

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadri Torp

Ribosoomide variatsioonid ja seos antibiootikumide tundlikkusega

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: prof. Jaanus Remme

MSc Kai Virumäe

Tartu 2014

SISUKORD

Sissejuhatus	4
1. Valdkonna ülevaade	6
1.1. Ribosoomi valgud <i>Escherichia coli</i> ja <i>Bacillus subtilis</i> näitel.....	6
1.1.1. Ribosoomi valk S12	6
1.1.2. Ribosoomi valk S5	6
1.1.3. Ribosoomi valgud S4 ja S5.....	7
1.1.4. Ribosoomi valgud L4 ja L22.....	7
1.1.5. Ribosoomi valk L36.....	9
1.2. Paraloogvalgud	10
1.2.1. Paraloogvalgud pärmides	10
1.2.2. Paraloogvalgud taimedes	11
1.2.3. Paraloogvalgud imetajate näitel.....	12
1.2.4. Paraloogvalkude roll bakteri <i>Bacillus subtilis</i> näitel.....	13
1.3. Ribosoom kui antibiootikumide märklaud	14
1.3.1. Antibiootikumide seundumissaidid ribosoomil	14
1.3.2. 30S subühikut ründavad antibiootikumid	17
1.3.3. 50S subühikut ründavad antibiootikumid	18
1.3.4. Kasutatavate antibiootikumide tutvustus	19
2. Eksperimentaalosa	23
2.1. Töö eesmärk	23
2.2. Materjalid ja meetodika	23
2.2.1. Töös kasutatud tüved	23
2.2.3. <i>E. coli</i> tüvede eeltötlus ja antibiootikumilahuste valmistamine	24
2.2.4. Antibiootikumide lahjendusrea valmistamine.....	24
2.2.5. Lahjendatud <i>E. coli</i> tüvede mikrotiiterplaadile kandmine	25
2.2.6. MIC-i määramine.....	26
3. Tulemused ja arutelu	27

3.1. E. coli mutanttüvede võrdlus antibiootikumide tundlikkusele	28
Kokkuvõte	31
Variations of ribosomal proteins and their relation with antibiotic resistance	32
Tänuavaldused	33
Kirjanduse loetelu	34
Kasutatud veebiaadressid	42
Lisa 1.....	43
Lihlitsents.....	44

Sissejuhatus

Valgusünteesiks nimetatakse protsessi, mille tulemusena sünteesitakse vastavalt mRNA-s sisalduvale geneetilisele informatsioonile valke ehk polüpeptiide. Süntees toimub raku organellis, mida nimetatakse ribosoomiks. Ribosoom kujutab endast partiklit, mis katalüüsib sobiva mRNA ja sellele vastavale tRNA molekuli vahele peptiidsideme (Zimmermann ja Maguire, 2001). Ribosoomi jõuavad aminohappe monomeerid aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) kujul, mis liigub kompleksis elongatsiooni faktori Tu (EF-Tu) ja GTP-ga ribosoomi A-saiti. Aa-tRNA reageerib peptidüül-tRNA-ga ning selle tulemusena moodustub peptiidside. Ainult õige paardumise korral GTP hüdrolyüsib GDP-ks ja saab moodustuda peptiidside. Pärast peptiidsideme sünteesi lahkub EF-Tu GDP kompleks ribosoomist. Nüüd paikneb A-saidis peptidüül-tRNA. Kasvav polüpeptiidiahel liigub peptidüül-tRNA-lt A-saidis asuvale aa-tRNA-le ning translokatsiooni käigus liigub mRNA kompleks ühe koodoni võrra edasi. Nüüd jõuab peptidüül-tRNA P-saiti ning deatsüül-tRNA E-saiti. Translokatsiooni viib läbi EF-G koos GTP-ga ning pärast GTP hüdrolyüsi lahkuvad mõlemad ribosoomist. Nüüd algab uus ring peptiidahela pikenemiseks.

