Delta 10 + \text{RluC}$ ja $\Delta 10 + \text{RlmKL}$
3. $\Delta 10 + \text{RlmN}$, $\Delta 10 + \text{RlmB}$, $\Delta 10$, $\Delta 10 + \text{RlmM}$, $\Delta 10 + \text{RluB}$, $\Delta 10 + \text{RluE}$ ja $\Delta 10 + \text{RluF}$.

Neid grappe eristab eelkõige *lag*-faasi pikkus. Esimese rühma puhul on tegemist lühikese *lag*-faasiga, mis on iseloomulik kontrolltüvele MG1655 (1-2h) (joonis 6) ning iseloomustab eelkõige kiiret rakkude kasvu. Teisel grupil oli, võrreldes esimesega, väike vahe *lag*-faasi pikkuses (2,5-4h) ehk rakkudel kuulus kauem aega selleks, et valmistada end paljunemiseks. Kolmandat grupi iseloomustab oluliselt pikenenud *lag*-faas (kuni 6h), mis viitab sellele, et nende tüvede puhul nõuab üleminek statsionaarsest kasvufaasist kiirele kasvule märkimisväärselt rohkem aega, võrreldes esimese ja teise grupiga. Kompensatsioonitüvedest taastas $\Delta 10$ tüve kasvu kõige efektiivsemalt valgu RlmE ekspressioon (joonis 6). RlmE valgu funktsioone on viimastel aastatel põhjalikult uuritud ning on näidatud selle olulisust ribosoomide biogeneesil (Arai et al., 2015). Meie katseandmed on kooskõlas senimaani avaldatud töödega RlmE rolli kohta *E. coli*'s. Teiste tüvevariantide üleekspressiooni puhul pigem vähene või meie katsetingimustes mitte detekteeritav mõju bakteriraku kasvule ($\Delta 10 + \text{RluC}$, $\Delta 10 + \text{RlmKL}$, $\Delta 10 + \text{RluE}$, $\Delta 10$, $\Delta 10 + \text{RlmN}$, $\Delta 10 + \text{RluB}$, $\Delta 10 + \text{RlmM}$,

$\Delta 10 + RlmB$, $\Delta 10 + RluF$). Kasvuandmete põhjal arvatud generatsiooniajad on ära toodud tabelis 5.

Tabel 5. Kompensatsioonitüvede pooldumisajad rikkas söötmes 37C juures.

	Tüvi	Pooldumisaeg (minutites) \pm st.viga
1.	$\Delta 10 + RlmE$	22,3 \pm 1,6
2.	MG1655	26 \pm 1,3
3.	$\Delta 10 + RluC$	42,9 \pm 3.0
4.	$\Delta 10 + RlmKL$	44,3 \pm 2.3
5.	$\Delta 10 + RlmB$	48,5 \pm 3.4
6.	$\Delta 10 + RlmN$	52,8 \pm 3.7
7.	$\Delta 10 + RlmM$	58,1 \pm 3.3
8.	$\Delta 10 + RluE$	58,2 \pm 4.4
9.	$\Delta 10 + RluB$	63,8 \pm 3.7
10.	$\Delta 10 + RluF$	65,6 \pm 4.5
11.	$\Delta 10$	70,1 \pm 4.0

Rakke kasvatati rikkas keskkonnas (37⁰C, 2xYT) mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR, programmi loksutamiskiiruseks oli 500 rpm, loksutamisrežiimiks -,orbitaal“. Tabelis on esitatud 4 sõltumatu mõõtmiste keskmine koos standartveaga.

Katseandmete statistilisel analüüsil rakendasin T-test'i 95% usaldusväärsusega.

Katsetulemused näitavad, et kõige kiirema pooldumisajaga (22,3 minutit) oli $\Delta 10 + RlmE$ ja MG1655 tüvi, mille generatsiooniajad on vastavalt 22,3 ja 26 minutit (tabel 5). Seega võime väita, et antud tingimustes piisab ainult RlmE modifikatsiooniensüümi ekspressioonist, et kompenseerida $\Delta 10$ tüve modifikatsioonide puudumisest tulenevat kasvudefekti.

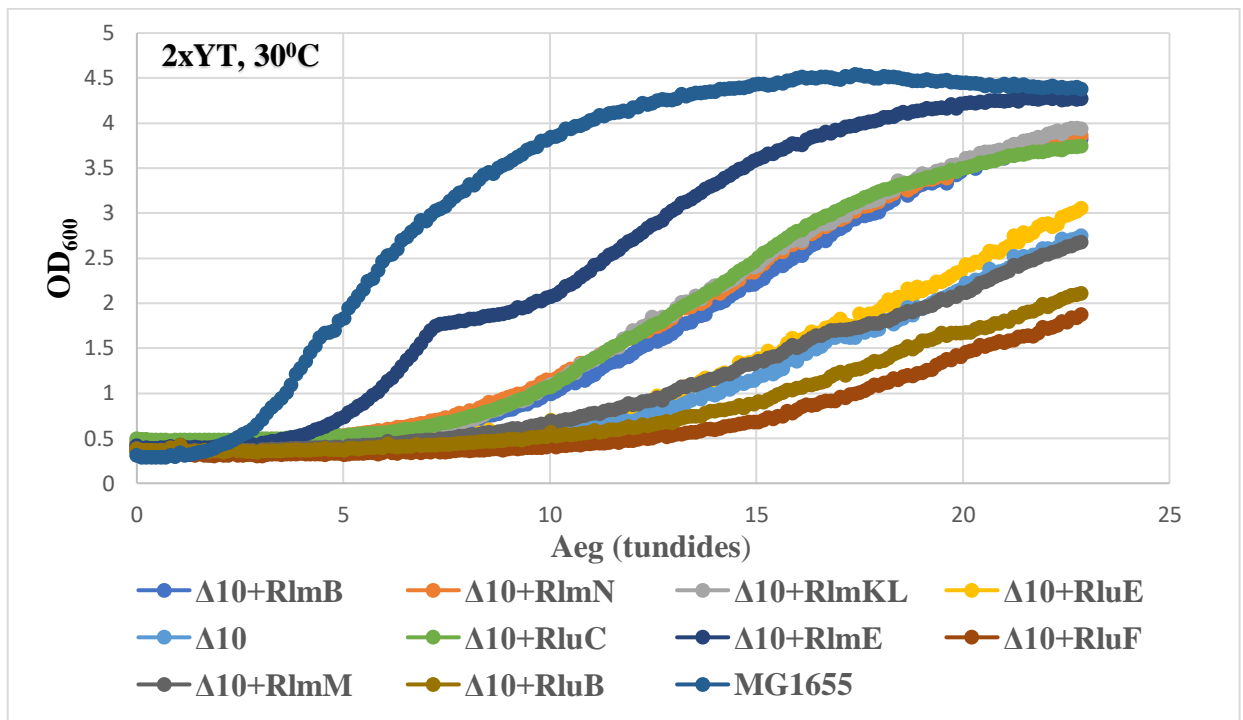
Teise grupi tüvede puhul ($\Delta 10 + RluC$, $\Delta 10 + RlmKL$, $\Delta 10 + RlmB$) jääb bakteripopulatsiooni pooldumisaeg vahemikku 42-49 minutit (tabel 5), kus $\Delta 10 + RluC$ ja $\Delta 10 + RlmKL$ keskvärtused on statistiliselt sarnased usaldusnivool 0,05. Samuti $\Delta 10 + RlmKL$ ja $\Delta 10 + RlmB$ keskvärtused on sarnased. Neid kolme tüve grupeerides omavahel võiks täheldada, et antud modifikatsiooniensüümid mõjutavad bakteri kasvu sarnasel määral ehk need omavad kasvukiirusele 37⁰C juures sarnaselt mõõdukalt kompenseeritavat efekti.

$\Delta 10+RlmN$, $\Delta 10+RlmM$, $\Delta 10+RluE$ tüvesid iseloomustab pikem pooldumisaeg võrreldes esimese ja teise grupi vahel, see jääb vahemikku 52-59 minutit (tabel 5). Keskmise pooldumisaja keskvärtus t-testi järgi ei erine nii $\Delta 10+RlmN$ ja $\Delta 10+RlmM$ kui ka $\Delta 10+RlmM$ ja $\Delta 10+RluE$ tüvede vahel ($\alpha < 0,05$). Võiks arvata, et nende modifikatsiooniensüümide tagasiviimine raku soodustas kasvukiirust, kuid aga vähesel määral.

