

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Heili Ann

Ribosoomivalkude (L31/L36) paraloogide iseloomustamine

Escherichia coli

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Margus Leppik

MSc Kai Virumäe

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Ribosoom.....	6
1.1.1 Prokarüoodi ja eukarüoodi ribosoomide võrdlus	7
1.2 Translatsioon.....	9
1.3 Ribosomaalsed valgud	11
1.3.1 Ribosomaalne valk L31	13
1.3.2 Ribosomaalne valk L36.....	14
2 EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Töös kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed.....	16
2.2.2 MG1655 + Δ 31B36B tüve konstrueerimine.....	18
2.2.3 Konkurentsikatsed MG1655 ja deletsioonitüvede vahel	20
2.2.4 Tasside pildistamine	21
2.3 Tulemused.....	22
2.3.1 MG1655 Δ 31B36B tüve konstrueerimine	22
2.3.2 Ellujäämus statsionaarses kasvufaasis.....	22
2.3.3 Deletsioonide efekt tsüklilise kasvu tingimustes.....	25
2.4 Arutelu	30

Paralogous ribosomal proteins L31/L36 and their characterization in <i>Escherichia coli</i>	34
KIRJANDUSE LOETELU.....	35
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	38
LISAD	39
LISA 1 Konkurentsikatse tulemused Δ 36B geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel	39
LISA 2 Konkurentsikatse tulemused Δ 31A geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel	40
LISA 3 Konkurentsikatse tulemused Δ 36A geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel	41
LIHTLITSENTS.....	42

KASUTATUD LÜHENDID

E.coli – *Escherichia coli*

IF (1,2,3) – initsiatsioonifaktor (1,2,3)

RF – vabastajafaktor (*release factor*)

EF-Tu – elongatsioonifaktor (*elongation factor Tu*)

EF-G – elongatsioonifaktor (*elongation factor G*)

mRNA – *messenger-RNA*

rRNA – ribosomaalne RNA

tRNA – transport RNA

r-valk – ribosomaalne valk

Zn²⁺ - tsink

PTC – peptidüültransferaasi tsenter

wt – metsiktüvi, MG1655

kan, Km – kanamütsiin

mQ – milli Q

SISSEJUHATUS

Ribosoom, mis koosneb kahest subühikust, vastutab valgu sünteesi eest. Ribosoomi mõlemad subühikud koosnevad ribosomaalsest RNAST ja ribosomaalsetest valkudest. Translatsioon ribosoomides koosneb kolmest etapist: initsiatsioonist, elongatsioonist ja terminatsioonist. Initsiatsioonil toimub ribosoomi kahe subühiku omavaheline seondumine, mRNA-l valku kodeeriva järjestuse alguse leidmine ja lugemisraami fikseerimine. Elongatsiooni käigus toimub peptiidahela süntees ribosoomi poolt, kuni jõutakse mRNA-l asuva stoppkoodonini. Terminatsioonil tuntakse stoppkoodon ära terminatsioonifaktorite poolt, mille tagajärjel vabastatakse ribosoomist nii sünteesitud valk, mRNA kui ka tRNA ja toimub ribosoomi subühikute dissotsieerumine.

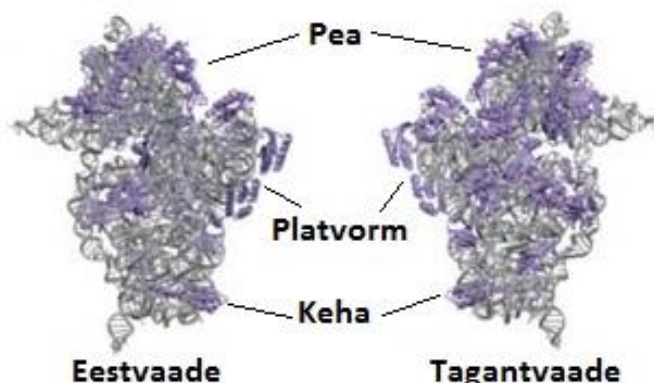
Selles töös uurime kahte ribosoomivalku, nendeks on L31 ja L36, mõlemad on ribosoomi suure subühiku valgud. L31 ja L36 on erilised, kuna on leitud, et need mõlemad esinevad ribosoomi koostises kahes erinevas vormis, nii A kui B vormis, mida kutsutakse paraloogideks. Käesoleva töö eesmärk oli teada saada, kas ribosoomidel, kust on puudu L31 ja L36 üks või mõlemad valkude paraloogid, esineb mingeid fenotüübilisi erinevusi. Eesmärgiks oli iseloomustada bakteritüvesid, milles on deleteeritud L31 nii üks kui ka mõlemad paraloogsed geenid ning bakteritüvesid, milles on deleteeritud L36 üks või mõlemad paraloogsed geenid. Töös kasutatavad erinevad tüved on konstrueeritud molekulaarbioloogia laboris erinevate inimeste poolt. Osalesin valkude L31B/L36B deletsiooniga bakteritüve konstrueerimisel. Uurisime deletsioonitüvede kasvu erinevatel kasvutingimustel ja erinevates kasvufaasides võrrelduna metsiktüüpi tüvega, mis võimaldasid uurida nende valkude deletsiooni efekti erinevates kasvutingimustes. Oluline oli välja selgitada, mis eeliseid annab rakukultuurile ühe või teise valgu olemasolu ribosoomis.

Ribosoom, ribosomaalne valk L31, ribosomaalne valk L36, translatsioon, valkude vahetus

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ribosoom

Ribosoom on hästi organiseeritud dünaamiline makromolekul, mis vastutab geneetilise informatsiooni korrektse translatsiooni eest, see toimub kiiresti ning väga täpselt (Green & Noller, 1997). Ribosoom koosneb kahest erineva suurusega subühikust, mis omakorda koosnevad rRNAst ja valkudest (Ramakrishnan, Road, Kingdom & Heel, 2002). Ühe kolmandiku ribosoomi massist moodustavad ribosoomi valgud ja kaks kolmandikku rRNA (Mears et al., 2002). Translatsiooni initsiatsiooni käigus ribosoomi subühikud liituvad ja eralduvad, kui algab terminatsioon (Selmer et al., 2006). *E.coli* ribosoom on 2,4-MDa ribonukleoproteiini kompleks, mis koosneb 58st valgust ja kolmest ribosomaalsest rRNAst. Need valgud ja rRNA koonduvad kaheks erineva suurusega asümmeetriliseks partiklile, väikseks ribosoomi subühikuks (30S) ja suureks ribosoomi subühikuks (50S) (Dunkle & Cate, 2013). Väike ja suur subühik koonduvad valgusünteesi initsiatsiooni käigus kokku terviklikuks ribosoomiks (70S) (Byrgazov, Vesper, & Moll, 2013). Väiksem subühik vahendab initsiatsiooni etappi ja sisaldab seondumissaite kolmele initsiatsioonifaktorile (IF1, IF2 ja IF3) ning samuti sisaldab info dekodeerimise keskust, kus mRNA koodonid paarduvad neile vastava tRNA antikoodonitega (Gualerzi & Pon, 1990). Väikese subühiku koostises olevaid valke nimetatakse S-valkudeks (S1-S21), "S" tuleb inglise keelsest sõnast *small*, mis tähendab väikest (Dunkle & Cate, 2013).



Joonis 1. Väikese subühiku morfoloogilised elemendid nii eest- kui ka tagantvaates. (Wimberly et al., 2000).

Väikese subühiku kuju on suuresti määratud (16S rRNA) RNA sekundaarstruktuuri poolt, mis moodustab kolm morfoloogilist elementi, milledele on tinglikult antud nimed – pea (16S 3' domeen), platvormi (16S tsentraalne domeen) ja keha (16S 5' domeen) (Joonis 1.) (Byrgazov et al., 2013). Suure subühiku koostises olevad valgud on nimetatud L1-L36, “L“ tuleb inglise keelsest sõnast *large*, mis tähendab suurt (Dunkle & Cate, 2013). Suur subühik sisaldab peptidüültransferaasset tsentrit (PTC), kus katalüüsitakse valgusünteesi käigus peptiidsideme moodustumist. Suur subühik annab seondumissaidid elongatsioonifaktoritele ja sisaldab tunnelit, mille kaudu väljub PTC-s sünteesitud peptiidahel ribosoomist tsütoplasmasse (Byrgazov et al., 2013). Valkude nimetamise skeem põhineb nende liikuvusel elektroforeesi toimel kahedimensionaalses geelis (Dunkle & Cate, 2013). *E.coli* ribosoomi väike subühik koosneb suuremas osas 16S rRNA-st (1542 nukleotiidi) ning suur subühik koosneb suuremas osas nii 5S rRNA-st (120 nukleotiidi) kui ka 23S rRNA-st (2904 nukleotiidi) (Cannone et al., 2002). Eukarüootide (*H. sapiens*) ribosoomi väike subühik ehk 40S-alaüksus koosneb 18S rRNA-st ja 33 ribosoomivalgust, suur subühik ehk 60S-alaüksus sisaldab aga kolme rRNA-molekul, 5S rRNA-d, 5,8S rRNA-d, 28S rRNA-d ning 47 erisugust polüpeptiidi (G. Yusupova & Yusupov, 2014).

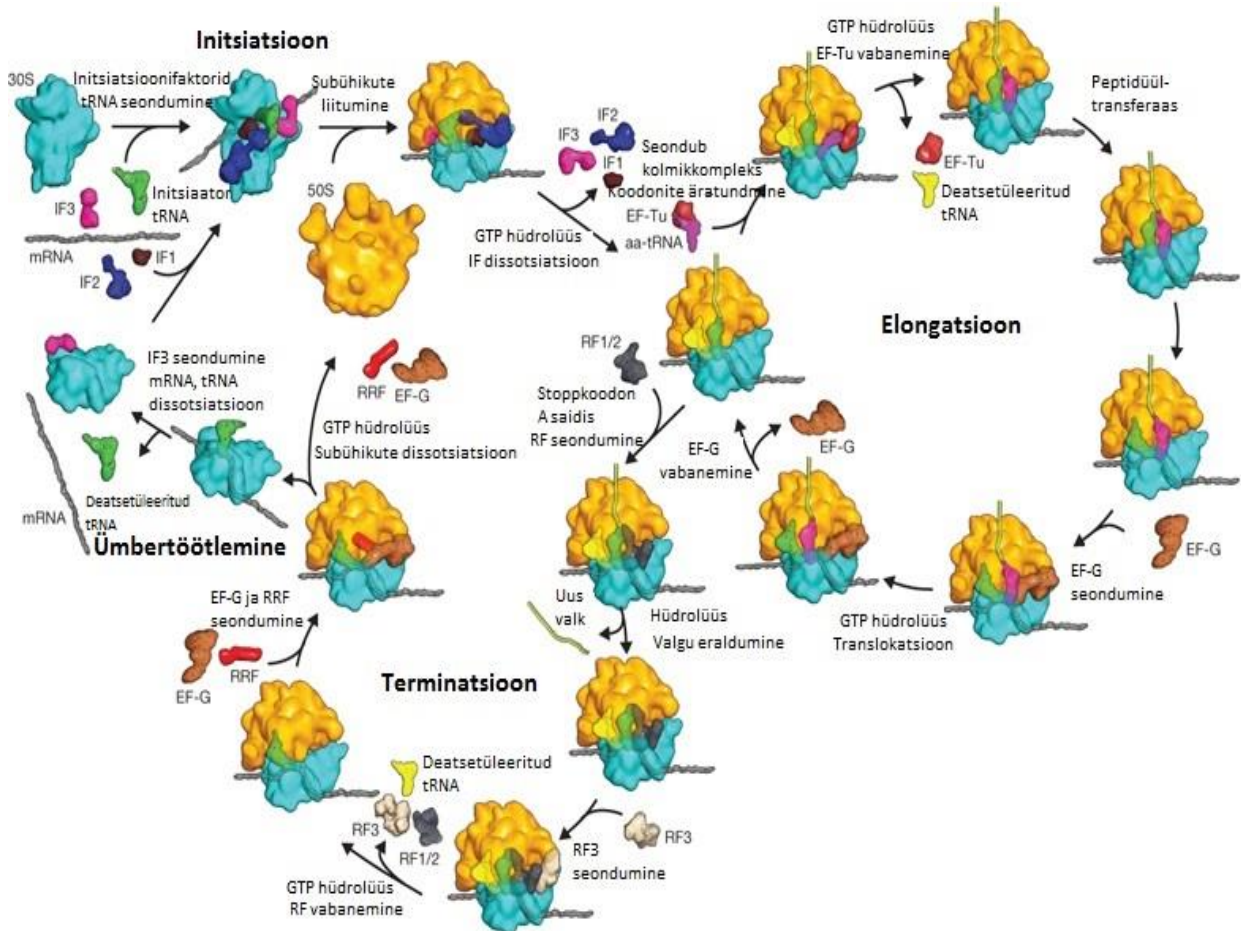
1.1.1 Prokarüoodi ja eukarüoodi ribosoomide võrdlus