Umbes 2/3 ribosoomi massist sisaldab RNA-d ja ülejäänud 1/3 koosneb valkudest. Ribosoomi valgud on oma nimetuse saanud vastavalt subühikule, kuhu nad kuuluvad. Suure subühiku (ingl k *large subunit*) valgud kannavad vastavalt nimetust L-valgud (L1 kuni L44) ning väikese subühiku (ingl k *small subunit*) valke kutsutakse S-valkudeks (S1 kuni S31) (Zimmermann ja Maguire, 2001). Ribosoomi valgud, eriti suure subühiku valgud koosnevad kerajatest pinnalt väljaulatuvatest domäänidest, mis ulatuvad rRNA tuumani ja stabiliseerivad viimase struktuuri (Zimmermann ja Maguire, 2001). Ribosoomi valkude uurimiseks on mudelorganismiks olnud juba kaua aega bakter *Escherichia coli*. Antud bakteril on teada 22 väikese subühiku valku (1-22) ja 36 suurel subühikul asetsevat valku (1-34). Kõik valgud on erinevad, kuid eranditega: üks valk on tuvastatud mõlemas ribosoomi subühikus (S20 ja L26), L7 ja L12 valkude kohta on teada, et tegemist on sama valguga, mis on kas atsetüleeritud või metüleeritud vormis ning L8 valk on kompleks erinevatest valkudest, mis moodustub kas L7/L12 ja L10 valgust. Sellele lisaks esinevad valgud L31 ja L36, mis esinevad kahes vormis (Arnold ja Reilly, 1999).

Antibakteriaalsed ained ehk antibiootikumid on madalmolekulaarsed ained, mis seonduvad ribosoomile, takistavad valgusünteesi toimumist erinevatel põhjustel. Peamised

sünteesiprotsessid, mille toimumist antibiootikumid ohustavad on järgmised: 1) 30S initsiatsiooni kompleksi moodustamine, 2) 70S kompleksi moodustamine 30S ja 50S subühikutest ning 3) elongatsiooni protsess, kus moodustatakse peptiidside (Yonath, 2005). Antibiootikumid seonduvad ribosoomi kindlasse kohta ning inhibeerivad ribosoomi ühte kindlat reaktsiooni. Lähtudes antibiootikumide toimest, on võimalik saada täpsem arusaam valgusünteesi molekulaarsetest mehhanismidest.

Minu bakalaureusetöö põhieesmärgiks on anda ülevaade ribosoomi valkude funktsioonist ning põhjalikumalt keskenduda mudelorganismi *Escherichia coli* ribosoomi L-valkudele. Lisaks tuvastada konkreetsete L-valkude erinevused *E. coli* mutantides võrreldes natiivse tüübiga, kasutades selleks antibiootikume. Uurimuse üheks eesmärgiks on laiendada teadmisi ribosoomvalkude funktsionaalsete omaduste kohta, kuna ribosoom on päriliku informatsiooni realiseerimise organell ning seega oluline kõigi eluprotsesside toimumisel. Töö teine eesmärk on seotud antibiootikumide tundlikkust määravate molekulidega. Et patogeensete mikroobide resistentsus antibiootikumide suhtes on tänapäeval osutumas suureks probleemiks, siis uute antimikroobsete ainete väljatöötamiseks on vajalik tunda seniste ainete toimet ja nende tundlikkust mõjutavaid tegureid. Oma töös uurin *E. coli*-s esinevaid L31 ja L36 valke, millel esinevad teistest erinevalt paralooigid. Üks võimalikke põhjuseid, miks nendel valkudel on kaks paraloogi, on erinev tundlikkus looduses levinud antibakteriaalsete ainete suhtes.