Kõige aeglasema generatsiooniajaga on $\Delta 10$ tüvi (70,1 minutit), kuid samuti keskvärtuse uurimise käigus selgus, et $\Delta 10+RluF$ ja $\Delta 10$ tüvede keskmised pooldumisajad omavahel ei erine. $\Delta 10+RluF$ ja $\Delta 10+RluB$ pooldumisajad samuti statistiliselt oluliselt ei erine usaldusnivool 0,05. Kõiki neid tüvesid iseloomustab pikk pooldumisaeg, vahemikus 63-71 minutit (tabel 5). Kui võrrelda $\Delta 10$ tüve, kus on inaktiveeritud kõik katsetes uuritud modifikatsiooniensüümide geenid ja $\Delta 10+RluF$ ja $\Delta 10+RluB$ valkude üleekspressiooni tüvesid, siis olulist erinevust nende tüvede kasvufenotüübis antud tingimustes ei täheldatud.

Modifikatsiooniensüümid on konserveeritud peaaegu kõikides eludomeenides, mis tähendab, et need modifikatsioonid võiksid kuidagi vajalikud olla rakkude normaalseks elutegevuseks, kuna neid pole evolutsiooni käigus elimineeritud. Samas tuleb meeles pidada, et rakkudele väga soodsaid „laboritingimusi“ (37°C, toitainerikas kasvukeskkond) looduses peaaegu ei esine või esineb väga lühiajaliselt ja harva. Seega peavad bakterid kohamena, elama ja paljunema suurema osa ajast ebasoodsates ehk stressi tingimustes. Lähtudes sellest analüüsi järgnevalt $\Delta 10$ kompensatsioonitüvede kasvu mõõdukalt ebasoodsates tingimustes.

Esmalt rakendati üksikute modifikatsiooni mõjude uurimiseks rakkude kasvule soodsat, kuid külmemat keskkonda (rikas sööde - 2xYT, 30°C juures). Mõõdetud kasvukõverad on esitatud joonisel 7, kus igast tüvest on näidatud 1 iseloomulik kasvukõver.



Joonis 7. Transformeeritud tüvede kasvukõverad rikas söötmes 30 °C juures. Üleöökultuurist (2xYT, 30 °C) tehti 1000 kordne lahjendus uue 2xYT söötmesse. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti 22 tunni ja 52 minuti jooksul iga 7 minuti järel mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR. Joonise x-teljel on aeg minutites ja y-teljel optiline tihedus (600 nm). Kõik bakterikultuurid olid kasvatatud 4 bioloogilises ja 2 tehnilises korduses. Joonisel on näidatud üks iga tüve iseloomustav kasvukõver.

Nii 37⁰ C kui ka 30⁰ C kultiveeritud bakterikultuuride kasvukõveratel esinevad suhteliselt sarnased grupid:

1. MG1655
2. Δ10+RlmE
3. Δ10+RlmN; Δ10+RluC, Δ10+RlmB, Δ10+RlmKL
4. Δ10; Δ10+RlmM; Δ10+RluE; Δ10+RluB; Δ10+RluF

Esimese grupi iseloomustab kiire kohanemisfaas – 1,3 tundi (joonis 7). Teise grupi puhul on *lag*-faas 3,3 tundi, ehk siis 2,5 korda pikem võrreldes metsiktüüpi tüvega. Kolmanda grupi *lag*-faas on vahemikus 5-6 tundi. Viimase rühma iseloomustavad kõige pikemad kohanemisfaasid, vahemik 7-10 tundi (joonis 7). Katse tulemused näitavad, temperatuuri alandamine 7 kraadi võrra mõjutas olulisel määral nii *lag*-faasi pikkust kui ka kasvukõverate üldist pilti. Ainuke rakupopulatsioon, mis sai uute tingimustega samahästi kui 37 °C juures hakkama on MG1655 metsiktüüpi rakud. Kõige suuremat positiivset mõju omas taas RlmE üleekspressioon, kus Δ10+RlmE tüve kasvukiiruse muutus oli võrreldes Δ10 tüvega kõige suurem, *lag*-faas lühenes 7 tunnist 3-ni (joonis 7).

Teistel uuritud Δ10 tüve variantidel on üleekspressioonist tulenev kompenseeriv efekt kas minimaalne või puudub.

Tabel 6. Kompensatsioonitüvede pooldumisajad rikkas söötmes 30°C juures.

	Tüvi	Pooldumisaeg (minutites) ± st.viga
1.	MG1655	44,49 ± 4,22
2.	Δ10+RlmE	74,33 ± 2,80
3.	Δ10+RlmKL	137,10 ± 2,28
4.	Δ10+RluC	148,99 ± 3,32
5.	Δ10+RlmB	156,03 ± 1,09
6.	Δ10	163,68 ± 2,82
7.	Δ10+RlmN	170,36 ± 2,68
8.	Δ10+RluF	179,43 ± 3,40
9.	Δ10+RluE	195,57 ± 9,60
10.	Δ10+RlmM	209,99 ± 4,74
11.	Δ10+RluB	221,31 ± 9,20

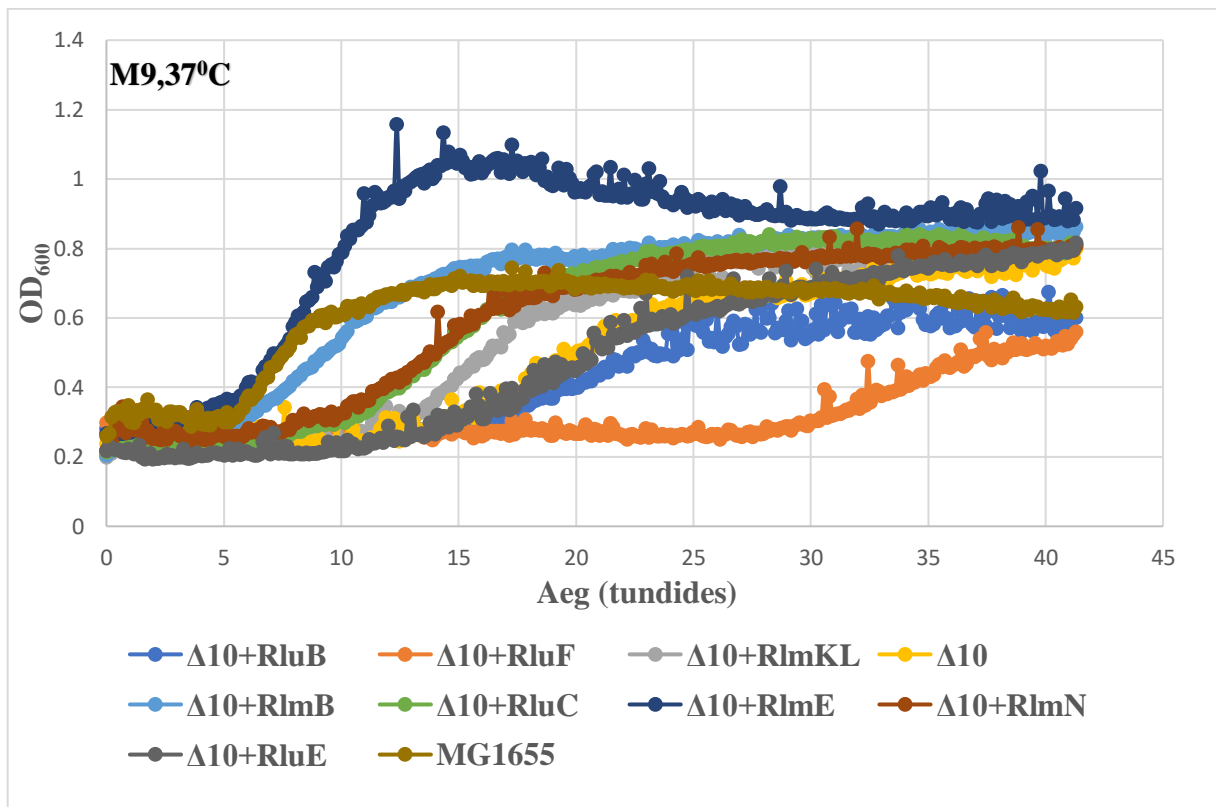
Rakke kasvatati rikas keskkonnas (30°C, 2xYT) mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR, programmi loksutamiskiiruseks oli 500 rpm, loksutamisrežiimiks -,orbitaal^o. Tabelis on esitatud 4 sõltumatu mõõtmiste keskmine koos standartveaga.