Vaatamata ribosoomide konserveeruvusele on ribosoomides sisalduvate RNA ja valkude suhe elu erinevates domeenides väga varieeruv. Ribosomaalse RNA ja valgu suhe võib varieeruda 2:1 bakterite ribosoomides kuni 1:3 mõnedes mitokondriaalsetes ribosoomides, ilma, et oleks erilisi erinevusi ribosoomide molekulmassides (Melnikov et al., 2012). Nii 70S kui ka 80S ribosoomid on asümmeetrilised, koosnedes rohkem kui 50st erinevast valgust ja kolmest või neljast RNA ahelast (Melnikov et al., 2012). Struktuursetest uuringutest on selgunud, et bakterite ja eukarüootide ribosoomidel on sarnane struktuurne tuumik, mis koosneb 34-st konserveerunud valgust (15 väikeses subühikus, 19 suures subühikus) ja 4400-st RNA alusest (Melnikov et al., 2012). 70S ribosoom koosneb 20st bakteri spetsiifilisest valgust (6 väikeses subühikus ja 14 suures subühikus). 80S ribosoom koosneb 46-st eukarüoodi spetsiifilisest valgust (18 väikeses subühikus ja 28 suures subühikus) (Melnikov et al., 2012). 30S ja 40S subühikute üldine struktuur on väga konserveerunud, samuti sisaldavad need ühesuguseid morfoloogilisi elemente, mida tinglikult nimetatakse - pea (*head*), keha (*body*) ja platvorm (*platform*) (Melnikov et al., 2012). mRNA ja kolm tRNA seondumissaiti (A, P ja E)

asuvad subühikute nendel pindadel, mille kaudu ribosomaalsed subühikud omavahel initsiatsiooni käigus kontakteeruvad (G. Z. Yusupova, Yusupov, Cate, & Noller, 2001). Üldiste struktuuride võrdlemisel on ilmne, et ulatuslikud erinevused bakterite ja eukarüootide ribosoomide struktuurides paiknevad ribosoomi tsütoplasma poolisel küljel. Need erinevused on ilmselt seotud sellega, et eukarüootsetes rakkudes on translatsiooni initsiatsioon palju keerulisem ja nõuab oluliselt rohkem lisafaktoreid (Melnikov et al., 2012). Prokarüoodi ja eukarüoodi ribosoomid kasutavad erinevaid strateegiaid leidmaks mRNA-l startkoodonit, kust saaks alguse translatsioon. Bakterites on startkoodoni valik määratud Shine-Dalgarno järjestuse poolt, mis tagab mRNA startkoodoni korrektse asetuse väikesel subühikul (Melnikov et al., 2012). Eukarüootides võib startkoodon asuda mitusada nukleotiidi eemal kohast, kus mRNA on kinnitunud väikesele subühikule, vajalik on 5'-3' suunaline mRNA skanneerimine, et leida üles õige valgusünteesi alguspunkt (Jackson, Hellen, & Pestova, 2010) (Aitken & Lorsch, 2012). 50S ja 60S subühikutel on sarnane kroonilaadne kuju (Melnikov et al., 2012). Suure subühiku pinnal asuvad kolm (A, P ja E) tRNA seondumissaiti ja peptidüültransferaasi tsepter, kus toimub peptiidside moodustamine (Dunkle & Cate, 2013). Translatsiooni käigus väljub kasvav peptiidahel tunneli kaudu tsütoplasmasse ja seal toimub tema protsessimine ja voltumine. Tunnel algab PTC-st ja lõpeb suure subühiku sellel poolel, mis ei kontakteeru 30S-ga (Melnikov et al., 2012). Bakterites on tunneli seinad moodustatud peamiselt 23S rRNA konserveerunud osadest, sisaldades ka L4 ja L22 valgulisi silmuseid ning bakteri spetsiifilist valku L23 (Zaman, Fitzpatrick, Lindahl, & Zengel, 2007). Eukarüootides on tunneli seinad moodustatud peamiselt 28S rRNA konserveerunud osadest, sisaldades ka L4 ja L22 valgulisi silmuseid ning eukarüoodi spetsiifilist valku L39e (Melnikov et al., 2012). Nii 50S kui ka 60S subühikutes on peptiidahela tunneli ahenemine seotud valkudega L4 ja L22. Eukarüootides on tunnel kitsam, kui prokarüootides, mis on põhjustatud insertsioonidest valgus L4 (Melnikov et al., 2012). Kuigi erinevuste põhjused pole teada, arvatakse, et eukarüootide kitsam tunnel on vajalik selleks, et blokeerida makroliidide seondumist tunnelisse, mis takistavad valmiva peptiidi pääsu tunneli kaudu tsütoplasmasse ja põhjustab seeläbi translatsiooni inhibitsiooni (Zaman et al., 2007). Eukarüoodi 80S kristallstruktuurid näitavad, et need ribosoomid pole mitte ainult suuremad kui bakterite omad, vaid sisaldavad ka unikaalseid struktuurseid elemente, millest paljusid pole veel uuritud (Melnikov et al., 2012).

1.2 Translatsioon

Translatsiooni ribosoomides saab laias laastus jagada kolme põhietappi, nendeks on initsiatsioon e. algatamine, elongatsioon e. pikendamine ja terminatsioon e. lõpetamine (Schmeing & Ramakrishnan, 2009)(Joonis 2.). Tegelikult on olemas veel neljaski etapp, ribosoomi dissotsieerumine subühikuteks, et translatsiooniring saaks uuesti alata (Byrgazov et al., 2013).



Joonis 2. Translatsioon bakteriaalsetes ribosoomides.

Joonisel on näidatud translatsiooni põhietapid ning vajalikud faktorid, mis aitavad seda läbi viia (Schmeing & Ramakrishnan, 2009).

Ribosoomil on kolm kohta, kus tRNA seondub mRNA-ga, neid kohti kutsutakse A, P ja E saitideks. Need kolm tRNA seondumissaiti asuvad väikese ja suure subühiku vahelisel pinnal (Dunkle & Cate, 2013). A sait on seondumissait aminoatsüül-tRNA jaoks, P sait on seondumissait peptidüül-tRNA jaoks ja E sait on sait, mille kaudu vabastatakse tRNA ribosoomist, kui kasvav polüpeptiidahel liigutatakse peptidüül-tRNA juurest aminoatsüül-tRNA juurde ehk siis A saiti, kus luuakse side seal asuva tRNA-ga (Vila-Sanjurjo, 2013).

Initsiatsioon bakterites hõlmab interaktsiooni 30S subühiku 16S rRNA ja mRNA-l oleva Shine-Dalgarno järjestuse vahel. Shine-Dalgarno järjestus on komplementaarne 16S rRNA 3' otsaga, mida kutsutakse Anti Shine-Dalgarno järjestuseks. Initsiatsioon vajab toimumiseks kolme initsiatsioonifaktorit – IF1, IF2 ja IF3 (Gualerzi & Pon, 1990). IF3 seondub tugevasti 30S subühikuga ja aitab vältida viimase enneaegset seondumist 50S subühikuga, IF3 aitab ka initsiaator-tRNA valikul, kuna see destabiliseerib teiste tRNAde seondumist ribosoomi P saiti (Hartz, Binkley, Hollingsworth, & Gold, 1990). IF3 aitab ka terminatsiooni viimase sammuna eemaldada deatsetüleeritud tRNA väikesest subühikust, enne kui subühikut taaskasutatakse uue valgu sünteesi initsiatsiooniks (Karimi, Pavlov, Buckingham, & Ehrenberg, 1999). IF2 on GTPaas, mis soodustab subühikute assotsiatsiooni moodustamiseks 70S initsiatsiooni kompleksi. Initsiatsioonikompleks saab moodustuda vaid peale IF3 vabanemist 30S subühikult. IF3 vabaneb, kuna initsiaator-tRNA ja startkoodoni interaktsiooni tulemusena toimuvad väikeses subühikus konformatsioonilised muudatused, mis põhjustavad IF3 vabanemise ning suur subühik saab seonduda väikese subühikuga (Antoun, Pavlov, Lovmar, & Ehrenberg, 2006). IF2 seondumist ribosoomiga vahendab IF1. 30S-IF1 kompleksi kristallstruktuurist selgub, et IF1 seondub 30S subühiku A saiti, see kaitseb A saiti liiga varase tRNA seondumise eest (Carter, 2001). Kokkuvõttes, IF1 seondub A saiti, IF2 seondub üle A saidi, P sait on hõivatud initsiaator-tRNA poolt ja IF3 hõivab E saidi. Seega kõik tRNA saidid on hõivatud, ilmselt on see kõik vajalik selleks, et 30S subühik saavutaks õige konformatsiooni valgu sünteesi alustamiseks (Tomsic et al., 2000).

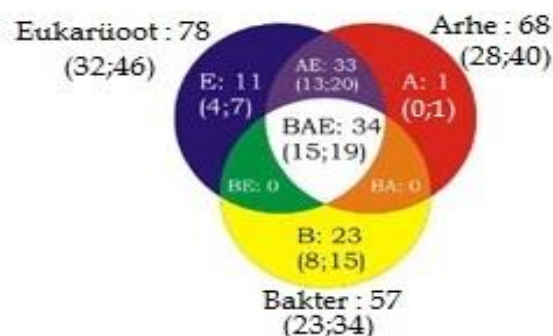
Elongatsioonitsükli alguses asub ribosoomi P saidis peptidüül-tRNA, mille küljes on aminohape, ja A sait on tühi. Aminoatsetüül tRNA tuuakse A saiti kolmikkompleksis EF-Tu ja GTP-ga (Ramakrishnan et al., 2002). Korrektne koodoni ja antikoodoni interaktsioon põhjustab ribosoomis konformatsioonilised muutused, mis stabiliseerivad tRNA seondumist ja päästavad EF-Tu kaasabil valla GTP hüdrolüüsi (Rodnina & Wintermeyer, 2001). Dekodeerimisele järgneb peptiidside moodustamine, mille tulemusena pikeneb polüpeptiidahel ühe aminohappe võrra (Ramakrishnan et al., 2002). Peptiidside moodustamine, mis hõlmab P saidis oleva tRNA deatsetüleerimist ja peptiidahela ülekandmist A saiti on siis sisuliselt spontaanne (Ramakrishnan et al., 2002). Peale peptidüüli transferaasi on ribosoomi P saidis deatsetüleeritud-tRNA ja A saidis peptidüül-tRNA. Translokatsiooni viib läbi EF-G, mis on GTPaas. EF-G katalüüsitud translokatsiooni abil liiguvad tRNA ja mRNA ribosoomi suhtes ühe koodoni võrra edasi (Ramakrishnan et al., 2002). Translokatsiooni tulemusena on ribosoom valmis uueks

elongatsioonitsükliks, mis hõlmab deatsetüleeritud tRNA-d E saidis, peptidüül tRNA-d P saidis ja tühja A saidi, mis on valmis vastu võtma uut kolmikkompleksi (tRNA + EF-Tu + GTP) (Ramakrishnan et al., 2002). Valgusünteesi terminatsioon algab siis, kui stoppkoodon on jõudnud ribosoomi A saidi. Bakterites tunnevad stoppkoodoneid ära kaks erinevat terminatsioonifaktorit – RF1 ja RF2 (Kisselev & Buckingham, 2000). Mõlemad terminatsioonifaktorid tunnevad ära UAA koodonit, RF1 tunneb lisaks sellele ära UAG koodoni ja RF2 UGA koodonit (Ramakrishnan et al., 2002). RF1 ja RF2 seondumine ribosoomi A saidis kindla stoppkoodoniga viib peptidüül-tRNA hüdrolüüsini ja vabastab peptiidahela P saidi tRNA küljest (Das & Varshney, 2006). Ei ole selge, kas RF1/RF2 katalüüsivad ise peptiidi vabanemise peptidüül-tRNA küljest või indutseerivad ribosoomi poolt katalüüsivat terminatsiooni (Ramakrishnan et al., 2002). Vajalik on ka RF3, mis vabastab vastavalt kas RF1 või RF2 ribosoomide koosseisust pärast polüpeptiidahela eemaldamist tRNAlt (Freistoffer, Pavlov, MacDougall, Buckingham, & Ehrenberg, 1997). Peale polüpeptiidahela vabastamist jääb ribosoomi mRNA ja P saidi deatsetüleeritud tRNA, selline kompleks tuleb lahti võtta selleks, et valmistada ribosoom ette uueks valgusünteesiks (Ramakrishnan et al., 2002). Selles protsessis on vajalikud RRF (*ribosome recycling factor* e. ribosoomi ümbertöötlemise faktor) ja EF-G. Hiljutised uuringud näitavad, et RRF ja EF-G viivad ribosoomi dissotsiatsioonini GTP hüdrolüüsi kaudu (Karimi et al., 1999).