1. Valdkonna ülevaade

1.1. Ribosoomi valgud *Escherichia coli* ja *Bacillus subtilis* näitel

1.1.1. Ribosoomi valk S12

Ribosoomi valk S12 paikneb *Escherichia coli* 30S subühikul ning selle valgu mõned mutatsioonid tagavad streptomütsiini resistentsuse. Uuringud *E. coli* tüve C600 mutantide puhul näitavad pleiotroopseid efekte lisaks antibiootikumi resistentsusele (Jaskunas *et al.*, 1974). Lisaks langenud kasvunäitajatele on tähendatud teatud ensüümide tasemete vähenemist rakus (Spotts, 1962; Stanier ja Spotts, 1961). Alternatiivse lähenemisena on välja pakutud, et need efektid võivad olla tekkinud muutustest tRNA ja ribosoomi vaheliste interaktsioonide kineetilistest muutustest, mis on mõjutatud muutustest ribosoomi valgus S12 (Maalee, 1969). Neist mutantidest ühte (tüve SM3) on uuritud veel edasi. Uurimise eesmärgiks oli saada teada, kas langenud kasvunäitajad omavad mingit seost vähenenud ribosoomihulkade või valgusünteesi efektiivsuse langusega (Zengel *et al.*, 1977). Mõõtmised ribosoomi valkude sünteesi määra kohta näitasid, et valgusünteesi efektiivsus mutantsetes tüves SM3 oli võrreldes tüvega C600 langenud ligikaudu kaks korda. Samuti mõõdeti β -galaktosidaasi ja paljude teiste erinevate valkude sünteesiaega ning leiti, et peptiidahela süntees langeb mutantsete tüvede puhul. Antud eksperimendi tulemused näitavad, et geeni *strA* produkt S12 on seotud peptiidahela pikenedamisega. Eeldatavalt omab ribosoomi valk S12 mingit funktsiooni tRNA seondumisel ribosoomile (Gorini, 1971; Strigini ja Brickman, 1973).

1.1.2. Ribosoomi valk S5

Ribosoomi valk S5 on seotud 30S subühiku funktsionaaltsentriga ning nüüdseks on tuvastatud, et unikaalse aminohappe mutatsiooni korral *E. coli*-s S5 valgus tekitab spektinomütsiini-resistentsuse ja külmatundlikkuse (Guthrie *et al.*, 1969; Nomura, 1987). Konkreetselt muudab antud mutatsioon raku kasvu, translatsiooni täpsust ning 16S rRNA voltumist. Kuigi translatsiooni initsiatsiooni etapp pole mutatsioonist mõjutatud, siis +1 ja -1 lugemisraami muutused ja *nonsense suppression* on mutantsetes tüves tunduvalt tõusnud. Huvitav on fakt, et see S5 ribosoomi mutatsioon on ruumiliselt kauge eelnevalt avastatud S5 mutatsioonist. See viitab asjaolule, et mehhanism, mis vastutab ram-fenotüübi (ingl k *ram-ribosomal ambiguity mutation* ehk ribosoomi võimekuse mutatsioon) eest uues mutantsetes tüves võib olla erinev eelnevalt

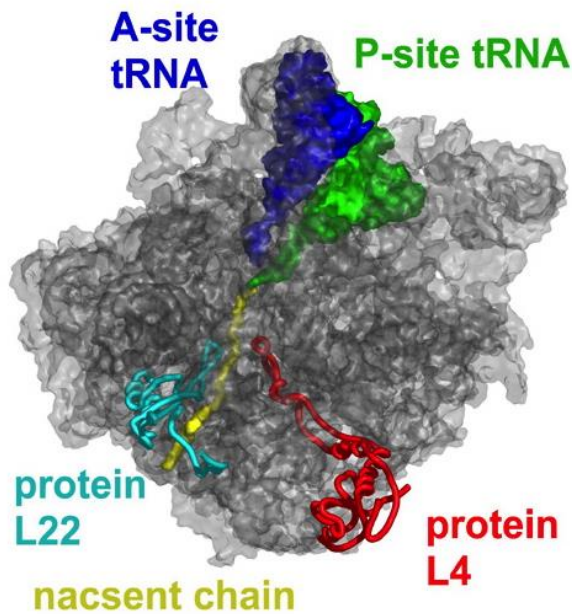
väljapakutud S5 (ja ka S4) ram-mutantides (Itoh ja Wittmann, 1973; Piepersberg *et al.*, 1975). Antud uuring toob välja ribosoomi valgu S5 tähtsuse ribosoomi funktsioneerimises ja raku füsioloogias ning juhib tähelepanu sellele, et translatsioonilist täpsust on võimalik reguleerida mitmel viisil (Kirthi *et al.*, 2006).