Katsete tulemused näitavad et aeg, mis kuulub rakupopulatsiooni kahekordistamiseks on oluliselt suurenenud nii Δ10 tüve variantide kui ka metsiktüve puhul. See tähendab, et uute tingimustega kohaneda ja populatsiooni kasvatada oli raske kõikide uuringus osalevate rakkude jaoks. Kiireim generatsiooniaeg on MG1655 tüvel – 44,49 minutit (tabel 6), mis võrreldes 37°C juures kultiveeritud MG1655 rakupopulatsiooniga on 2 korda pikem (vrd tabel 5, 6). Teisel kohal on Δ10+RlmE rakud, pooldumisajaga 74,33 minutit. Δ10+RlmE näitas kõige kiiremat kasvu 37°C juures, kuid ainult temperatuuri alandades oli tema generatsiooniaeg 3,5 korda pikem. Võrreldes teiste Δ10 tüvede variantidega, ainult Δ10+RlmE tüvel generatsiooniaeg on väiksem kui 100 minutit (tabel 6). Sellest lähtudes võiks järeldada, et ainult RlmE üleekspressioonil on oluline mõju rakkude kasvule 30°C juures. Teiste tabelis 6 esinevate rakkude pooldumisaeg on 2-3 korda aeglasem võrreldes 37°C juures kasvatatud rakkudest. Δ10 tüve pooldumisaeg on 163,68 minutit ning see asub tabelis 6.kohal, mis näitab, et tüvi ilma modifikatsiooniensüümideta saab hästi kasvada ja

paljuneda 30⁰C juures rikas söötmes. Kuuendast kohast ülejäänud tüvede ($\Delta 10+RlmN$, $\Delta 10+RluF$, $\Delta 10+RluE$, $\Delta 10+RlmM$, $\Delta 10+RluB$) generatsiooniajad on vahemikus 170-222 minutit (tabel 6) ning kuna nende pooldumisaeg on suurem kui $\Delta 10$ tüvel, võiks järeldada, et nende kuue modifikatsiooniensüümide sisseviimine taustsüsteemi ei anna bakterile mingi eelist kasvule. Kõige aeglasem populatsiooni pooldumisaeg on $\Delta 10+RluB$ tüvel – 221,31 minutit ning keksväärtuste uurimise käigus selgus, et $\Delta 10+RluB$ ja $\Delta 10+RlmM$ tüvede keskmised pooldumisajad omavahel ei erine (usaldusnivool 0,05) ehk nad mõlemad kuuluvad kõige aeglasema generatsiooniajaga tüvede hulka.

2.4.1.2. Bakterite kasvukõverad ja generatsiooniajad vaeses keskkonnas

Looduses bakterid puutuvad kokku soodsa keskkonnaga väga harva, nad on pidevalt konkurentsisis ja stressitingimustes. Kuna eelmine katseseeria viidi läbi toitainete rikkas kasvukeskkonnas, siis selleks, et paremini hinnata modifikatsiooniensüümide mõju looduses esinevas olukorras analüüsiti kasvu M9 minimaalsöötmes. Meie katsetes ei lisatud M9 söötmesse aminohappeid, selleks et peegeldada paremini looduses eksisteerivaid tingimusi (kõik vajalikud aminohapped sünteesitakse raku enda poolt). Minimaalsöötmes 37⁰C juures mõõdetud kasvukõverad on esitatud joonisel 8, kus igast tüvest on näidatud 1 iseloomulik kasvukõver.



Joonis 8. Transformeeritud tüvede kasvukõverad vaese söötmes 37°C juures. Üleökultuurist (M9, 37°C) tehti 1000 kordne lahjendus uue M9 söötmesse. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti 41 tunni ja 17 minuti jooksul iga 7 minuti järel mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR. Joonise x-teljel on o on aeg tundides ja y-teljel optiline tihedus (600 nm). Kõik bakterikultuurid olid kasvatatud 4 bioloogilises ja 2 tehnilises korduses. Joonisel on näidatud üks iga tüve iseloomustav kasvukõver.

Uurides bakterite kasvukõverate *lag*-faasi pikkust (joonis 8), jagati erinevaid tüve gruppideks:

1. Δ10+RlmE, MG1655, Δ10+RluC, Δ10+RlmB, Δ10+RlmN
2. Δ10+RlmKL, Δ10+RluE, Δ10, Δ10+RluB
3. Δ10+RluF

Esimest gruppi iseloomustab kiire *lag*-faasi pikkus, vahemikus 4-8 tundi (joonis 8). See aeg on hästi erinev rikal söötmel kasvatatud rakkude *lag*-faasist, kuid kuna rakud olid kultiveeritud vaeses söötmes, nendel on vaja rohkem aega selleks, et endale vajalikke aineid sünteesida.

Teise grupi kuuluvate tüvede *lag*-faas on vahemikus 12-16 tundi (joonis 8). Δ10 on ainuke tüvi, mille kasvukõveratel esinesid suured kasvukõikumised statsionaarses faasis (võrreldes kõikide teiste tüvede kõikumisi) ja selle grupis tema *lag*-faas oli kõige pikem – 16 tundi. Rakud ilma modifikatsiooniensüümideta (Δ10) kasvavad toitainetevaeses keskkonna tingimustes aeglaselt ja ebastabiilselt.

Viimase grupi kuulub 1 tüvi - $\Delta 10 + RluF$. Selle rakkude *lag*-faas oli pikim – 28 tundi (joonis 8). Huvitav on märgata, et selle tüve *lag*-faas oli aeglane ka rikkal söötmel, mis võiks tähendada, et selle mõju kasvufenotüübile on kas väike või üldse puudub, võiks väita, et seal esinevad probleemid ribosoomi sünteesiga.

Samuti katse ettevalmistamise käigus elimineeritud $\Delta 10 + RlmM$ tüvi, mis ei kasvanud M9 söötmes $37^{\circ}C$ juures.

Tabel 7. Kompensatsioonitüvede pooldumisajad minimaalsöötmel $37^{\circ}C$ juures.

	Tüvi	Pooldumisaeg (minutites) \pm st.viga
1.	MG1655	79,99 \pm 4,25
2.	$\Delta 10 + RlmKL$	132,27 \pm 5,11
3.	$\Delta 10 + RlmE$	136,20 \pm 5,86
4.	$\Delta 10 + RluC$	159,34 \pm 6,28
5.	$\Delta 10 + RlmB$	166,47 \pm 3,05
6.	$\Delta 10 + RlmN$	177,15 \pm 7,23
7.	$\Delta 10$	186,11 \pm 5,21
8.	$\Delta 10 + RluF$	212,59 \pm 4,73
9.	$\Delta 10 + RluE$	213,54 \pm 7,34
10.	$\Delta 10 + RluB$	268, 51 \pm 5,48

Rakke kasvatati vaeses keskkonnas ($37^{\circ}C$, M9) mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR, programmi loksutamiskiiruseks oli 500 rpm, loksutamisrežiimiks „*orbitaal*“. Tabelis on esitatud 4 sõltumatu mõõtmiste keskmine koos standartveaga.

Tüvede generatsiooniajad on veelgi suuremad võrreldes rikkal söötmel kasvatatud rakkude omadega. Katsetulemused näitavad, et kiirema pooldumisajaga on MG1655 tüvi – 79.99 minutit (tabel 3). See on ligi 1,8 korda aeglasem kui sama MG1655 tüve generatsiooniaeg $37^{\circ}C$ juures ja rikal söötmel (vrd tabel 5, 7). Teisel kohal on $\Delta 10 + RlmKL$ tüvi ning esimese ja teise positsiooni vahe tabelis on märkimisväärselt suur- üle 52 minutit (tabel 7). Kolmandal kohal on $\Delta 10 + RlmE$ tüvi ja keskväärtuste uurides, ei esine $\Delta 10 + RlmKL$ ja $\Delta 10 + RlmE$ tüvede