1.3 Ribosomaalsed valgud

Paralleelselt tähelepanuväärsele edule, mis on saavutatud ribosoomi struktuuri mõistmisel, on genoomika areng võimaldanud uurida ribosomaalsete valkude genee nii prokarüootsetes kui ja eukarüootsetes genoomides (Lecompte, Ripp, Thierry, Moras, & Poch, 2002). Analüüsid kinnitavad, et enamik bakteriaalseid r-valkude genee on koondunud genoomis paari operoni, mis võimaldab nende ekspressiooni efektiivsemat regulatsiooni, ja need geenid on harva duplitseeritud (Makarova, Ponomarev, & Koonin, 2001). Eukarüootsed r-valkude geenid on hajutatud kromosoomide vahel ja eukarüootne genoom sisaldab palju r-valkude geenide duplikatsioone (Lecompte et al., 2002). *E.coli* ribosoomi väikeses subühikus on 21 r-valku ja suures subühikus on 33 r-valku (Wilson & Nierhaus, 2005). Eukarüootidel on 78 r-valku, 32 neist on väikese subühiku ja 46 suure subühiku valgud. Eukarüootides leidub 11 eukarüooti spetsiifilist r-valku, mida ei leidu ei arhedes ega bakterites, 4 väikeses subühikus ja 7 suures subühikus (Lecompte et al., 2002). Arhedel on 68

ribosomaalset valku, 28 r-valku on väikeses subühikus ja 40 r-valku on suures subühikus. Üks r-valk on arhedel spetsiifiline, seda ei leidu ei bakterites ega eukarüootides, ja see asub suures subühikus (Lecompte et al., 2002). Bakteritel on 57 ribosomaalset valku, 23 r-valku on väikeses subühikus ja 34 on suures subühikus. 23 r-valku on bakteri spetsiifilised, neid ei leidu ei arhedes ega eukarüootides, 8 väikeses subühikus ja 15 suures subühikus (Lecompte et al., 2002). Eluslooduse kolmel domeenil (eukarüootidel, arhedel ja bakteritel) on 34 r-valku, mis on konserveerunud, 15 neist asub väikeses subühikus ja 19 suures subühikus (Joonis 3.) (Lecompte et al., 2002) (Koonin, Wolf, Yutin, & Puigbo, 2012). Üldiselt on ribosomaalsed valgud väga aluselised, võib oletada, et nende üldiseks funktsiooniks võib olla rRNA negatiivse laengu, mis on põhjustatud rRNA selgroos olevate fosfaatjääkide poolt, tasakaalustamine (Wilson & Nierhaus, 2005). Osadel r-valkudel, näiteks S16, L15, L16, L20 ja L24, on selge ja kindel funktsioon ribosoomi subühikute assotsiatsioonil, kuid nad muutuvad mittevajalikuks, kui ribosoom on täielikult kokku pandud (Nierhaus, 1991). Ribosomaalsed valgud on ebaühtlaselt jaotunud üle ribosoomi. Kõige silmatorkavam on see väikese subühiku puhul, kus ainult üks valk (S12) on leitud küljel, mis seondub suure subühikuga, kõik teised valgud paiknevad 30S subühiku tsütoplasmapoolsel küljel. Enamik r-valke on leitud väikese subühiku pea (16S 3' domeen) piirkonnast (Joonis 1.) (Wilson & Nierhaus, 2005). Suure subühiku külge, mis seondub väikese subühikuga on samuti r-valkude vaene, kuid peptiidi väljumistunnelis on rikkalikult r-valke (Wilson & Nierhaus, 2005).



Joonis 3. Ribosomaalsete valkude jagunemine kolme evolutsiooniliselt erineva domääni vahel (Wilson & Nierhaus, 2005)(Lecompte et al., 2002).

1.3.1 Ribosomaalne valk L31

Ribosoomivalk L31 on konserveerunud bakterite hulgas, L31 ribosoomi valku on leitud kahes vormis (A ja B). *Bacillus subtilis*'es on näidatud, et L31 valgu kaks vormi seonduvad ribosoomiga erinevatel kasvutingimustel (Nanamiya & Kawamura, 2010). Oletatakse, et L31 paraloogete valkude erinev seondumine ribosoomiga on tingitud tsingi olemasolust keskkonnas. Tsink kontrollib mõnede ribosoomivalkude geenide transkriptsiooni, nende hulka kuulub ka geen, mis kodeerib valku L31B (Panina, Mironov, & Gelfand, 2003). Tsink kontrollib L31B transkriptsiooni transkriptsioonifaktor ZUR abil. ZUR on repressor, mis seondub L31B promootorile tsingi juuresolekul, seega L31B geen tsingi juuresolekul ei avaldu. Paraloogete vahel esineb eripära, L31A sisaldab CxxC (Zn²⁺ sõrme motiiv, mis sisaldab kahte paari tsüsteiini) motiivi, mis arvatakse siduvat tsinki, L31B-l see motiiv puudub. Järelikult L31A seob tsinki ja L31B ei seo tsinki (Nanamiya & Kawamura, 2010). Limiteeritud tsingi tingimustes vahetatakse L31A, mis sisaldab ühte tsingi aatomit molekuli kohta, välja L31B vastu, mis ei sisalda tsinki (Nanamiya & Kawamura, 2010). On välja pakutud, et valkude vahetamine aitab kaasa tsingi homöostaasile, kui tsingi kogus on keskkonnas piiratud. Valkude vahetus võib suurendada tsingi ionide kättesaadavust teistele tsinki siduvatele valkudele rakus. (Nanamiya & Kawamura, 2010). Ribosoomid sisaldavad valku L31 A või B vormis erinevates kasvufaasides. Näitena võib tuua *B.subtilis*'e, millel on tuvastatud, et eksponentsiaalses faasis sisaldavad 50S subühikud peamiselt paralooget L36A ja statsionaarses faasis sisaldavad 50S subühikud peamiselt paralooget L36B. Seevastu L31B valgu paralooget leidis nendes ribosoomi fraktsioonides, mis olid eraldatud rakkudest statsionaarses kasvufaasis (Nanamiya & Kawamura, 2010). Pole välistatud, et konkreetsed ribosoomiga liitunud valgud reguleerivad ribosoomi aktiivsust. Kaldutakse arvama, et mõned ribosoomi valgud omavad ekstra-ribosomaalseid funktsioone ning võimaldavad bakteritel toime tulla erinevate kasvutingimustega (Nanamiya & Kawamura, 2010). Samuti on tõenäoline, et need valgud on vajalikud sidumaks mõnda ribosoomseotud faktorit erinevate kasvufaaside ajal. Kaugeltki mitte kõigi ribosoomi valkude funktsioonid pole veel teada (Nanamiya & Kawamura, 2010).

1.3.2 Ribosomaalne valk L36

Kuigi kõrgelt konserveerunud funktsionaalsed piirkonnad ribosoomis koosnevad peamiselt RNA-st, on ka paljud ribosoomi valgud väga konserveerunud. Seega osa ribosomaalseid valke omavad ilmselt ribosoomi funktsioneerimiseks olulist funktsiooni (Maeder & Draper, 2005). Valgud võivad hõlmata RNA valesivoltumise ennetamist kokkupaneku (*assembly*) käigus, RNA konformatsioonimuutuste edendamist translatsiooni käigus ja ribosoomi üldise struktuuri stabiliseerimist (Maeder & Draper, 2005). L36 on üks nendest aluselistest valkudest, mis on bakterites, kloroplastides ja mitokondrites kõrgelt konserveerunud. *E.coli* ribosoomis leiduv valk L36 on kõige väiksem bakteri ribosoomi valk, koosnedes vaid 38st aminohappejäägist (Ikegami, Nishiyama, Matsuyama, & Tokuda, 2005). Ribosoomid koosnevad 50-80 valgust ja kolmest-neljast RNA molekulist. Umbes 30 aluselist valku on seotud ribosoomi suure subühikuga, arvatavasti on need valgud vajalikud rRNA korrektseks kokku pakkimiseks (Maeder & Draper, 2005). Tsink kontrollib L36B transkriptsiooni transkriptsioonifaktor ZUR abil. ZUR on repressor, mis seondub L36B promootorile tsingi juuresolekul, mis takistab transkriptsiooni alustamist. Järelikult L36B geen tsingi juuresolekul ei avaldu. L36A, nagu L31A-gi, sisaldab CxxC (Zn²⁺ sõrme motiiv, mis sisaldab kahte paari tsüsteiini) motiivi, mis arvatakse siduvat tsinki, L36B-l see motiiv puudub (Nanamiya & Kawamura, 2010). Järelikult L36A seob tsinki ja L36B ei seo tsinki. Arvatakse, et L36 käitub nagu alternatiivne ribosoomi valk, mis vahetab algupärase L36A valgu välja limiteeritud tsingi tingimustes L36B valgu vastu (Panina et al., 2003). L36A eemaldamine ribosoomist põhjustab bakterirakkude temperatuuritundlikkuse fenotüüpi ja translatsiooni käigus ribosoomide puudulikkude translokatsiooni (Ikegami et al., 2005). Samuti põhjustab L36A eemaldamine ulatuslikke häireid rRNA tertsiaarstruktuuris (Maeder & Draper, 2005). Samuti võib selle valgu eemaldamine mõjutada ka elongatsioonifaktorite seondumist ribosoomidega. L36A võib anda tertsiaarstruktuurile termodünaamilise stabiilsuse ja arvatakse ka, et L36A-l on oluline roll 23S rRNA struktuuri organiseerimisel (Maeder & Draper, 2005). Töös Ikegami et. al 2005 on väidetakse, et kuigi L36 on laialdaselt konserveerunud nii bakterites, kloroplastides kui ka mitokondrites, pole see oluline ei valgusünteesis ega ribosoomi terviklikkuses, kuid mängib suurt rolli bakteri kiires kasvus. Tuleb märkida, et Ikegami ja kaastöötajad ei näinud efekti, ilmselt selle pärast, et nad ei ole analüüsitud B valke, mistõttu pole ilmselt efekti tänu sellele, et nende katsetes asendab L36B paraloog L36A paraloogse valgu. Arhedel ja eukarüootidel puudub L36, ilmselt on see kompenseeritud rRNA stabiilsema

tertsiaarstruktuuri abil või on L36 puudumine kompenseeritud alternatiivsete valk-RNA interaktsioonidega mujal ribosoomis (Maeder & Draper, 2005).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada bakteritüvesid, milles on deleteeritud L31 nii üks kui ka mõlemad paraloogsete valkude geenid ning bakteritüvesid, milles on deleteeritud L36 üks või mõlemad paraloogsete valkude geenid. Eesmärgiks oli välja selgitada, millistel tingimustel üks või teine paraloogne valk on raku elutegevuseks oluline.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved.

Tüvi	Kommentaar
<i>E.coli</i> MG1655	wt Genotüüp: F ⁻ λ ⁻ ilvG- rfb-50 rph-1 (http://www.genome.wisc.edu/)
<i>E. coli</i> MG1655 Δ31A	Sisaldab 31A geeni asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti
<i>E.coli</i> MG1655 Δ36A	Sisaldab 36A geeni asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti
<i>E.coli</i> MG1655 Δ31A36A	Sisaldab 31A ja 36A geenide asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti
<i>E.coli</i> MG1655 Δ31B	Sisaldab 31B geeni asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti
<i>E.coli</i> MG1655 Δ36B	Sisaldab 36B geeni asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti
<i>E.coli</i> MG1655 Δ31B36B	Sisaldab 31B ja 36B geenide asemel kanamütsiini resistentsuse kassetti

Söötmed:

MOPS vedelsööde (1x MOPS sool (0,190mM NH₄Cl, 27,6mM K₂SO₄, 2mM CaCl₂ * 2H₂O, 250mM MgCl₂, 500mM NaCl), 1,32mM K₂HPO₄, 0,1ml tiamiini (1 mg/ml), 2g sorbitooli, 20 erinevat aminohapet (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml)).

SOC sööde (2% Bacto trüptooni (Difco), 0,5% pärmiekstrakti (Difco), 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glükoosi).

SOB sööde (2% Bacto trüptooni (Difco), 0,5% pärmiekstrakti (Difco), 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄).