1.1.3. Ribosoomi valgud S4 ja S5

Ribosoomi valg S4 on streptomütsiini resistentsusega seotud valg, mis moodustab ühe osa nn "õlast", mis paikneb 30S subühiku pinnal. Kuigi S4 ei asu dekodeerivast tsentris (Wimberly *et al.*, 2000), siis struktuursed uuringud on hakanud vaikselt selgitama, kuidas S4 on seotud dekodeerimisega (Ogle *et al.*, 2002 ja 2003). Teine ribosomaalne valg S5, mis on samuti streptomütsiini resistentsuse tekkimisega seotud, interakteerub otseselt ribosoomi S4 valguga ning on seotud pikenenud liigendusega- nn õla ja 30S subühiku vahel (Wimberly *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2002). S5 valg paikneb 30S subühiku tipuosa juures ning seega paikneb ta üpris kaugel dekodeerivast tsentrist (Wimberly *et al.*, 2000). Mutatsioonid nii S4 ja S5 valgudes tekitavad vigu tegevaid ribosoomi, mis viitab asjaolule, et S5 mõjutab dekodeerimist kaugemalt (Itoh ja Wittmann, 1973; Piepersberg *et al.*, 1975). Hiljuti koostati mudel, mis näitas, kuidas S12, S4 ja S5 valgud mõjutavad tRNA selektsiooni ja translatsioonilist täpsust (Ogle *et al.*, 2002 ja 2003). Antud mudelis läbib 30S subühik tRNA selektsiooni ajal konformatsioonilise ümberkorralduse või domääni sulgemise, mis hõlmab 30S subühiku õla liikumist funktsionaalse liidese poole (Ogle *et al.*, 2002). Domääni sulgemise pärast on valkude S4 ja S5 vahelised kontaktid häiritud ega suuda võimaldada 30S subühiku õla liikumist koos S12 valguga funktsionaaltsentri poole (Ogle *et al.*, 2002). Teada olevad mutatsioonid nii S4 kui ka S5 valgudes paiknevad liideses, mis jääb kahe ribosomaalse valgu vahele. Need mutatsioonid suurendavad valepaardumist ning nõrgestavad interaktsioone S4 ja S5 valkude vahel, samal ajal lubades suletud konformatsioonil moodustuda veel paremini. Seega antud mudel viitab asjaolule, et S5 on ühendatud dekodeeriva tsentriga tänu ettenähtud interaktsioonidele 30S subühikuga. (Kirthi *et al.*, 2006).

1.1.4. Ribosoomi valgud L4 ja L22

Ribosoomi suure subühiku valgud L4 ja L22 sisaldavad kerajaid pinnapealseid domääne ja pikenenud "kombitsaid", (ingl k *tentacles*) mis ulatuvad suure subühiku sisemusse ja moodustavad sisekatte peptiidi väljumiskanalis (Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000; Schuwirth *et al.*, 2005).



Joonis 1. *Deinococcus radiodurans*'i suure subühiku kristallograafia näitamaks ribosoomi valkude L22 ja L4 asupaika ja väljaulatuvust ribosoomist. Antud valgud paiknevad valmiva ahela (kollane = nacsent chain) juures, kitsendades tunnelit.