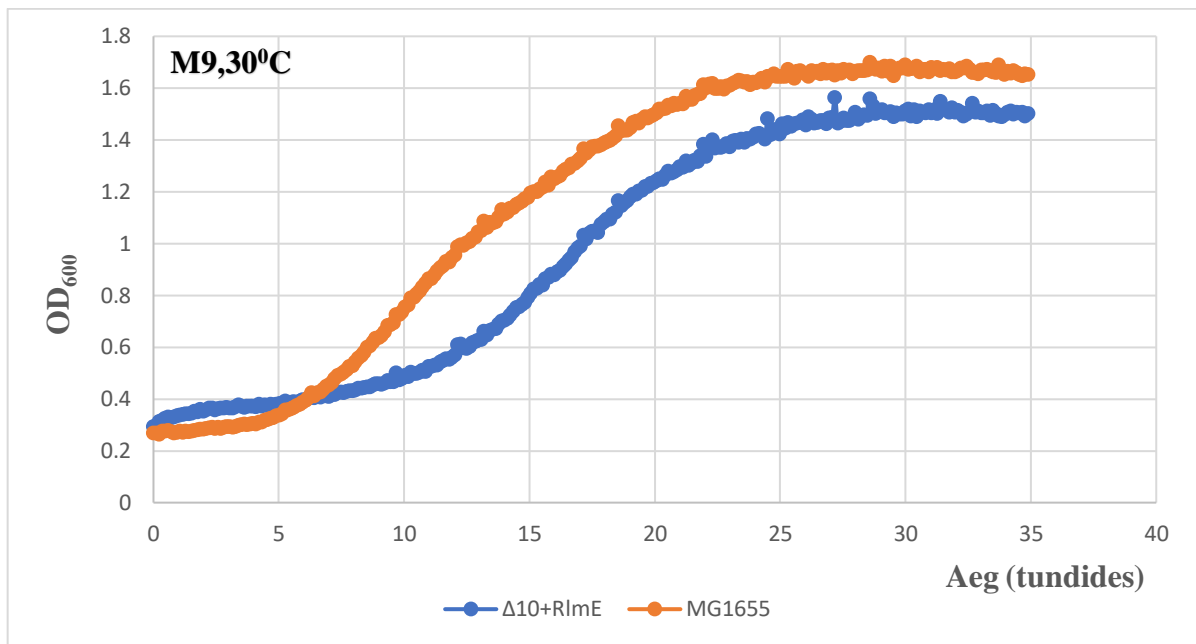
pooldumisaja vahel erinevust, seega võime lugeda nende generatsiooniaja sarnaseks. Samuti $\Delta 10+RluC$ ja $\Delta 10+RlmB$ generatsiooniaja keksväärtused oluliselt ei erine usaldusnivool 0,05. $\Delta 10+RlmB$ ja $\Delta 10$ tüvede pooldumisaja keskmised tulemused huvitaval kombel samuti ei erine omavahel. See kehtib ka $\Delta 10+RluF$ ja $\Delta 10+RluE$ tüvede vahel. Kõige aeglasema generatsiooniajaga on $\Delta 10+RluB$ tüvi – 268, 51 minutit, mis erineb eelviimasest tüvest 54,97 minutite võrra (tabel 7). Kuna selle katse tulemused on omavahel statistiliselt sarnased, siis võiks neid panna kokku gruppidesse järgmiselt:

1. MG1655
2. $\Delta 10+RlmKL$ ja $\Delta 10+RlmE$
3. $\Delta 10+RluC$ ja $\Delta 10+RlmB$
4. $\Delta 10+RlmN$ ja $\Delta 10$
5. $\Delta 10+RluF$ ja $\Delta 10+RluE$
6. $\Delta 10+RluB$

Nendest tulemustest lähtudes $\Delta 10+RlmKL$; $\Delta 10+RlmE$; $\Delta 10+RluC$; $\Delta 10+RlmB$ tüvede tagasiviimine taustsüsteemile omab efekti rakku kasvukiirusele. $\Delta 10+RlmE$ on teadaolevat kõige suurim mõju, kuna tema nii *lag*-faasi pikkused kui ka generatsiooniajad erinevatel tingimustel on kõikide teiste modifikatsiooniensüümide seast kõige kiiremad (vrd joonis 6, 7, 8; tabel 5, 6, 7). Ülejäänud $\Delta 10+RlmN$; $\Delta 10+RluF$; $\Delta 10+RluE$; $\Delta 10+RluB$ tüvedel mõju kasvukiirusele on väike või on üldse puudulik, kuna juba rikal söötmel nad näitasid pooldumisaja, mis on aeglasem kui $\Delta 10$ tüvel. Samuti tuleb märkida ka seda, et $\Delta 10$ tüvi saab ikka kasvada vaeses söötmes ja poolduda kiiremini kui mõned teised transformeeritud tüved.

Huvitav oli märgata, et $\Delta 10$ tüve pooldumisaeg oli mõne teise modifikatsiooniensüümiga tüve ($\Delta 10+RlmN$, $\Delta 10+RluF$, $\Delta 10+RluE$, $\Delta 10+RlmM$, $\Delta 10+RluB$) puhul kiirem. Sellise tulemuse põhjuseks võiks olla plasmidi tugev *tac* promootor. Kuna *tac* promootor on suhteliselt tugev, laboritingimustes loodud *lac* ja *trp* promootori hübriid, siis ei saa välistada võimalust, et modifikatsiooniensüümi toodetakse rohkem kui raku optimaalseks elutegevuseks on vaja. Ehk teisisõnu ei saa me välistada ensüümide üleproduksioonist tulenevaid kõrvalmõjusid. Kuna *tac* promootor ei ole looduslik promootor, vaid hoopis laboritingimustes loodud, siis ta võiks teha vigu.

Viimases katses rakendati üksikute modifikatsioonide mõju uurimiseks ebasoodsat keskkonda – M9 sööde ja 30°C. Saadud bakterite kasvukõverad on esitatud joonisel 9, kus igast tüvest on näidatud 1 kõver.



Joonis 9. Transformeeritud tüvede kasvukõverad vaese söötmes 30°C juures. Üleökultuurist (M9, 30°C) tehti 1000 kordne lahjendus uue M9 söötmesse. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti 34 tunni ja 52 minuti jooksul iga 7 minuti järel mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR. Joonise x-teljel on o on aeg minutites ja y-teljel optiline tihedus (600 nm). Kõik bakterikultuurid olid kasvatatud 4 bioloogilises ja 2 tehnilises korduses. Joonisel on näidatud üks iga tüve iseloomustav kasvukõver.

Viimane kasvufenotüübile suunatud katse näitas huvitavat tulemust. Kõikidest uuritavatest tüvedest olid M9 söötmes 30°C juures võimelised kasvama ainult metsiktüüpi MG1655 ja Δ10+RlmE kompensatsioonitüvi. Nende tulemuste põhjal võiks oletada, et temperatuuri alandades suureneb märkimisväärselt modifikatsioonide/modifikatsiooniensüümide roll raku füsioloogias, kuna Um2552 modifikatsiooni olemasolu taustsüsteemis muutis oluliselt Δ10 tüve kasvukiirust. On võimalik, et Δ10+RlmE on külmatundlik fenotüüp ning aitab rakkudel toime tulla külmemate tingimustega.

Teiste Δ10 variantide kasvu minimaalsöötmel ja 30°C ei saanud tuvastada ehk nendel võiks olla mingi teine roll ribosoomi biogeneesis. See aga milline, on praeguseks teadmata.

MG1655 tüvel on *lag*-faas sarnane võrreldes M9 söötmes ja 37°C juures oleva MG1655 *lag*-faasiga, umbes 4,7 tundi (vrd joonis 8, 9). Δ10+RlmE tüvel on *lag*-faas oluliselt pikkem – 9,8 tundi, aga ta on ainuke erinevate Δ10 variantide tüvedest, mis sai üldse kasvama.

Katsete tulemused näitavad meile, et modifikatsiooniensüümi RlmE olemasolu mõjutab märkimisväärselt rakkude kasvu. Samuti võiks eeldada, et RlmE modifikatsiooniensüüm aitab rakkudele stressitingimusi üle elada, kuna ilma selle ensüümideta ei saa rakud vaeses keskkonnas hakkama.

Tabel 8. Kompensatsioonitüvede pooldumisajad minimaalsöötmes 30°C juures.

	Tüvi	Pooldumisaeg (minutites) ± st.viga
1.	MG1655	69,31 ± 9,25
2.	Δ10+RlmE	265,30 ± 4,73

Rakke kasvatati vaeses keskkonnas (30°C, M9) mikrotiiterplaadi lugejas BMG POLARSTAR, programmi loksutamiskiiruseks oli 500 rpm, loksutamisrežiimiks -, *orbitaal*-. Tabelis on esitatud 4 sõltumatu mõõtmiste keskmine koos standartveaga.

MG1655 tüve pooldumisaeg on võrreldes minimaalsöötmes ja 37°C juures kasvatatud

MG1655 pooldumisajaga suhteliselt sarnased (vrd tabel 7,8). Δ10+RlmE rakkudel

pooldumisaeg on 265 minutit, mis on 1,94 korda pikem võrreldes samasuguse tüve

pooldumisajaga M9 söötmes ja 37°C juures ja 10 korda pikem Δ10+RlmE tüve

pooldumisajast rikas söötmes 37°C juures (vrd tabel 6,7,8) Kuna see tüvi oli ainuke uuritava

tüve esineja, mis sai 30 tunni jooksul kasvada, siis sellel on suur mõju rakkude kasvule ja

stressitingimustega kokku tulekuga.