Tardsöötmetena kasutati LB söödet (1% trüptoon, 1% NaCl, 0,5% Bacto pärmiekstrakt) ja LB söödet, mis sisaldas kanamütsiini (lõppkontsentratsiooniga 50µg/ml). Tardsöödet valmistati lisades LB söötmele agarit 15 g/l.

Kasutatud plasmiidid:

pKD13 – FRT saitide vahel asub kanamütsiini resistentsusgeen (Datsenko & Wanner, 2000).

pKD46 – Lambda Red rekombinaasi ekspressiooniplasmiid. pKD46 plasmiid töötati välja selleks, et rekombinatsiooni läbi viia, sisaldab arabinoosi poolt indutseeritud exo, bet, gam ja orf60a geene temperatuuritundlikus vektoris, mis püsib alles 30°C juures, kuid kaotatakse 42°C juures (Datsenko & Wanner, 2000).

Kasutatud PCR praimerid:

H1P1 – 5' – CGATGAGCAT GTATCTTTAT CGTTATGTTA TAACATAACA
CGTAAAATG ATGATTCCGG GGATCCGTCG ACC – 3'

H2P2 - 5'- CAAATATCG TTAATCCGTC GAATTTTG AATCAACGTT TTTTCTTACG
ACCTGTAGGC TGGAGCTGCT TCG - 3'

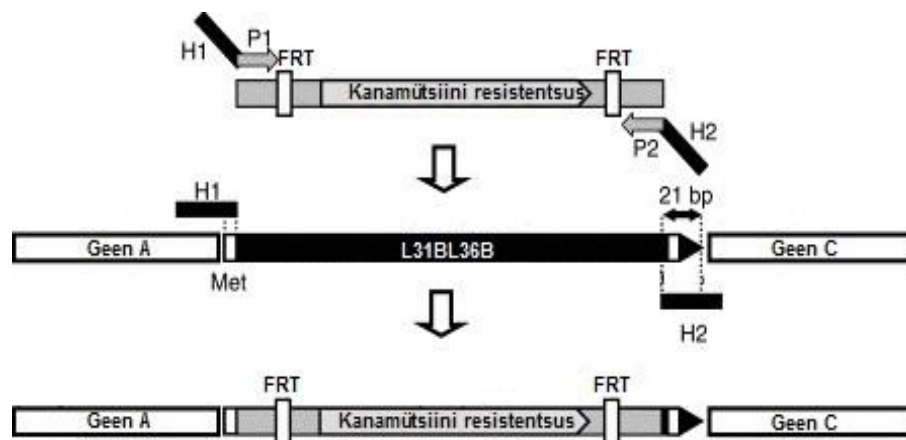
PCR-i (polümeraasi ahelreaktsiooni) produkte kontrolliti geelelektroforeesiga. PCR reaktsioonisegule lisati 1/6 mahtu 6X laadimisvärvi ning proov kanti etiidiumbromiidi (0,25 µg/ml) sisaldavale agarosgeelile 0,5X TAE puhvis (25 mM Tris-atsetaat; 0,5 mM EDTA pH 8,2).

Kõik töös kasutatud elektroforeesid viidi läbi 1% agarosgeelis 0,5X TAE puhvis pingel 120 volti ja DNA visualiseeriti UV-valguses (200-400 nm).

2.2.2 MG1655 Δ 31B36B tüve konstrueerimine

2.2.2.1 PCR praimerite disainimine geeni deletsiooniks

L31B ja L36B valku kodeerivad geenid on *E.coli* genoomis järjestikku ja kattuvad ühe nukleotiidi ulatuses (*The EcoGene database*, www.ecogene.org)(www.ncbi.nlm.nih.gov). Geeni deletsioon viidi läbi nagu kirjeldatud Baba et al., 2006. Praimerid, mida kasutati geeni deletsiooniks olid 50 nukleotiidi ulatuses homoloogsed piirkonnaga, mis jäi märklaudgeenidest (L31B/L36B) kas üles-või allavoolu ning millele järgnes 20 nukleotiidi pikkune järjestus, mis oli komplementaarne kanamütsiini resistentsuse geeni (kan) järjestusega vastavalt üles-või allavoolu (H1P1 ja H2P2)(Joonis 4.). Valgu N terminaalne (DNA 5' ots) praimer koosnes 50 nukleotiidi pikkusest järjestusest, mis jäi sihtmärk geenist ülesvoolu ning mis sisaldas märklaudgeeni initsiatsioonikoodonit. Märklaudgeenist ülesvoolu jääva geeni 50 nukleotiidi pikkune järjestus koos initsiatsioonikoodoniga moodustavad kokku H1 (Joonis 4.). H1-le tuli lisada ülesvoolu veel 20 nukleotiidi pikkune kan järjestust, 5'-**ATTCCGGGGATCCGTCGACC**-3'(P1). Valgu C terminaalne (DNA 3' ots) praimer koosnes 29 nukleotiidi pikkusest järjestusest, mis jäi meid huvitavast märklaudgeenist allavoolu, ning lisaks sihtmärk geeni C-terminaalse osa 21-st nukleotiidist, mis sisaldas endas ka terminatsioonikoodonit - moodustavad kokku H2 (Joonis 4.). H2-le tuleb allavoolu lisada veel 20 nukleotiidi pikkune kan järjestus, 5'-**TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**-3'(P2) (Joonis 4.).



Joonis 4. Praimerite konstrueerimine geenide deletsiooniks bakterigenoomist rekombinatsiooni teel (Baba et al., 2006).

2.2.2.2 DNA fragmentide amplifikatsioon PCR meetodil ja DNA puhastamine agarosgeelist

PCR reaktsioon vajas 50µl segu jaoks 2,5U Taq polümeraasi (*TaKaRa Ex Taq, Takara Shuzo Inc.*), 1-2pg puhastatud pKD13 plasmiidset DNA-d, 1,0 µM mõlemat praimerit ja 200 µM dNTP-d. PCR-i jaoks viidi läbi 30 tsüklit (*TPersonal Thermocycler, Biometra*) 90°C 30sek, 59°C 30sek, 72°C 2min ja peale viimast tsüklit lisaks täiendavalt veel 72°C 2min. Saadud PCR produktid elektroforeesiti agarosgeelis, puhastati geelist *Gel Extraction Kit*'i (Fermentas) abil vastavalt tootja poolt antud protokollile. Agarosgeelist puhastatud DNA fragmente lõigati restriksiooniensüümi DpnI-ga (Fermentas) vastavalt tootja poolt ettenähtud puhvris 1,5h temperatuuril 37°C. Restriksiooni läbinud DNA elektroforeesiti uuesti agarosgeelis, produkt puhastati samamoodi nagu eelnevalt.

2.2.2.3 Elektrokompetentsete rakkude ettevalmistus

5ml-sse LB söötmesse inokuleeriti rakke LB plaadilt, millele olid külvatud *E.coli* rakud, mis sisaldasid pKD46 plasmidi. Üks *E.coli* koloonia ja inkubeeriti 5 tundi kuni üleöö 37°C juures loksutil. Ettekasvatatud bakterikultuur (5ml) külvati ümber 500ml-sse värskesse LB söötmesse ja rakke kasvatati 37°C juures loksutil (200-300 pööret/minutis) kuni optilise tiheduseni (OD₆₀₀) 0,5-0,6. Järgnevalt jahutati rakke 10-15 minutit jääl, misjärel rakud tsentrifugeeriti õrnalt põhja tsentrifugeerimise teel 4200 pööret/minutis 20 minutit temperatuuril 2°C, kasutades Beckman GSA rooorit. Peale supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud 5ml-s jääkülmas mQ-s. 5ml-le suspensioonile tuli lisada veel algkultuuri kogusega võrdne kogus jääkülma mQ-d (5ml) ja seejärel korralikult segada. Rakud tsentrifugeeriti põhja tsentrifugeerimisel 4500 pööret/minutis 2°C juures 10 minutit. Peale tsentrifugeerimise lõppu tuli supernatant kiiresti eemaldada, taaskord lisada 5ml mQ-d ja rakud selles suspendeerida ning tsentrifugeerida veelkord 4500 pööret/minutis 2°C juures 10 minutit. Peale tsentrifugeerimise lõppu tuli supernatant kiiresti eemaldada, lisada 1ml mQ-d ja rakud selles suspendeerida. Rakud tõsteti eelnevalt jahutatud 1,5ml-sse eppendorf tuubi ja tsentrifugeeriti (*Heraeus Fresco*) 4000 pööret/minutis 4°C juures 10 minutit. Supernatant eemaldati, hinnati rakkude mahtu ning rakkude suspendeerimiseks lisati rakuademeega võrdses hulgas jääkülma mQ-d. Rakke hoiti kuni elektroporatsioonini jääl.

2.2.2.4 Transformatsioon elektroporatsiooni meetodil

40µl-le kompetentsetele rakkudele (kirjeldatud eelmises alapealkirjas) lisati 10 ng plasmiidset DNA-d, segu segati kokku jääl. Kompetentsete rakkude ja plasmiidse DNA segu viidi jääkülma

0,2-cm küvetti (*Bio-Rad, Inc.*) ja lisati 50-400ng PCR abil amplifitseeritud DNA-d. Rakke elektroporeeriti 2,5kV, 25mF ja 200 oomi juures, peale elektroporatsiooni lisati küvetti viivitamatult 1ml SOC söödet. Küvetis olev segu pipeteeriti epsi, inkubeeriti 2h 37°C juures ja seejärel külvati 1/10 materjalist kanamütsiini tassile ning inkubeeriti 37°C juures üleöö.

2.2.3 Konkurentsikatsed MG1655 ja deletsioonitüvede vahel

2.2.3.1 Ellujäämus statsionaarses kasvufaasis

Katse alustamiseks tuli erinevad tüved säilituskultuurist plaatidele külvata ning kasvatada 37°C juures üleöö. MG1655 külvati LB tassile ja deletsioonitüved külvati kanamütsiini tassile. Järgmisel päeval külvati igalt plaadilt üks koloonia 2ml MOPS söötmesse (deletsioonitüvedele lisati MOPS söötmesse selektsiooniks ka kanamütsiini, lõppkontsentratsiooniga 25µg/ml) ning kasvatati 37°C juures üleöö. Wt ja deletsioonitüve üleöökultuurist külvati värskesse 2ml MOPS söötmesse 50µl kultuuri ja kasvatati loksutil temperatuuril 37°C. Iga kolme päeva tagant võeti kultuurist proov, lahjendati seda (lahjendused toodud tabelis 2 ja 3) ja külvati 100µl nii LB kui ka kanamütsiini tassidele, tasse inkubeeriti temperatuuril 37°C üleöö ning seejärel loeti tassidele tekkinud kolooniad. Kanamütsiini tassil selekteeriti elujõulised deletsioonitüved, LB tassil moodustasid koloonia kõik elujõulised bakterirakud.

2.2.3.2 Deletsioonide efekt tsüklilise kasvu tingimustes

Katse alustamiseks tuli erinevad tüved säilituskultuurist plaatidele külvata ning kasvatada 37°C juures üleöö. MG1655 külvati LB tassile ja deletsioonitüved külvati kanamütsiini tassile. Järgmisel päeval külvati igalt plaadilt üks koloonia 2ml MOPS söötmesse (deletsioonitüvedele lisati MOPS söötmesse selektsiooniks ka kanamütsiini, kontsentratsiooniga 25µg/ml) ning kasvatati 37°C juures üleöö. Wt ja deletsioonitüve üleöökultuurist külvati värskesse 2ml MOPS söötmesse 50µl kultuuri ja kasvatati loksutil temperatuuril 37°C. Järgmisel päeval külvati 2µl üleöö kasvanud kultuurist värskesse 2ml MOPS söötmesse ja kasvatati üleöö. Bakterikultuuri lahjendati iga 24tunni järel, kümnel päeval. Iga kahe päeva tagant võeti kultuurist proov, lahjendati (lahjendused toodud tabelites 4 ja 5) seda ja külvati 100µl nii LB kui ka kanamütsiini tassidele, tasse inkubeeriti temperatuuril 37°C üleöö ning seejärel loetleti tassidele tekkinud kolooniad. Kanamütsiini tassil selekteeriti elujõulised deletsioonitüved, LB tassil moodustasid koloonia kõik elujõulised bakterirakud.

2.2.4 Tasside pildistamine

Tasside pildistamiseks kasutati digitaalkaamerat (*Seiko Epson Photo PC 3100Z*, 3,3Mpix) ja pilte töödeldi programmiga *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems Incorporated*).