Mutatsioonid ribosoomi valkudes L4 ja L22 viitavad makroliidide resistentsusele erinevates patogeensetes ja mittepatogeensetes bakterites. *E. coli*-s oli aastani 2007 iseloomustatud ainult kahte erütromütsiini resistentset (ery-R) mutanti: L4 valgus on leitud aminohappe lüsiini muutumist glutamaadiks (tüvel N282) ja L22 valgus on leitud kolme aminohappe deletsioon (tüvel N281) (Apirion, 1967; Wittman *et al.*, 1973; Chittum, 1994).

Et saada rohkem teada “kombitsate” funktsioonist ribosoomi kokkupanekul, isoleeriti 2007. aastal lisa Ery-R *E. coli* mutante. *E. coli* tüvest AB301 valiti välja kolooniad, mis suutsid kasvada erütromütsiinil. Nagu ennustatud, isoleeriti uued mutatsioonid nendel geenidel, kaasaarvatud 5 misense ja 3 intsertsiooni mutatsiooni L4 geenil ja 2 intsertsiooni mutatsiooni L22 geenil. Kõik mutatsioonid (va üks 6 aluspaarine intertsioon L22 geenis) kaardistati ribosoomi valkude L4 ja L22 “kombitsates”. Analüüsid uusi *E. coli* L4 ja L22 mutante, on tähendatud erinevusi kasvus, peptiidahela pikenemises ja 23S rRNA töötlemises. Lisaks tähendati veel, et mõned mutandid akumulatsioonid intermediaalseid 45S partikleid. Antud tulemused toovad uusi tähelepanekuid erütromütsiini resistentsuse mehhanismi, aga samuti toovad esile ribosoomi valkude L4 ja L22 tähtsuse ribosoomi funktsioneerimisel ja kokkupanekul (Zaman *et al.*, 2007).

1.1.5. Ribosoomi valk L36

Ribosoomid koosnevad kolmest RNA molekulist ja 50-80 valgust. Kuigi kõrgelt konserveerunud ribosoomi funktsionaalregioonid koosnevad suuresti ainult RNA-st (Ban *et al.*, 2000), on ka paljud ribosomaalsed valgud kõrgelt konserveerunud üle kolme fülogeneetilise domeeni (Lecompte *et al.*, 2002). On teada, et teatud hulk väikseid aluselisi valke omavad funktsiooni rRNA valkude kokkuvoltimises ja sama-aegselt hoitakse ära valkude valestivoltimist (ingl *k misfolding*) (Klein *et al.*, 2004). Nende panus ribosoomi stabiilsuse või funktsionaalsuse hoidmisel on veel teadmata.

Üks nendest valkudest on L36, mis on tugevalt konserveerunud bakterites, kuid mida ei leidu eukarüootide ega ka arhede maailmas (Cummings *et al.*, 2002). Kristallstruktuure vaadeldes on näha, et valgu L36 asemel valitseb arhede ribosoomi subühikus tühjus. Et teada saada, millist mõju omab valk L36 ribosoomi stabiilsusele ja funktsioonidele, on koostatud defektne *E.coli* tüvi, millel puudub ribosoomi valk L36. Seda valku kodeeritakse geeni *rpmJ* poolt. Tulemused näitavad, et bakteri kasv LB-söötmes aeglustus 40-50% 30-42°C juures. Deleteeritud tüvele sisestati plasmid, mis kodeeris *rpmJ* geeni ning vaadeldes bakteri kasvu, on näha, et L36 *in trans* suudab enam kui 85%-liselt taastuda. See viitab, et valgu L36 puudumine on primaarseks põhjuseks aeglustatud kasvu esinemisel. Veel võrreldi natiivse tüve ja valgu L36-puuduliku tüve vahel keemilise kaitse olemasolu kohta, kus selgus, et kui töödelda tüvesid DMS-i ja hüdrosüülradikaalidega, siis deletsiooniga tüvel ilmnis suurenenud reagenti kättesaadavus ribosoomi L36 valgu läheduses. Enamik nukleotiide, mille reaktiivsus muutus L36 poolt, tunduvad omavat ühendusi valgu tertsiaalstruktuuris. Need interaktsioonid viitavad sellele, et ribosoomi assambleerumisel toimuvad häired on tekitatud valgu L36 puudumisel. Laiaulatuslikud muudatused, mida toob kaasa valgu L36 kärbimine räägib enda eest, kui suurelt kooperatiivne on ribosoomi struktuur selles regioonis. Selline info annab põhjust väita, et L36 omab silmapaistvat rolli 23S rRNA struktuuri organiseerimisel. Võib-olla on eukarüootid ja arhed kompenseerinud valgu L36 puudujäägi omades stabiilsemaid rRNA tertiaalsemaid kontakte või mõne muu alternatiivse valguga, mis omab interaktsioone kusagil mujal ribosoomis (Maeder ja Draper, 2005).