Kasvukõverate võrdlus söötmetes: rikas 2xYT ja M9 näitab, et bakterikultuurid kasvavad

palju kiiremini rikas söötmes. M9 söötmete puhul suureneb oluliselt *lag*-faasi pikkus ja

väheneb bakterite kasvukiirus.

Kasvukõverate võrdlus temperatuurides: 37°C ja 30°C näitab, et temperatuuri alandades mõne

kraadi võrra mõjutab oluliselt nii rakkude kasvukiirust kui ka *lag*-faasi pikkust. Kui

bakteripopulatsioonid kasvasid vaeses M9 söötmes 37°C juures, siis temperatuuri muutes

30°C kraadini see oli bakterikultuuride jaoks liiga suur ja raske töö. Veelgi enam, suurem osa

Δ10 tüve variantidest ei olnud võimelised kasvama madalal temperatuuril ja vaeses

kasvukeskkonnas.

2.4.2. Ribosoomide analüüs in vivo

Üksikute modifikatsioonide tähtsust *in vivo* uuriti kasutades ribosoomide fraksioneerimist

sahharoosigradiendis. Antud meetodika võimaldab hinnata modifikatsioonide mõju 70S

ribosoomide moodustamisele. Käesolevas tööpunktis analüüsiti modifikatsioonide mõju

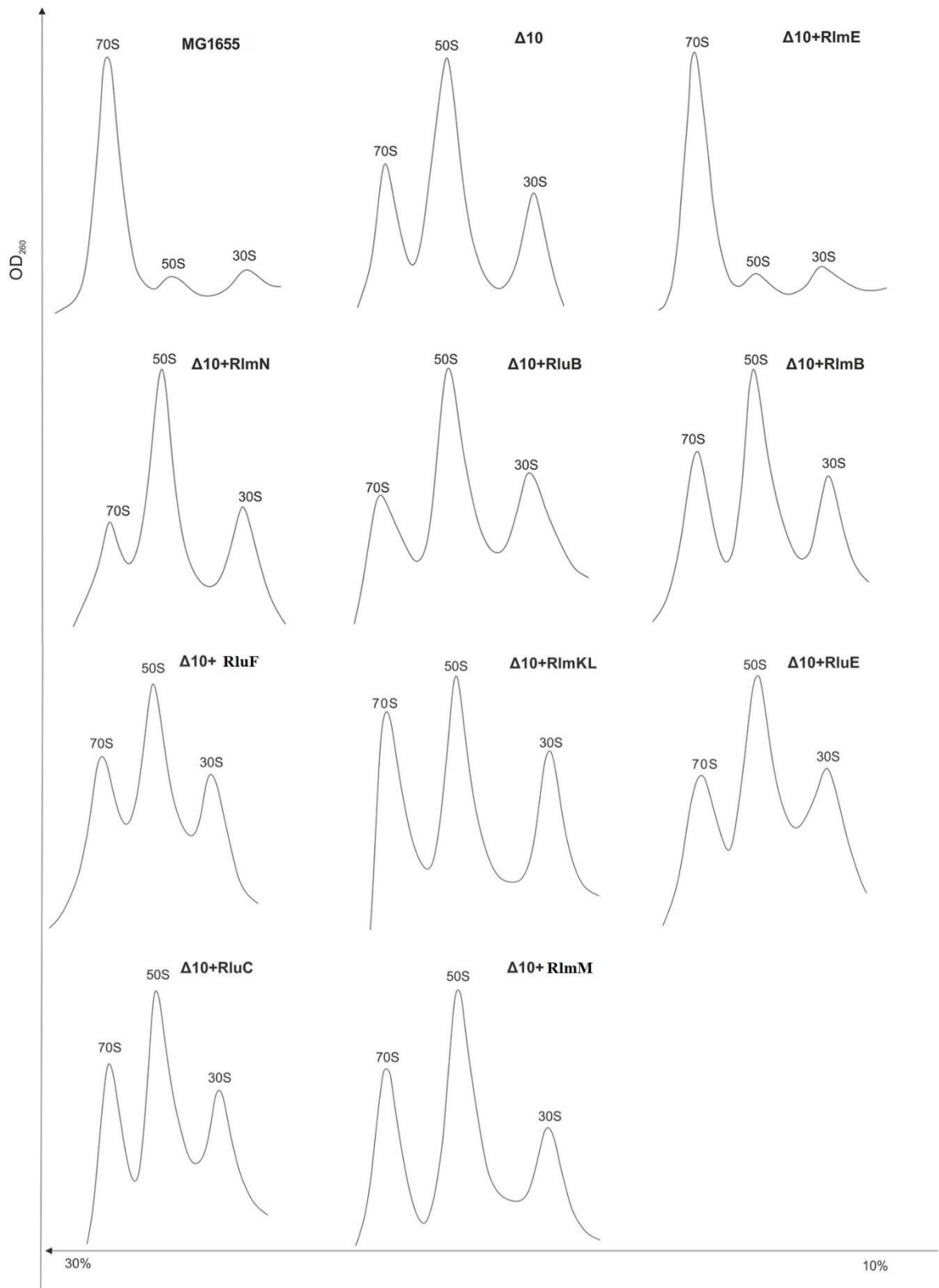
logaritmilises kasvufaasis, kus toimub intensiivne ribosoomide süntees.

Kiire kasvu tingimustes on rakkudes suures koguses translatsiooniliselt aktiivseid 70S

ribosoomide. Käesolevas katses hindasin kvantitatiivselt ribosoomiprofiili põhjal vabade

subühikute (50S, 30S) ja aktiivse 70S subühiku osakaalu rakus. Selleks, et uurida subühikute

vahelist jaotust, kasvatati rakukultuur eksponentsiaalsesse kasvufaasi kasutades selleks rikast söödet (2xYT) 37⁰C juures. Bakterid koguti eksponentsiaalses kasvufaasis tihedusel 0,7-1.0. Saadud rakukultuur lüüsi ja kanti suhkrugradiendile (10%-30%), täpsem meetod on kirjeldatud peatükis 2.3.2. Joonisel 10 on esitatud iga tüve kohta 1 iseloomustav gradiendiprofiil.



Joonis 10. $\Delta 10$ tüve variantide ribosoomide analüüs on in vivo. Uuritavad tüved olid kasvatatud rikas söötmes (2xYT) 370C juures tiheduseni A600 0,7-1,0. Rakud olid lüüsitud ja saadud rakulüsaat kantud 10%-30% sahharoosi gradiendile ning lahutatud ultratsentrifugimise teel (meetodi kirjeldus peatükis 2.3.2.). Joonisel on märgitud 70S, 50S, 30S subühikute asukohad ja sedimentatsiooni suund (vasakult paremale). Y-telg tähistab neelduvust (260nm juures) ja x-telg sedimentatsioonisuunda. Esitatud on ühe katseseria profiilid.

MG1665 tüvi iseloomustab metsiktüüpi profiili, kus valdav enamus subühikutest on 70S ribosoomides ja vabu subühikuid (50S, 30S) on väga vähesel määral (joonis 10). $\Delta 10$ tüvi, milles on inaktiveeritud kõik geenid, mis kodeerivad 23S rRNA V domeeni modifikatsioone näitab, võrreldes MG1665 tüvega oluliselt muutunud ribosoomiprofiili. $\Delta 10$ tüvel on drastiliselt vähenenud 70S ribosoomide hulk, samas kui vabade 50S ja 30S subühikute fraktsioon on suurenenud (joonis 10). Katsete tulemused on kooskõlas Ermo Leuska magistritöös (Ermo Leuska magistritöö 2019) esitatud $\Delta 10$ tüve ribosoomiprofiilide tulemustega. Vähenenud 70S ribosoomide ja suurenenud vabade subühikute hulk võiks tähendada, et $\Delta 10$ tüvel on probleeme 70S ribosoomide moodustamises ja teiseks sellel rakukultuuril on aeglane valgusüntees (Ermo Leuska magistritöö 2019).