2.3 Tulemused

2.3.1 MG1655 Δ 31B36B tüve konstrueerimine

L31B ja L36B geenide deleteerimiseks kasutati homoloogilist rekombinatsiooni. Homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutati PCR meetodil sünteesitud DNA fragmente, elektrokompetentseid rakke ja rekombinaasi plasmidi. Selleks, et MG1655 tüvest geenid selektiivselt deleteerida, transformeeriti kompetentseid *E.coli* rakke rekombinaasi plasmidi (pKD46) ja PCR-i abil amplifitseeritud DNA seguga. Peale elektroporatsiooni lisati rakkudele SOC söödet ning inkubeeriti 2h 37°C juures, et võimaldada plasmiidilt rekombinaasi ekspressiooni. Peale inkubeerimist külvati 1/10 materjalist kanamütsiini plaadile, kus kolooniaid annavad ainult need rakud, kuhu on geeni asemele integreerunud kanamütsiini resistentsuskassett. Geenideletsiooni kontrolliti PCR-i ja geelelektroforeesi abil. Minul kahjuks ei õnnestunud deletsioonitüve konstrueerimine. MG1655 + Δ 31B36B deletsioonitüvi õnnestus konstrueerida Kai Virumäel.

2.3.2 Ellujäämus statsionaarses kasvufaasis

Konkurentsikatsed viidi läbi eraldi kõigi deletsioonitüvede ja MG1655(wt) vahel. Elujõulisi deletsioonitüvesid selekteeriti kanamütsiini tassil, LB söötmel moodustasid koloonia kõik elujõulised bakterirakud. Katsed viidi läbi kahe sõltumatu paralleelina.

2.3.2.1 L31B ja L36B valgu geenide deleteerimise mõju bakterite kasvule statsionaarses faasis

Statsionaarses kasvufaasis ellujäämise katse tulemused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Statsionaarses kasvufaasis ellujäämise tulemused (loetletud kolooniad). LB tasside kolooniad näitavad kõigi eluvõimeliste rakkude arvu. Kanamütsiini tassil moodustavad koloonia deletsiooni sisaldavad elujõulised rakud.

Väljakülv	3.päev	6.päev	9.päev	12.päev	15.päev
Lahjendus	10^5	10^4	10^4	10^4	10^4
Wt + Δ31B36B					
1)LB	1240	2920	1880	900	188
1)Km	1364	1724	1940	640	8
2)LB	1320	3280	2960	1240	127
2)Km	1464	3000	1640	676	1
Wt + Δ31B					
1)LB	2188	2160	3400	1160	504
1)Km	884	876	2200	1192	0
2)LB	1800	3360	2840	596	541
2)Km	420	395	2360	1920	34
Wt + Δ36B					
1)LB	936	2320	2280	588	89
1)Km	1320	3000	2020	908	1
2)LB	2000	2960	2080	2120	440
2)Km	117	1516	2100	1108	29

Esimese 12 päeva jooksul oli plaatidele külvatud kolooniate arv liiga suur, et näha erinevust deletsiooni ja wt tüve vahel (Tabel 2. 3.-12.päev). Kui LB tassil on juba üle 500 koloonia, siis pole eluvõimeliste rakkude arvu eristamine enam võimalik. Nendes katsetingimustes ei olnud võimalik erinevust tuvastada enne 15.päeva. 15.päeval loendati Km tassidel oluliselt vähem kolooniaid võrreldes LB tassil olevate kolooniatega (Tabel 2. 15.päev), mis viitab sellele, et valgu deletsioonitüvede eluvõime on statsionaarses faasis 15.päevaks oluliselt vähenenud. Sellest järeldub, et ilmselt statsionaarses kasvufaasis ei ole L31B kui ka L36B valgud hädavajalikud, kuid nende olemasolu aitab bakterirakkudel taluda statsionaarset kasvufaasi. 15.päeval oli kolooniate arv langenud ka LB tassidel, kuid Km tasside kolooniate arv oli oluliselt rohkem vähenenud.

2.3.2.2 L31A ja L36A valgu geenide deleteerimise mõju bakterite kasvule statsionaarses faasis

Statsionaarses kasvufaasis ellujäämuse katse tulemused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Statsionaarses kasvufaasis ellujäämuse tulemused (loetletud kolooniad). LB tassidele tekkinud kolooniad näitavad kõigi külvatud eluvõimeliste rakkude arvu. Kanamütsiini tassil kasvavad vaid deletsiooni sisaldavad elujõulised rakud.

Väljakülv Lahjendus	3.päev 10a5	6.päev 10a5	9.päev 10a4
Wt ja Δ31A			
1)LB	1136	1880	2280
1)Km	1680	992	1640
2)LB	2028	1476	3360
2)Km	1480	1140	2320
Wt ja Δ36A			
1)LB	1664	1292	1640
1)Km	1000	159	46
2)LB	1304	1440	1440
2)Km	524	272	40
Wt ja Δ31A36A			
1)LB	1352	1200	1840
1)Km	66	11	26
2)LB	688	628	1360
2)Km	1312	680	1280

L31A ja L36A valgu deletsioonitüvede eluvõime oli vähenenud võrrelduna wt tüvega. Statsionaarses faasis kasvatades on eri deletsioonitüvede efektid erinevad (Tabel 3. 3.-9.päev). Erinevused esinevad ka deletsioonitüvede paralleelide vahel (Tabel 3. 3.-9.päev). Suurimat defekti põhjustab L36A valgu kodeeriva geeni ning korruga mõlema A valgu kodeeriva geeni deletsioon (Tabel 3.). Olenemata varieeruvustest võib järeldada, et statsionaarses kasvufaasis kasvatades on L31A kui ka L36A valgud hädavajalikud.

2.3.3 Deletsioonide efekt tsüklilise kasvu tingimustes

Konkurentsikatsed viidi läbi eraldi kõigi deletsioonitüvede ja MG1655(wt) vahel. Deletsioonitüvesid selekteeriti kanamütsiini tassil, LB söötmel moodustasid koloonia kõik elujõulised bakterirakud. Katsed viidi läbi kahe sõltumatu paralleelina.

2.3.3.1 L31A ja L36A valgu geenide deleteerimise mõju bakterite kasvule tsüklilise kasvu tingimustes

Tulemused tsüklilise kasvu mõjust bakterite kasvule on toodud tabelis 4, joonistel 5 ja 6 ning lisades 1.

Tabel 4. Tsüklilise kasvu mõju bakterite kasvule (loetletud kolooniad). LB tasside kolooniad näitavad kõigi eluvõimeliste rakkude arvu. Kanamütsiini tassil kasvavad vaid deletsiooni sisaldavad elujõulised rakud.

Väljakülv Lahjendus	2.päev 10 ⁵	4.päev 10 ⁵	6.päev 10 ⁵	8.päev 10 ⁵	10.päev 10 ⁵
Wt + Δ31A36A					
1)LB	3560	2464	2232	2680	4160
1)Km	44	0	0	0	0
2)LB	1400	1384	2268	3160	3160
2)Km	1096	1560	416	163	7
Wt + Δ31A					
1)LB	2596	2760	2636	6080	2920
1)Km	3440	3120	1752	2240	299
2)LB	1840	2840	1740	3240	2760
2)Km	2600	2520	1908	2640	1412
Wt + Δ36A					
1)LB	1240	1916	1692	3480	2172
1)Km	284	22	2	0	0
2)LB	2800	1700	2312	3040	1632
2)Km	74	0	0	0	0

Katse alguses (Tabel 4. 2.päev)(Joonis 5, 6 ja lisa 1) oli juba näha suurt erinevust deletsiooni ja wt tüve vahel. L31A ja L36A valgu deletsioonitüvede eluvõime oli oluliselt vähenenud võrrelduna wt tüvega. Tsükliliselt kasvatades on eri deletsioonitüvede efektid erinevad (Tabel 4. 2.-10.päev)(Joonis 5, 6 ja lisa 1). Erinevused esinevad ka deletsioonitüvede paralleelide vahel (Tabel 4. 2.-10.päev). Suurimat defekti põhjustab L36A valgu kodeeriva geeni ning korraga

mõlema A valku kodeeriva geeni deletsioon (Tabel 4. Joonis 5, 6 ja lisa 1). Olenemata varieeruvustest võib järeldada, et tsükliliselt kasvatades on L31A kui ka L36A valgud hädavajalikud.

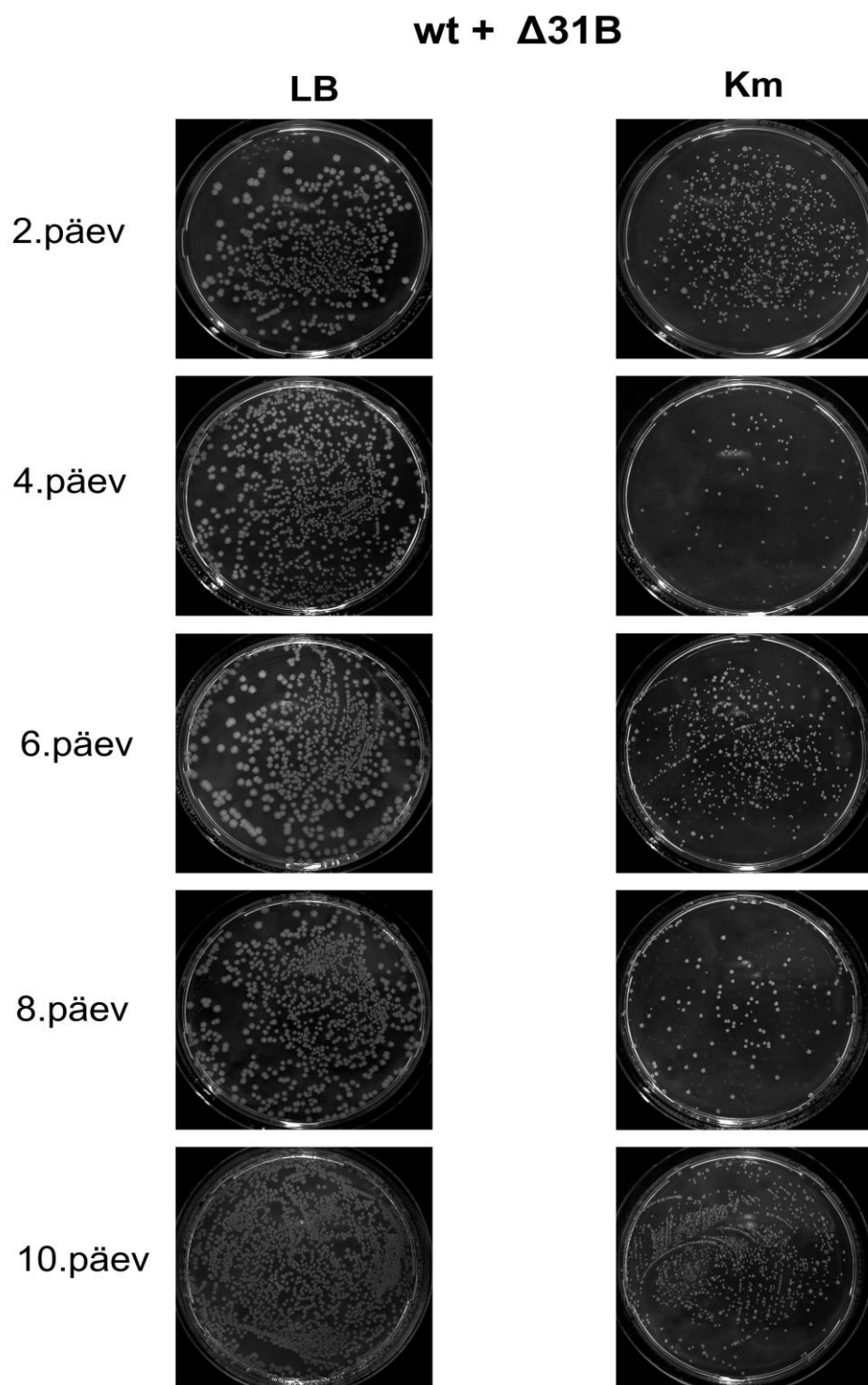
2.3.3.2 L31B ja L36B valgu geenide deleteerimise mõju bakterite kasvule tsüklilise kasvu tingimustes

Tulemused tsüklilise kasvu mõjust bakterite kasvule on toodud tabelis 5, joonisel 7 ning lisades 2 ja 3.