Joonisel nr 10 on näha, et ainuke uuritav tüvi, mille ribosoomiprofiil on sarnane metsiktüüpi omaga on $\Delta 10 + RlmE$. Suurenenud on 70S ribosoomide hulk ja vähenenud on vabade (50S ja 30S) alaühite osakaal. MG1655 ja $\Delta 10 + RlmE$ puhul on subühikute vaheline stöhhiomeetria sarnane. Järelikult me võime väita, et modifikatsiooniensüümil RlmE on tõenäoliselt suur mõju ribosoomi küpsemisele ja subühikute kokkupanemisele. Samuti selline tulemus on heas kooskõlas $\Delta 10 + RlmE$ tüve kasvuanalüüsiga rikal söötmel ja 37°C juures, kus tüve kasvufenotüüp ja generatsiooniaeg on metsik-tüvega oluliselt sarnane (joonis 6, tabel 5).

Katses, kus ekspresseeriti modifikatsiooniensüümid RluC, RluB, RlmM, RluF, RlmB ja RlmN on täheldatud, et nende ensüümide tagasiviimine taustsüsteemi ($\Delta 10$ tüvesse) ei nähtud 70S ribosoomide moodustamisele kompenseerivat efekti *in vivo*. Antud tüvede ribosoomiprofiilid ei erinenud märkimisväärselt $\Delta 10$ tüve profiilist.

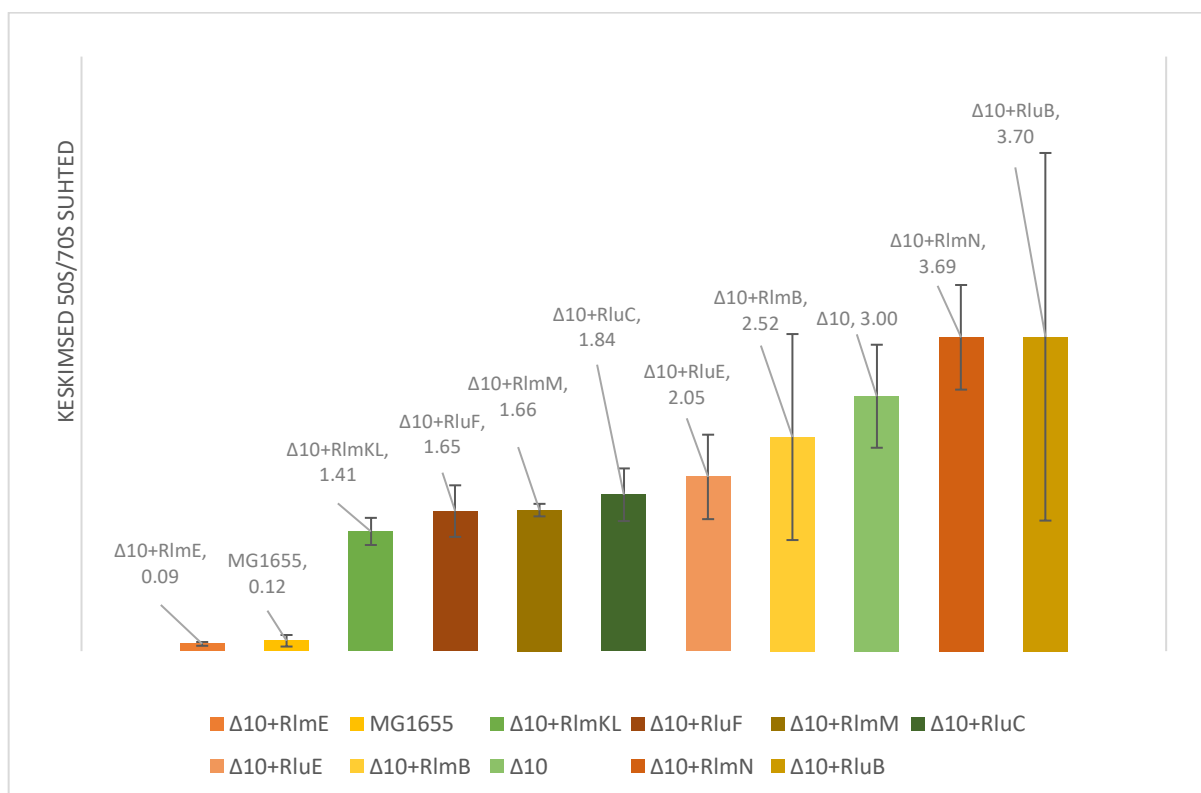
Joonisel 10 on näha, et $\Delta 10 + RlmKL$ tüve puhul on 70S ribosoomide moodustumine paranenud. Joonisel 11 selgub, et $\Delta 10 + RlmKL$ tüve 50S/70S suheks on 1,4:1 (tabel 9). Selline tulemus tähendab, et 50S subühiku osakaal on küll suurem 70S omast, kuid iseenesest jooniselt 10 on näha, et 70S ribosoomide hulk on suur. Nende tulemuste põhjal võime öelda, et RlmKL modifikatsiooniensüümil, mis metüleerib guanosiini positsioonis 2445 ($m^2 2445$) ja 2069 ($m^7 G2069$), võiks esineda mingi mõju ribosoomi assotsiatsioonile, kuid selle efekt on mõõdukas. Järgmiste katsete puhul võiks rakendada erinevaid kasvutingimusi, selleks et paremini hinnata RlmKL modifikatsiooni ($m^2 2445$, $m^7 G2069$) tähtsust 70S ribosoomi moodustamisel.

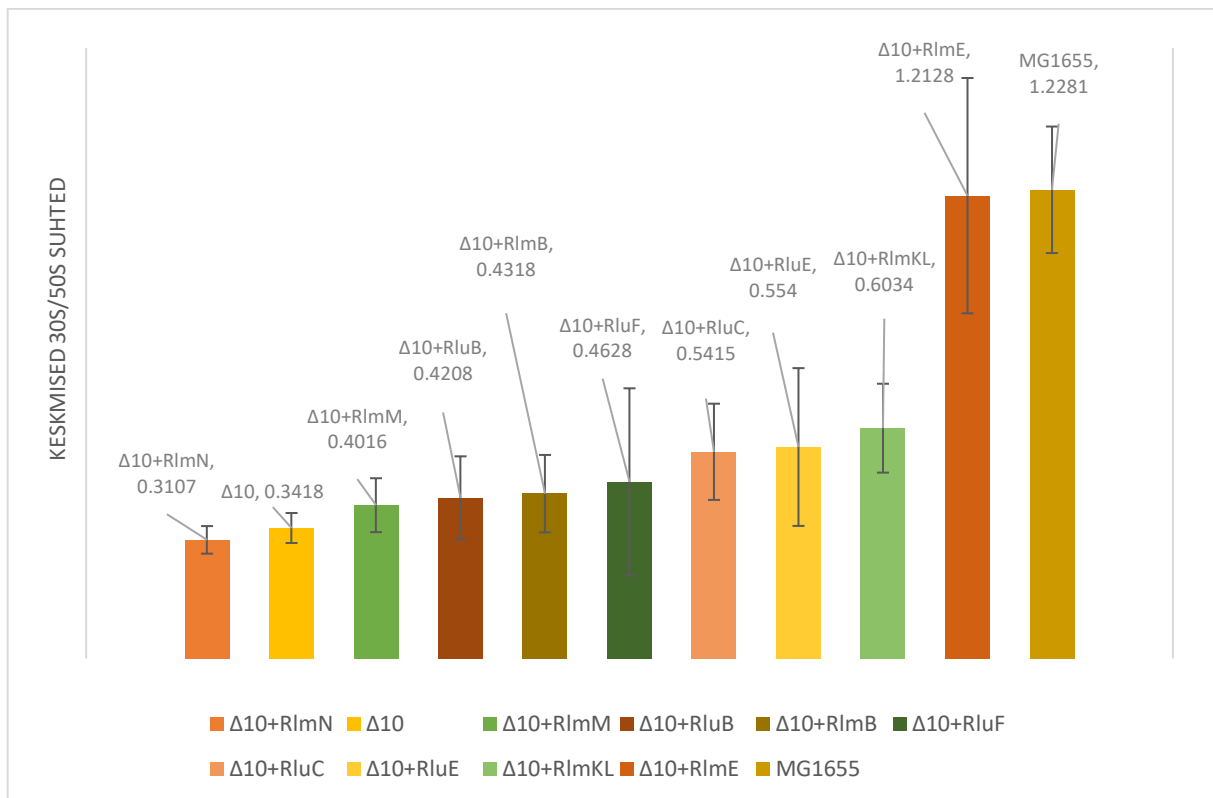
Kõikide, v.a MG165 ja $\Delta 10 + RlmE$ tüvede puhul on 50S subühikute osakaal 1,65-3,7 korda suurem võrreldes 70S ribosoomi omaga (joonis 11).

Kõiki neid tüvesid eristab suur vabade 50S subühikute hulk, mis viitab sellele, et tegemist võib olla osaliselt eellaspartiklitega. Mingi kindla modifikatsiooni puudumise tagajärjel võib 50S fraktsioon sisaldada märkimisväärses hulgas 50S subühiku eellaspartikleid, mis on translatsiooniliselt inaktiivsed. Antud kattulemustee põhjal võime oletada et, et joonisel 10 nähtav suurenenud 50S subühikute osakaal peegeldab ribosoomide biogeneesi protsessi aeglustumist (Ishiguro et al., 2019).

Kuna enamike uuritavate tüvede puhul on palju 50S ja 30S subühikuid ja ainult vähesel määral 70S ribosome, siis ribosoom on küll funktsionaalne, kuid aeglane. Seega ei saa välistada olukorda kus valgusünteesi optimaalse kiiruse taastamiseks ei jätku piisavalt translatsiooniliselt aktiivseid 70S ribosome.

Selleks, et kvantitatiivselt hinnata 50S ja 70S osakaalu rakus, digitaliseeriti suhkrugradiidid. Saadud digitaliseeritud ribosoomiprofiile analüüsiti kasutades ImageJ arvutiprogrammi, mille abil määrati piikide alune pindala, mis iseloomustab kvantitatiivselt ribosoomide hulka. Pindalad on esitatud suhtena (50S/70S; 30S/50S) ning esitatud joonisel 11. Täpsem meetod on kirjeldatud peatükis 2.3.2.





Joonis 11. Ribosoomi subühikute vahelised suhted. Gradiendiprofilid olid digitaliseeritud WACOW digilaua abil. Digitaliseeritud gradiendiprofilid olid analüüsitud kasutades ImageJ programmi. Iga saadud ribosoomiprofiili kohta oli arvatud piikide aluste pindala ning suhete saamiseks 50S ja 70S pindalad olid jagatud omavahel (50S/70S). Joonisel on esitatud kolme sõltumatu arvutuse keskväärtsed ja standartvead. Katsete korduste arv n=3.

Jooniselt 11 selgub, et MG1655 tüve ja Δ10 tüve keskmised subühikute vahelised suhted on oluliselt erinevad. MG1655 puhul suur osa 50S ja 30S subühikuid on koondunud translatsioonaktiivsete 70S alaühikutesse, samas kui Δ10 tüve puhul esineb väga palju vabu subühikuid ja vähesel määral 70S (joonis 10). See võiks tähendada, et modifikatsioonide puudumisel väheneb oluliselt translatsiooniliselt aktiivsete 70S ribosoomide hulk. Teiste ülejäänud tüvede (Δ10+RluC, Δ10+RluB, Δ10+RluE, Δ10+RlmM, Δ10+RlmN, Δ10+RluF, Δ10+RlmB) puhul jääb 50S subühikute osakaal 70S suhtes vahemikku 1,65-3,7 (joonis 11). Kõikidel uuritud tüvedel, välja arvatud Δ10+RlmE ja vähesel määral ka Δ10+RlmKL, näeme, et võime moodustada 70S ribosoomi on oluliselt langenud (joonis 10, 11).

Stõhhiomeetria 50S ja 30S subühikute vahel on ideaaljuhul 1:1. Kui suhe on nihkunud, siis võiks arvata, et üheks põhjuseks võib olla ribosoomide sünteesi aeglustumine, mis omakorda põhjustab häireid 70S ribosoomi moodustumisel. Joonisel 11 on ära toodud 30S/50S omavahelised suhted. Nende põhjal on näha, et ainult Δ10+RlmE ja MG1655 tüvedel vabade subühikute vahelised suhted on ligikaudu 1:1 (Δ10+RlmE ja MG1655 tüvel 30S/50S suheteks on 1,2:1). RlmE modifikatsiooniensüümi tagasiviimine Δ10 tüve taustsüsteemi omab 70S

ribosoomide moodustamisele positiivset efekti. Kõikide ülejäänud tüvede puhul on märkimisväärselt suurenenud vabade 50S subühikute fraktsioon (joonis 11). 50S subühikute ülehulga põhjuseks võiks olla aeglustunud ribosoomide süntees, mis omakorda võiks põhjustada häireid assambleerimisel. Samas tuleb meeles pidada, et antud meetodika on suhteliselt robustne ja võimaldab anda ainult esialgset kiiret hinnangut modifikatsioonide puudumise mõju kohta biogeneesile.

Töös esitatud andmed näitavad, et RlmE modifikatsiooniensüüm, mis katalüüsib Um2552 modifikatsiooni sünteesi, on ainuke uuritavatest tüvedest, mille tagasiviimine $\Delta 10$ taustsüsteemi avaldas mõju 70S ribosoomi moodustamisele, 2xYT ja 37°C juures. Käesolevas töös esitatud andmed RlmE kompenseeriva mõju kohta $\Delta 10$ tüves on heas kooskõlas Pletnev et al., 2020 avaldatud töös publitseeritud tulemustega, kus uuriti Δ rlmE mõju ribosoomidele 37°C juures. Nende katsetes oli eemaldatud korruga ainult 1 modifikatsiooniensüüm. Selle töö tulemustest selgus, et ainult RlmE modifikatsiooniensüümi puudumine mõjutab oluliselt ribosoomiprofiili ning biogeneesi. Esines suures hulgas 50S subühikuid ja vähesel määral 70S ribosome.

Töös esitatud katsete seeriad on teostatud rikas söötmes, optimaalsel kasvutemperatuuril ja eksponentsiaalses kasvufaasis. Edaspidi on plaanis eksperimentidega uurida, kas mingi efekt 70S ribosoomide moodustamisel võiks esineda teistes tingimustes. Plaanis on rakendada ebasoodsaid kasvutingimusi, mis peegeldavad paremini eluslooduses esinevaid olukordi (toitainetevaene kasvukeskkond, madalam temperatuur). Samuti plaanis on uurida modifikatsioonide mõju *in vitro* kasutades biokeemilisi meetodeid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaaurusetöö eesmärgiks oli uurida üksikute 23S rRNA V domeeni modifikatsioonide rolli biosünteesis. Selleks ekspresseeriti *in trans* tüves, milles puudusid 23S rRNA V domääni modifikatsioonientsüümid, ükshaaval puuduvaid valke ning jälgiti nende mõju rakukultuuri kasvule ja 70S ribosoomi moodustamisele.

Katsetulemused näitasid, et kõige suuremat mõju omab 23S rRNA V domeeni modifikatsiooni Um2552, mida sünteesib modifikatsioonientsüüm RlmE. Seda kinnitab võrreldes kõikidest teistest V domeeni modifikatsioonidest kõige kiirem generatsiooniaeg ja samuti ribosoomiprofiil, mis näitas metsik-tüüpi kontrolltüvega sarnast ribosoomi subühikute jaotust. RlmE modifikatsioonientsüümi tagasiviimine $\Delta 10$ tüve taustsüsteemi kompenseeris olulisel määral selle puudumist. Taastus 70S ribosoomide hulk ja väga vähesel määral esines vabu subühikuid. Seega võime väita et, et see modifikatsioon on vajalik 70S ribosoomide moodustamisel ja on oluline rakkude normaalseks kasvuks.

Positiivselt eristus ka modifikatsioonientsüüm RlmKL, mis katalüüsib kahte V domeeni modifikatsiooni - m⁷G2069 ja m²G2445. Antud tüve generatsiooniaeg oli võrreldes taustsüsteemiga ($\Delta 10$ tüvi) kiirem. Ribosoomide jaotuse analüüs saharoosi gradiendis näitas, et *in vivo* suurendas modifikatsiooni olemasolu rakus 70S ribosoomide fraktsiooni. Seega saame väita, et sellel modifikatsioonil on mõõdukas efekt subühikute vahelisele assotsiatsioonile ja ka kasvule.

RluC, rlmN, rlmB geenide tagasiviimine parandab tüvede kasvukiirust erinevatel söötmetel ja erinevatel temperatuuridel. Antud modifikatsioonientsüümide üleekspresseerimine kompenseerib vähesel, aga mõõdetaval määral $\Delta 10$ tüve kasvudefekti. Seega võib oletada, et nendel modifikatsioonidel võib olla oma roll nii ribosoomide biogeneesis kui ka valgusünteesil.

Ülejäänud geenide (rlmM, rluF, rluB, rluE) ekspresseerimine ei kompenseerinud kasvule ega 70S ribosoomi moodustamisele kasutatud katsetingimustes. Kõikide uuritud tüvede puhul kehtis seaduspära, mille kohaselt avaldub modifikatsioonide puudumise efekt kõige tugevamini madalamatel temperatuuridel ja vaeses söötmes ehk siis ebasoodsates tingimustes.