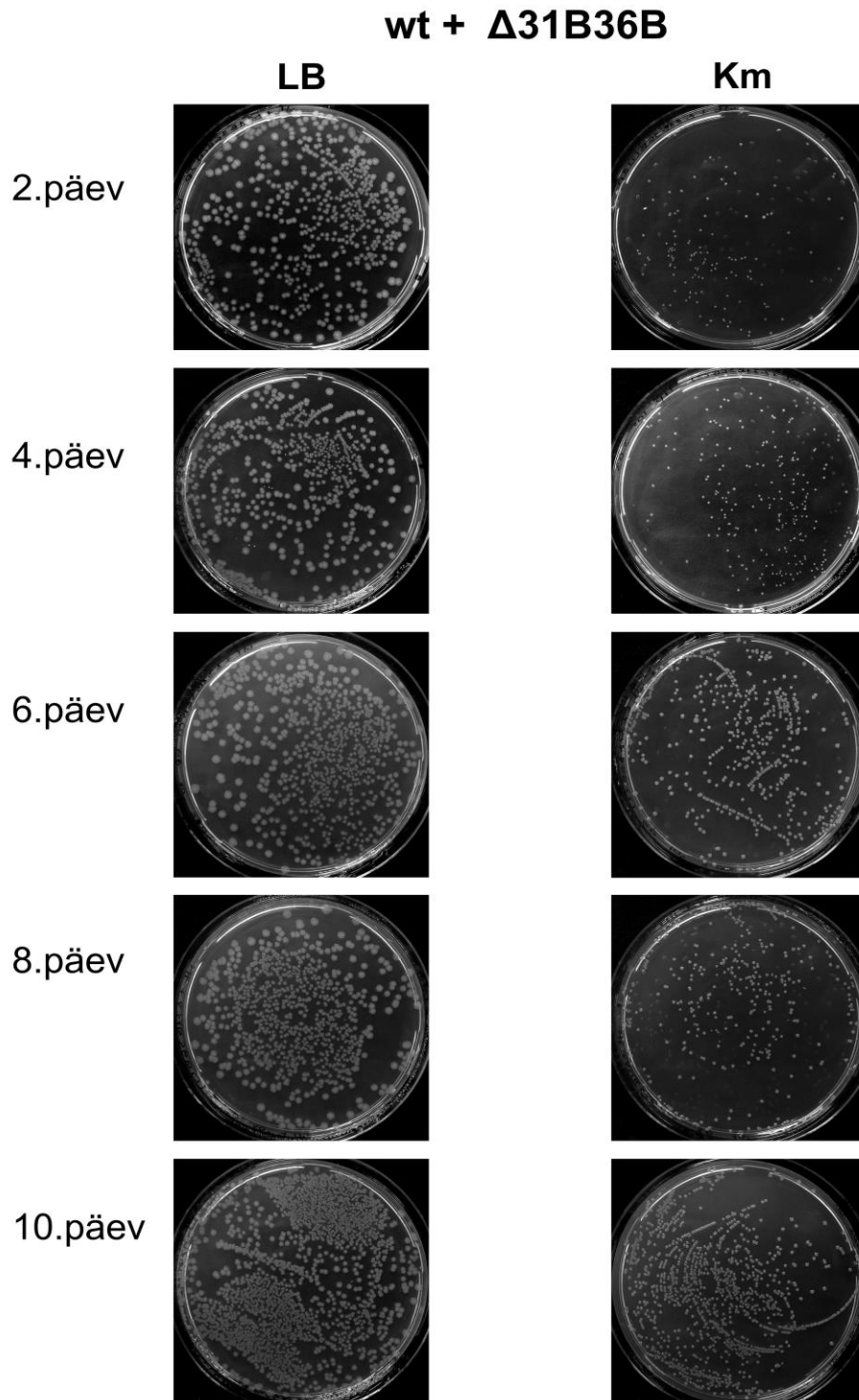
Tabel 5. Tsüklilise kasvu mõju bakterite kasvule (loetletud kolooniad). LB tassidel kasvanud kolooniad näitavad kõigi eluvõimeliste rakkude arvu. Kanamütsiini tassil kasvavad vaid elujõulised deletsiooni sisaldavad rakud.

Väljakülv	2.päev	4.päev	6.päev	8.päev	10.päev
Lahjendus	10a5	10a5	10a5	10a5	10a5
Wt ja Δ31B					
1)LB	920	1256	1200	1280	1600
1)Km	728	64	660	141	1280
2)LB	900	796	1400	904	1376
2)Km	848	119	1320	90	201
Wt ja Δ36B					
1)LB	912	1004	604	1396	2160
1)Km	824	12	656	2	32
2)LB	1728	1948	1760	1560	1135
2)Km	1320	1732	1640	1120	1120
Wt ja Δ31B36B					
1)LB	964	1040	1120	1096	2480
1)Km	123	214	900	1004	2088
2)LB	784	1528	1400	924	3080
2)Km	131	249	776	344	1748

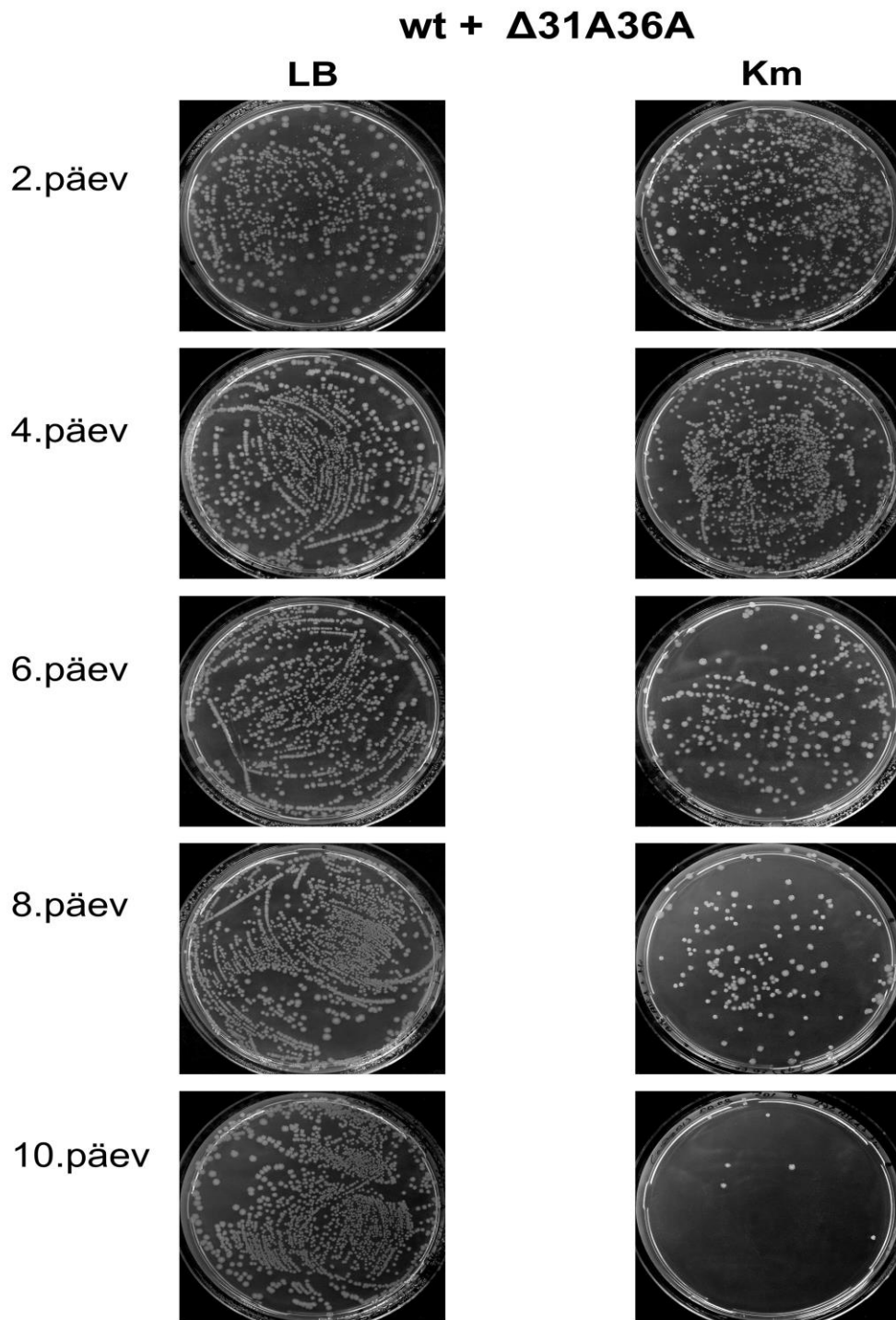
Katse tulemustest on näha, et tsüklilise kasvu korral oli L31B ja L36B valgu deletsioonitüvede eluvõime vähenenud võrrelduna wt tüvega (Tabel 5.). Tsükliliselt kasvatades on eri deletsioonitüvede efektid erinevad (Tabel 5. 2.-10.päev)(Joonis 7, lisa 2 ja 3). Erinevused esinevad ka deletsioonitüvede paralleelide vahel (Tabel 5. 2.-10.päev). Suurimat defekti põhjustab L36B valku kodeeriva geeni deletsioon.



Joonis 5. Konkurentsikatse tulemused Δ 31B geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel. Erinevatel päevadel tehti lahjendused, mõlemale plaadile külvati sama kogus bakterikultuuri. Tasse kasvatati samades tingimustes. LB tassil kasvas nii wt kui deletsioonitüvi, kanamütsiini tassil kasvas ainult deletsioonitüvi.



Joonis 6. Konkurentsikatse tulemused Δ 31B36B geenide deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel. Erinevatel päevadel tehti lahjendused, mõlemale plaadile külvati sama kogus bakterikultuuri. Tasse kasvatati samades tingimustes. LB tassil kasvas nii wt kui deletsioonitüvi, kanamütsiini tassil kasvas ainult deletsioonitüvi.



Joonis 7. Konkurentsikatse tulemused Δ 31A36A geenide deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel. Erinevatel päevadel tehti lahjendused, mõlemale plaadile külvati sama kogus bakterikultuuri. Tasse kasvatati samades tingimustes. LB tassil kasvas nii wt kui deletsioonitüvi, kanamütsiini tassil kasvas ainult deletsioonitüvi.

2.4 Arutelu

Varem läbi viidud katsed *Bacillus subtilis* 'ega on näidanud, et ribosoomivalkude L31 kui ka L36 nii A kui ka B vormide esinemine ribosoomis sõltub tsingi olemasolust keskkonnas (Nanamiya & Kawamura, 2010). Valkude L31 ja L36 A vormid sisaldavad CxxC motiive, mis arvatakse siduvat tsinki, B vormidel need motiivid puuduvad ja ilmselt nad ei seo tsinki (Panina et al., 2003). Eksponeentsiaalse kasvu vältel tsinki sisaldavas söötmes sisaldab ribosoom valgu L31 A paralooži, millel on tsinki siduv motiiv. Aktiivne ZUR repressor valk seondub tsingi olemasolul L31B promotorigil olevale järjestusele, mis kannab nime ``ZUR box`` ja see represserib L31B ekspressiooni (Nanamiya & Kawamura, 2010). ``ZUR box`` järjestus on väga konserveerunud nendes geenides, mis on ZURi poolt reguleeritud, näiteks – L31B ja L36B valkude geenid (Nanamiya & Kawamura, 2010). Eksponeentsiaalse kasvu lõpuks (jõudes statsionaarsesse faasi), kui söötmest on tsink otsakorral, ei saa ZUR enam promotorigile seonduda, kuna pole piisavas koguses tsingi ioone - L31B ekspressioon ei ole enam pärsitud (Nanamiya & Kawamura, 2010). Värskest sünteesitud L31B omab ribosoomi suure subühiku suhtes palju kõrgemat afiinsust võrreldes L31A-ga ehk teisisõnu valk L31B vahetab valgu L31A välja. L31A vabastatakse 50S subühikust ja degradeeritakse tundmatu proteaasi poolt (Nanamiya & Kawamura, 2010). Käesoleva töö eesmärk oli L31 ja L36 valgudeletsioonide abil välja selgitada, millise eelise annab ühe või teise valgu olemasolu *E.coli* rakkudele erinevates kasvutingimustes. Selles töös uuriti deletsioonitüvede elujõulisust erinevates *E.coli* rakkude kasvutingimustes võrreldes wt tüvega. Konkurentsikatsed viidi läbi nii tsükliliselt kasvatades kui ka statsionaarses kasvufaasis kasvatades.

Statsionaarses kasvufaasis kasvatades esimesel 12.päeval B valkude deletsioonide poolt põhjustatud kasvudefekte ei tuvastatud (Tabel. 2). Siiski ei saa me välistada, et L31B ja L36B valkude deletsiooni poolt põhjustatud kasvudefekt võis puududa meie poolt valitud katsetingimuste tõttu. Kuna LB plaatidele plaaditud bakterikultuuri lahjendused olid liiga väikesed, siis on võimalik, et efekt oli olemas, kuid jäi liiga väikesest lahjendusest põhjustatud liigse arvu kolooniate varju. Kui tassidel on juba üle 500 koloonia, siis pole eluvõimeliste rakkude arvu eristamine enam võimalik, tulemus pole relevantne. Olenemata sellest, kas meie katsetingimused olid optimaalsed või mitte, saame siiski väita, et B valgud ei ole bakterirakkude elujõulisuse seisukohalt hädavajalikud, kuna selektsiooniplaadilt loendati enne 15.päeva palju kolooniad, mis näitab seda, et rakud on jätkuvalt suhteliselt elujõulised. Rakkude elujõulisuse vähenemist saab täheldada alles 15. päevast (Tabel 2.). Sellest järeldub, et ilmselt statsionaarses

kasvufaasis ei ole L31B kui ka L36B valgud hädavajalikud, kuid nende olemasolu aitab bakterirakkudel taluda statsionaarsest kasvufaasist tingitud mõjusid. Võimalik, et L31 ja L36 B valgud on vajalikud selleks, et rakud suudaksid toime tulla statsionaarses kasvufaasis tekkiva oksüdatiivse stressiga.

Erinevalt L31 ja L36 B paraloogide deletsioonist, omavad A paraloogide deletsioonid statsionaarses kasvufaasis kasvatades rakkude elujõulisusele erinevat mõju (Tabel 3. 3.-9.päev). Suurimat kasvudefekti on näha, kui puudu on L36A valk või mõlemad A valgud. 9.päevaks on L36A ja mõlema A valgu deletsioonikolooniad oluliselt vähem võrrelduna wt tüvega. L31A valgu eemaldamine nendes katsetingimustes efekti ei andnud. Võimalik, L31A valgudeletsioon ei oma statsionaarses kasvufaasis efekti või on see efekt väike ja jääb meie katsetingimustes märkamata. L36A valgudeletsiooni efekti statsionaarses kasvufaasis tuleb veel kontrollida. Topeltdelletsiooniga bakteritüve elujõulisuse tulemus viitab ka pigem sellele, et L31A valgu deletsioon ei põhjusta suurt defekti statsionaarses faasis, kuid võimendab natuke defekti, mille põhjustab L36A valgu deletsioon (Tabel 3.). Tuleb ka mainida, et erinevused esinesid ka L31A ja L36A deletsioonitüvede paralleelide vahel (Tabel 3. 3.-9.päev), mis võib olla põhjustatud meie poolt valitud katsetingimuste poolt. Olenemata varieeruvustest võib siiski järeldada, et statsionaarses kasvufaasis kasvatades on L31A kui ka L36A valgud hädavajalikud rakkude kasvamiseks.

Tsüklilise kasvatamise korral oli juba katse alguses näha suurt erinevust valkude L31 ja L36 A vormide deletsiooni ja wt tüve vahel (Tabel 4. 2.päev)(Joonis 7, lisa 2 ja 3). Deletsioonitüvede kolooniaid oli juba teisel päeval väga vähe võrrelduna wt tüvega, mis näitab seda, et A valkude deletsioon mõjutab bakteri eluvõimelisust tsüklilise kasvu korral. Suurimat defekti põhjustas L36A valku kodeeriva geeni ning korraka mõlema A valku kodeeriva geeni deletsioon (Tabel 4. Joonis 7, lisa 2 ja 3). Kui eemaldatud oli ainult L31A valku kodeeriv geen, siis see erilist efekti ei põhjustanud, tõenäoline seletus sellele on, et kusagil genoomis võis olla tekkinud kompenseeriv mutatsioon või selle valgu deletsioon ei põhjusta tsüklilise kasvu tingimustes efekti. Topeltdelletsiooniga bakteritüve elujõulisuse tulemus viitab pigem sellele, et L31A valgu deletsioon ei põhjusta suurt defekti tsükliliselt kasvatades, kuid võimendab natuke defekti, mille põhjustab L36A valgu deletsioon. Et kontrollida L31A valgu deletsiooni mõju rakkude kasvule tsüklilise kasvu tingimustes, tuleb teha täiendavaid katseid. Olenemata varieeruvustest katseseeriade vahel võib järeldada, et tsüklilistes kasvutingimustes on L31A kui ka L36A valgud bakterirakkude eluvõime seisukohalt hädavajalikud.

Katsetulemustest on näha, et tsüklilise kasvatamise korral oli L31B ja L36B valgu deletsioonitüvede eluvõime vähenenud võrrelduna wt tüvega (Tabel 5.). Sellest järeldeb, et nende valkude eemaldamine mõjutab bakterite elujõulisust tsüklilistes kasvutingimustes. Tsükliliselt kasvatades olid L31B ja L36B deletsioonitüvede efektid erinevad (Tabel 5. 2.-10.päev)(Joonis 5, 6 ja lisa 1). Suurimat defekti põhjustas L36B valgu kodeeriva geeni deletsioon. Peab mainima, et erinevused esinevad ka deletsioonitüvede paralleelide vahel (Tabel 5. 2.-10.päev), mis võivad olla põhjustatud meie poolt valitud katsetingimuste poolt. Kuna 10.päevaks (Tabel 5.) on B deletsioonitüvede kolooniaid rohkem kui A deletsioonitüvede kolooniaid (Tabel 4.) näitab see seda, et L31B ja L36B valgud pole tsüklilistes kasvutingimustes rakkudele vajalikud, et elujõulised püsida. Statsionaarses kasvufaasis kasvatades ei tulnud efektid nii kiiresti välja kui tsüklilise kasvatamise korral, mis näitab, et L31A ja L36A valgud on olulised adapteerumisel. L31B ja L36B valkude omadusi tuleb veel uurida.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada bakteritüvesid, milles on puudu(deleteeritud) valgu L31 nii üks kui ka mõlemad paraloogsed geenid ning bakteritüvesid, milles on puudu(deleteeritud) valgu L36 üks või mõlemad paraloogsed geenid, erinevates kasvutingimustes.

Deletsioonitüvede ja wt tüve vahel viidi läbi konkurentsikatsed. Konkurentsikatsed viidi läbi seetõttu, et näha, kas deletsioonitüved on võimelised konkureerima wt tüvedega erinevates kasvutingimustes. Uuriti deletsioonitüvede eluvõimelisust nii statsionaarses kasvufaasis kui ka tsükliliselt kasvatades võrrelduna wt tüvega, need tingimused võimaldasid uurida nende valkude deletsiooni efekti rakkude eluvõimele erinevates kasvutingimustes. Oluline oli välja selgitada, mis eeliseid annab rakukultuurile ühe või teise valgu olemasolu ribosoomis. Käesoleva töö tulemused näitasid, et tsükliliselt kasvatades ei ole valgud L31B kui ka L36B hädavajalikud raku elutegevuseks, kuid nende olemasolu aitab rakkudel paremini hakkama saada. Valgud L31A kui ka L36A on tsükliliselt kasvatades hädavajalikud, nende eemaldamine mõjub rakkudele elulemusele negatiivselt, rakkude eluvõime on võrreldes metsiktüübiga tugevasti häiritud ning deletsioon põhjustab aja jooksul eluvõimeliste rakkude kadumise ehk siis metsiktüüpi rakud konkureerivad valgudeletsiooniga rakud rakukultuurist välja. Statsionaarses faasis ei ole valkude L31B ega L36B deletsioonidel olulist mõju raku elutegevusele, kuid ilmselt nende valkude olemasolu aitab rakkudel paremini taluda statsionaarsest kasvufaasist tingitud oksüdatiivset stressi. Valkude L31A ja samuti ka L36A olemasolu on vajalik, et statsionaarses kasvufaasis eluvõimeline püsida. L31 ja L36 valkude A paraloogide puudumine ribosoomist viib aja jooksul eluvõimelisuse kadumiseni nii tsükliliselt kasvatamise kui ka statsionaarselt kasvatamise korral.

Paralogous ribosomal proteins L31/L36 and their characterization in

Escherichia coli

Heili Anni

Summary

mRNA is decoded into a protein in a cytoplasmic organelle called ribosome. Ribosome consists of two subunits – small and large: 30S and 50S in prokaryotes and 40S and 60S in eukaryotes. Subunits are asymmetric and made of ribosomal proteins and rRNA. Ribosome contains three binding sites tRNAs, termed the aminoacyl-tRNA site (A site), peptidyl-tRNA site (P site) and exit-tRNA site (E site). These three binding sites are located in the interface between 30S and 50S subunits. Translation in ribosomes consists of three stages – initiation, elongation and termination. First step is initiation, which in bacteria involves the interaction between 30S subunit and Shine-Dalgarno sequence, that is located in bacterial mRNA. Start of initiation needs three initiation factors (IF1, IF2 and IF3). Next step is elongation, this is the stage where protein chain is being extended until the stopcodon reaches into the A site. In bacteria two different terminationfactors (RF1 and RF2) recognize the stopcodons. After termination synthesized protein and also both mRNA and tRNA are released from the ribosome and ribosome is being dissociated into two subunits.

In this work, we studied the effect of deletion of two ribosomal proteins, L31 and L36, both proteins (L31 and L36) are located in the large subunit. L31 and L36 are special because both of them are presented in ribosome in two forms – A and B, these forms are called paralogs. The aim of this study was to find out whether the ribosomes, where one or both paralogous proteins of L31 and L36 have been removed, can compete with wildtype cells in different growth conditions.

We carried out two competition growth tests between wildtype and deletion strains. We studied how deletion strains can manage in stationary growth phase and in cyclic growth compared to wildtype. Test results showed that in cyclic growth proteins L31B and L36B are not essential for survival of the deletion strain but L31A and L36A are essential to maintain the viability. In stationary growth phase proteins L31B and L36B are not essential for survival but help to tolerate the stress in the stationary growth phase. Proteins L31A and L36A seem to have important role in stationary growth phase.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aitken, C. E., & Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 568–76.
- Antoun, A., Pavlov, M. Y., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2006). How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis. *Molecular Cell*, 23(2), 183–93.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.
- Byrgazov, K., Vesper, O., & Moll, I. (2013). Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 133–9.
- Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., Gutell, R. R. (2002). The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, 3, 2.
- Carter, a. P. (2001). Crystal Structure of an Initiation Factor Bound to the 30S Ribosomal Subunit. *Science*, 291(5503), 498–501.
- Das, G., & Varshney, U. (2006). Peptidyl-tRNA hydrolase and its critical role in protein biosynthesis. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 8), 2191–5.
- Datsenko, K. a, & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–5.
- Dunkle, J. A., & Cate, J. H. D. (2013). An Introduction to the Structure and Function of the Ribosome, 1–12.
- Freistroffer, D. V, Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., & Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *The EMBO Journal*, 16(13), 4126–33.
- Green, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 679–716.
- Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29(25), 5881–9.

- Hartz, D., Binkley, J., Hollingsworth, T., & Gold, L. (1990). Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by Escherichia coli IF3. *Genes & Development*, 4(10), 1790–1800.
- Ikegami, A., Nishiyama, K., Matsuyama, S., & Tokuda, H. (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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1595–602.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–27.
- Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H., & Ehrenberg, M. (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Molecular Cell*, 3(5), 601–9.
- Kisselev, L. L., & Buckingham, R. H. (2000). Translational termination comes of age. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(11), 561–6.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Yutin, N., & Puigbo, P. (2012). Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins, 7(5).
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.-C., Moras, D., & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Research*, 30(24), 5382–90.
- Maeder, C., & Draper, D. E. (2005). A small protein unique to bacteria organizes rRNA tertiary structure over an extensive region of the 50 S ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology*, 354(2), 436–46.
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. a, & 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 Biology*, 2(9), RESEARCH 0033.
- Mears, J. a., Cannone, J. J., Stagg, S. M., Gutell, R. R., Agrawal, R. K., & Harvey, S. C. (2002). Modeling a Minimal Ribosome Based on Comparative Sequence Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 321(2), 215–234.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 560–7.
- Nanamiya, H., & Kawamura, F. (2010). Towards an Elucidation of the Roles of the Ribosome during Different Growth Phases in Bacillus subtilis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(3), 451–461.