Kokkuvõtvalt saame väita, et osadel modifikatsioonidel nagu RlmE ja RlmKL on märkimisväärne mõju ribosoomide assotsiatsioonile ning ka kasvufenotüübile. Samas valdava enamiku 23S rRNA domään V modifikatsioonide ja modifikatsioonientsüümide roll raku füsioloogias on kas väga väike või ei avaldu meie töös kasutatud tingimustel.

Modifications of E.coli 23S rRNA V domain and their effect on ribosome biosynthesis

Anastassia Klink

SUMMARY

Escherichia coli is a most common organism for studying ribosome and protein synthesis. It consists of large and small subunits that are formed by ribosomal RNA and ribosomal proteins. Some of the rRNA nucleotides have been modified in all domains of life. Modifications are catalyzed by modification enzymes. In the E. coli ribosome, many modifications are concentrated in the V domain of the 23S rRNA.

This study aims to analyse the effects of 23S rRNA V domain modifications to the cell growth and to the subunit association in vivo.

The results of this study can be summarized as follows:

1. The 23S rRNA V domain modification Um2552 which is synthesized by the modification enzyme RlmE, has the greatest effect on cell growth and ribosomal subunit assembly. This is confirmed by the fastest generation time of all other V domain modifications, as well as the ribosome profile, which showed a distribution of ribosome subunits similar to the wild-type (wt.) control strain. Returning the RlmE modification enzyme into the reference system ($\Delta 10$ strain) significantly compensated for its absence. The number of 70S ribosomes was increased and only a small number of free subunits were present. Thus, we can overcome that this modification is necessary for the formation of 70S ribosomes and is essential for normal cell growth.
2. The modification enzyme RlmKL, which catalyzes two modifications of the V domain - m⁷G2069 and m²G2445, also showed positive results in cell growth and 70S subunit assembly. The generation time of this strain was faster compared to the reference system ($\Delta 10$ strain). Analysis of the ribosome subunit distribution in the sucrose gradient showed that the presence of the modification in the cell increased the 70S ribosome fraction in vivo. Thus, we can say that this modification has a moderate effect on the subunit association and on growth.
3. Expression of the rluC, rlmN, rlmB genes improves the growth rate of the strains in different media and at different temperatures. Overexpression of these modification enzymes compensates for the growth defect of the $\Delta 10$ strain to a small but measurable extent. It can be hypothesized that these modifications may play a role in both ribosome biogenesis and protein synthesis.

4. Expression of the remaining genes (rlmN, rluF, rluB, rluE) did not compensate for growth or 70S ribosome formation under the experimental conditions used.
5. Some modifications, such as RlmE and RlmKL, have significant effects on ribosome association as well as growth phenotype. However, the role of the vast majority of 23S rRNA domain V modifications and modification enzymes in cell physiology is either very small or not expressed under the conditions used in our work.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agrawal, R. K., Lata, R. K., & Frank, J. (1999). Conformational variability in *Escherichia coli* 70S ribosome as revealed by 3D cryo-electron microscopy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *31*(1), 243–254.
- Agris, P. F. (1996). The importance of being modified: Roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *53*, 79–129.
- 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.
- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(34), E4707–E4716.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5481), 905–920.
- Benítez-Páez, A., Villarroya, M., & Armengod, M.-E. (2012). The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy. *RNA*, *18*(10), 1783–1795.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 6—Nucleic Acids. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 121–140). Academic Press.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5331), 1453–1462.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., & Richarme, G. (2000). Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um(2552) 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *271*(3), 714–718.
- Charette, M., & Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: What, where, how, and why. *IUBMB Life*, *49*(5), 341–351.

- Del Campo, M., Kaya, Y., & Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), 1603–1615.
- Green, M. R., Sambrook, J., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guo, H.-Y., Gao, Z.-Q., Zhang, H., Wei, Y., Xu, J.-H., Wang, W.-Y., Yan, A., & Dong, Y.-H. (2013). Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the 23S rRNA methyltransferase RlmM (Cm2498) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(Pt 6), 640–642.
- Ishiguro, K., Arai, T., & Suzuki, T. (2019). Depletion of S-adenosylmethionine impacts on ribosome biogenesis through hypomodification of a single rRNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 47(8), 4226–4239.
- Kaczanowska, M., & Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 477–494.
- Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2012). Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 4071–4085.
- Li, S., & Mason, C. E. (2014). The Pivotal Regulatory Landscape of RNA Modifications. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15(1), 127–150.
- 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.
- Lövgren, J. M., & Wikström, P. M. (2001). The rlmB Gene Is Essential for Formation of Gm2251 in 23S rRNA but Not for Ribosome Maturation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6957–6960.
- Mizutani, K., Machida, Y., Unzai, S., Park, S.-Y., & Tame, J. R. H. (2004). Crystal structures of the catalytic domains of pseudouridine synthases RluC and RluD from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 43(15), 4454–4463.
- O'Connor, M., Lee, W.-C. M., Mankad, A., Squires, C. L., & Dahlberg, A. E. (2001). Mutagenesis of the peptidyltransferase center of 23S rRNA: The invariant U2449 is dispensable. *Nucleic Acids Research*, 29(3), 710–715.

- Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutsell, N. S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L., & Kaya, Y. (2001). Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *66*, 147–159.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., Stepanov, V. G., Gaucher, E. A., Grover, M. A., Harvey, S. C., Hud, N. V., Wartell, R. M., Fox, G. E., & Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, *41*(15), 7522–7535.
- Pletnev, P., Guseva, E., Zanina, A., Evfratov, S., Dzama, M., Treshin, V., Pogorel'skaya, A., Osterman, I., Golovina, A., Rubtsova, M., Serebryakova, M., Pobeguts, O. V., Govorun, V. M., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., & Sergiev, P. V. (2020). Comprehensive Functional Analysis of Escherichia coli Ribosomal RNA Methyltransferases. *Frontiers in Genetics*, *11*.
- Polacek, N., & Mankin, A. S. (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: Structure, function, evolution, inhibition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(5), 285–311.
- Punekar, A. S., Shepherd, T. R., Liljeruhm, J., Forster, A. C., & Selmer, M. (2012). Crystal structure of RlmM, the 2'O-ribose methyltransferase for C2498 of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Research*, *40*(20), 10507–10520.
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2008). YccW is the m5C Methyltransferase Specific for 23S rRNA Nucleotide 1962. *Journal of Molecular Biology*, *383*(3), 641–651.
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2009). YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Molecular Microbiology*, *72*(5), 1147–1158.
- Schwalm, E. L., Grove, T. L., Booker, S. J., & Boal, A. K. (2016). Crystallographic capture of a radical S-adenosylmethionine enzyme in the act of modifying tRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6283), 309–312.
- Sergeeva, O. V., Bogdanov, A. A., & Sergiev, P. V. (2015). What do we know about ribosomal RNA methylation in Escherichia coli? *Biochimie*, *117*, 110–118.
- Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S., & Dontsova, O. A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nature Chemical Biology*, *14*(3), 226–235.
- Siibak, T., & Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA*, *16*(10), 2023–2032.

- Stagg, S. M., Mears, J. A., & Harvey, S. C. (2003). A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 328(1), 49–61.
- Tillault, A.-S., Schultz, S. K., Wieden, H.-J., & Kothe, U. (2018). Molecular Determinants for 23S rRNA Recognition and Modification by the E. coli Pseudouridine Synthase RluE. *Journal of Molecular Biology*, 430(9), 1284–1294.
- 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.
- Wang, K.-T., Desmolaize, B., Nan, J., Zhang, X.-W., Li, L.-F., Douthwaite, S., & Su, X.-D. (2012). Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m7G2069 and m2G2445 modifications in Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 5138–5148.
- Wang, W., Li, W., Ge, X., Yan, K., Mandava, C. S., Sanyal, S., & Gao, N. (2020). Loss of a single methylation in 23S rRNA delays 50S assembly at multiple late stages and impairs translation initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(27), 15609–15619.
- Widerak, M., Kern, R., Malki, A., & Richarme, G. (2005). U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy. *Gene*, 347(1), 109–114.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327–339.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 883–896.

Kasutatud magistritööd:

Ermo Leuska magistritöö 2019

Silva Lilleorg magistritöö 2014

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anastassia Klink

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „23S rRNA V domeeni modifikatsioonid ja nende mõju ribosoomi biosünteesile“,

mille juhendaja on PhD Aivar Liiv,

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

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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Anastassia Klink

10.08.2020