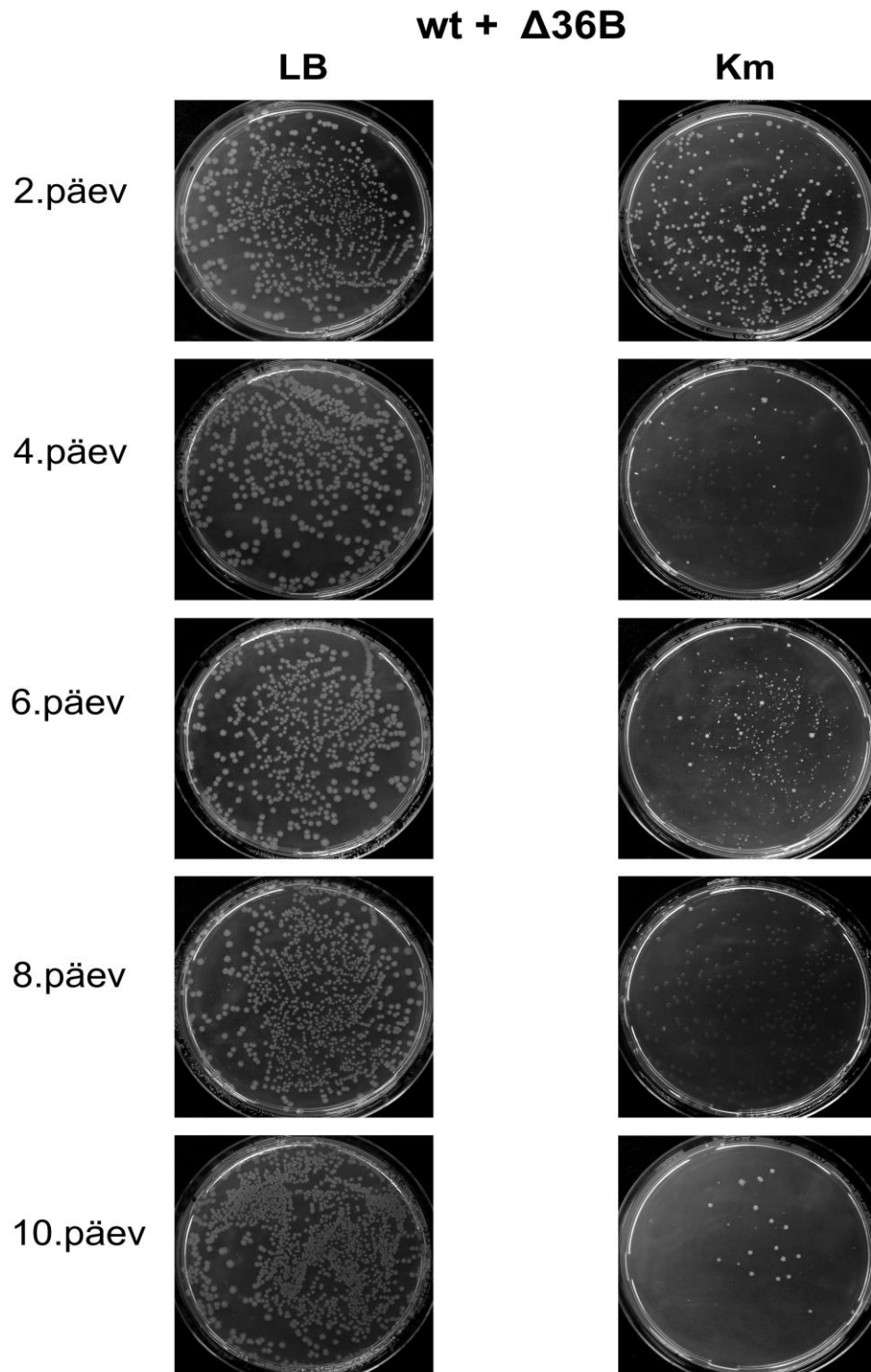
- Nierhaus, K. H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes KH Nierhaus. *Biochimie*, 73(6), 739–755.
- Panina, E. M., Mironov, A. a, & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9912–7.
- Ramakrishnan, V., Road, H., Kingdom, U., & Heel, V. (2002). Ribosome Structure and the Mechanism of Translation, *108*, 557–572.
- Rodnina, M. V, & Wintermeyer, W. (2001). FIDELITY OF AMINOACYL-tRNA SELECTION ON THE RIBOSOME : Kinetic and Structural.
- Schmeing, T. M., & Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461(7268), 1234–42.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V, Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), 1935–42.
- Zaman, S., Fitzpatrick, M., Lindahl, L., & Zengel, J. (2007). Novel mutations in ribosomal proteins L4 and L22 that confer erythromycin resistance in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 66(4), 1039–50.
- Tomsic, J., Vitali, L. a, Daviter, T., Savelsbergh, a, Spurio, R., Striebeck, P., Gualerzi, C. O. (2000). Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *The EMBO Journal*, 19(9), 2127–36.
- Vila-sanjurjo, A. (2013). Modification of the Ribosome and the Translational Machinery during Reduced Growth Due to Environmental Stress, 1–16.
- Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 243–67.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Jr, W. M. C., Morgan-warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit, 327–339.
- Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., & Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, 106(2), 233–41.
- Yusupova, G., & Yusupov, M. (2014). High-Resolution Structure of the Eukaryotic 80S Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, (February), 1–20.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov
2. The EcoGene database, www.ecogene.org
3. *E.coli* genome project, <http://www.genome.wisc.edu>

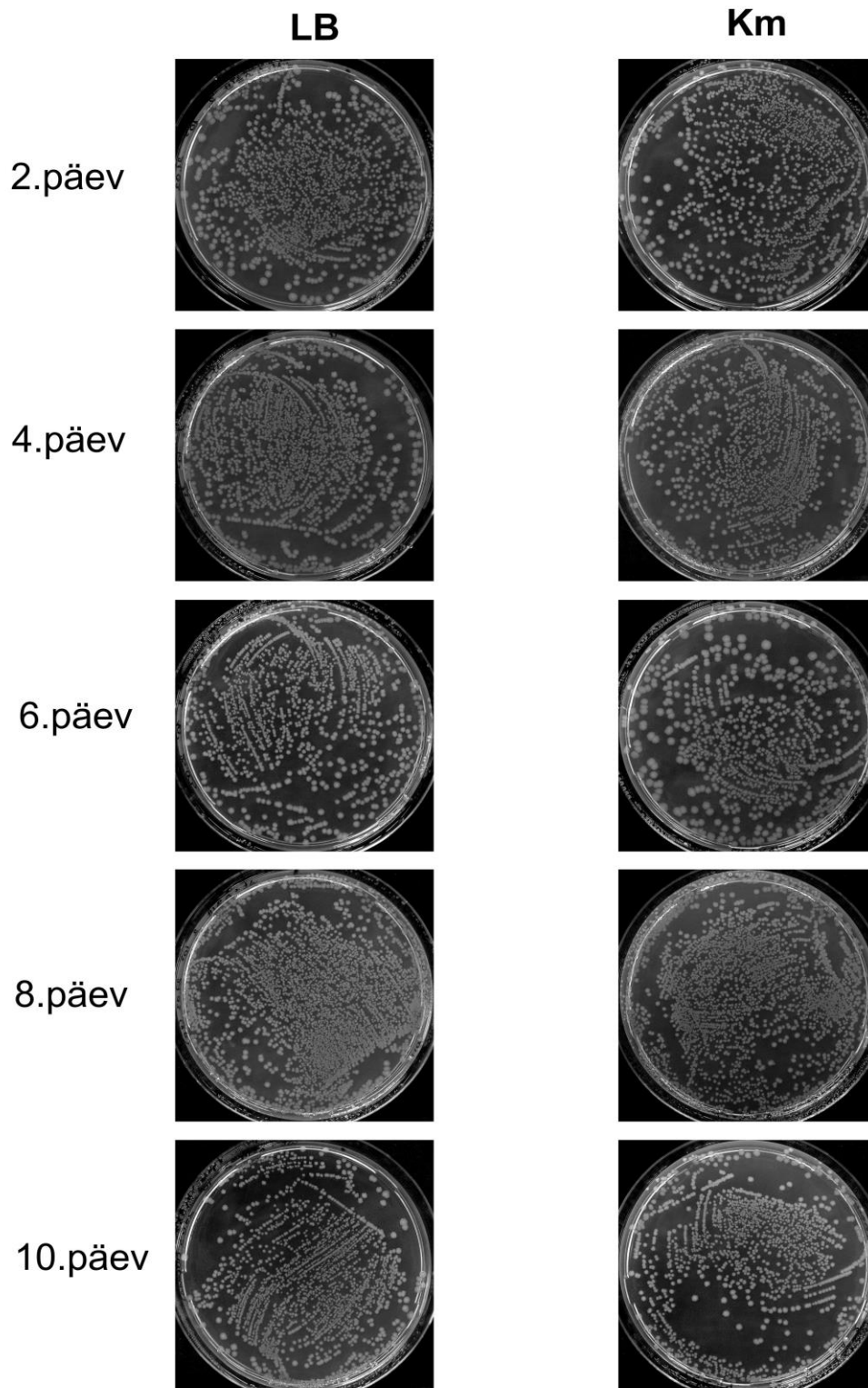
LISAD

LISA 1 Konkurentsikatse tulemused $\Delta 36B$ geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel

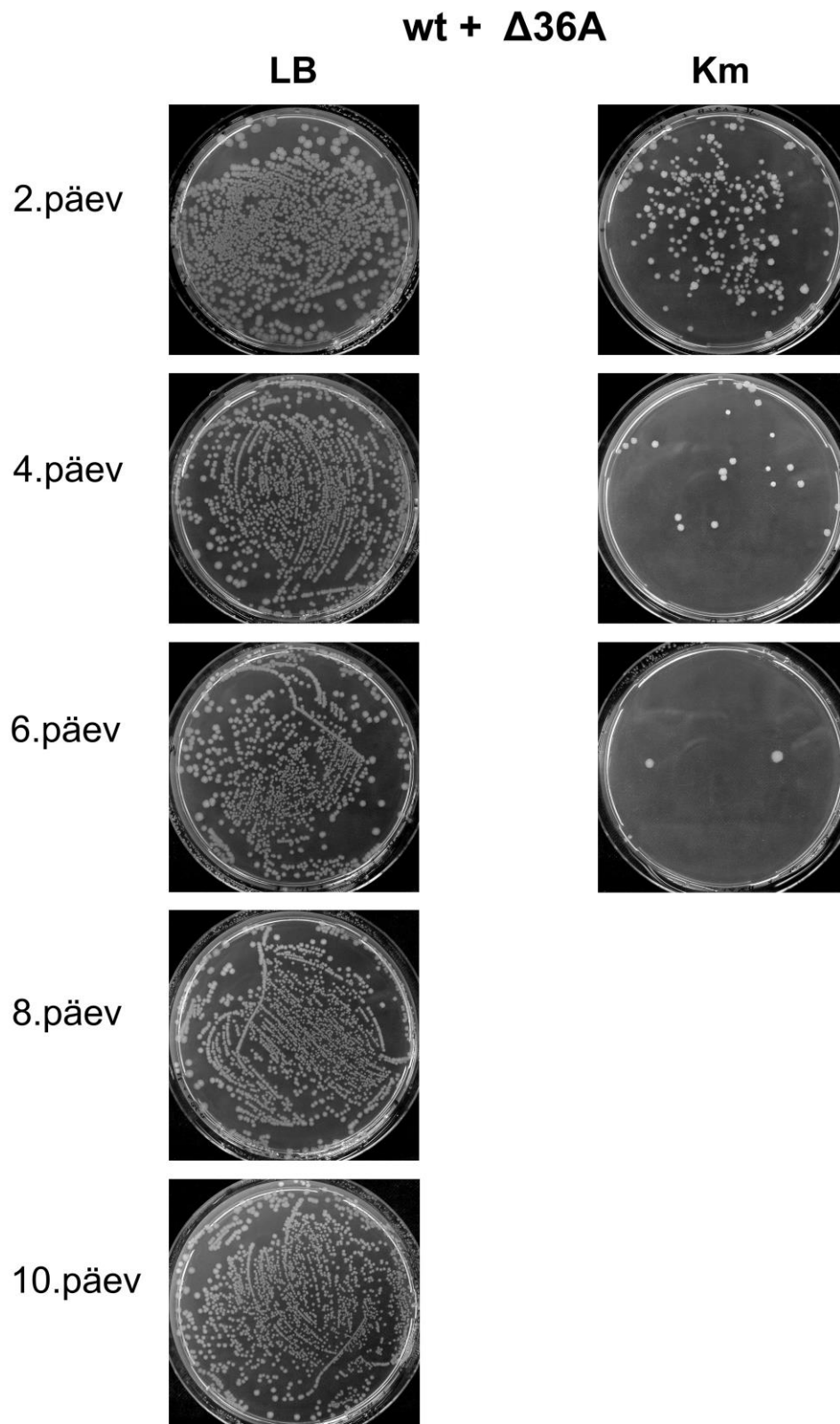


LISA 2 Konkurentsikatse tulemused $\Delta 31A$ geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel

wt + $\Delta 31A$



LISA 3 Konkurentsikatse tulemused $\Delta 36A$ geeni deletsiooniga tüve ja wt tüve vahel



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Heili Anni

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 21.02.1992)

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

Ribosoomivalkude (L31/L36) paraloogide iseloomustamine *Escherichia colis*

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajateks on Margus Leppik ja Kai Virumäe

(juhendaja nimi)

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu 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, 26.05.2014 (kuupäev)