1.2. Paraloogvalgud

Ribosoomi valgud on kriitilised ribosoomi komponendid, mis on eluks hädavajalikud (Amsterdam *et al.*, 2004). Teatud inimhaigused (näiteks 5q-sündroom, *Diamond-Blackfan* aneemia) on põhjustatud mõne ribosoomi valgu monoalleelsele inaktiivsusele (Ebert *et al.*, 2008; Draptchinskaia *et al.*, 1999). Juba mainitud haigused ning ka paljud teised diagnoosid tulenevad ribosoomide iseärasustest, mis põhjustavad defekte hematopoeesis ning mõningatel juhtudel viitab nende olemasolu suurendatud riskile hematopoeetiliste kasvajate väljakujunemisel (Narla ja Ebert, 2010). Kuigi eelnevalt välja toodud haiguste molekulaarsed tagamaad on veel teadmata, on siiski tänu hematopoeetilistele haigusnähtudele näha, et ribosoomide valgud mängivad kriitilist rolli vereraku loomes ja diferentseerumisel (Zhang *et al.*, 2013).

Ribosoomi valkude uurimine madalamates organismides on raskendatud tänu suurele hulgale homoloogsetele ribosoomi valkude paraloogidele. Näiteks 59 valku 79-st ribosoomi valgust omavad *Saccharomyces cerevisiae* puhul paralooge (Zhang *et al.*, 2013). Kuigi 80ndatel tehtud uuringutest järeldati, et paraloogide olemasolul puudub funktsionaalne tähendus ning arvati, et tegemist on üldsegi üleliigsete komponentidega (Rotenberg *et al.*, 1988), siis hiljutised uuringud viitavad ribosoomi valkude paraloogide unikaalsele funktsioonile (Haarer *et al.*, 2007; Steffen *et al.*, 2008). Iniduaalsete paraloogide deletsioonid toovad juurde täiesti uusi fenotüüpe, mis väljenduvad muutustes suuruses, punga suuruse selektsioonis, sporulatsioonis ning tundlikkuse muutumises nii viirustele kui ka erinevate rohtude suhtes (Snyder, 2001; Enyenihi ja Saunders, 2003; Ohtake ja Wickner, 1995; Carroll ja Wickner, 1995; Komili *et al.*, 2007; Parenteau *et al.*, 2011). Tegemist ei ole lihtsalt väikeste muutustega, pigem on tegu fenotüüpidega, mis on omavahel sama erinevad, kui deletsioonid mitesuguluses olevates ribosoomi valkudes (Xue ja Barna, 2012).

1.2.1. Paraloogvalgud pärmides

Hiljutised analüüsid pärmi ribosomaalse valgu mRNA splaissimisest viitavad, et tänu splaissimisele on võimalik reguleerida mõlema ribosoomi valgu paraloogi ekspressiooni transkriptsiooni tasemel, sageli mitte-retsiprooksel viisil (Xue ja Barna, 2012). Näiteks introni eemaldamine geenilt, mis kodeerib ribosoomi valku S29A, ei vähene ainult tema enda ekspressioon, vaid samuti väheneb ribosoomi valgu S29B ekspressioon. Tegemist on aga üsnagi üllatava tulemusega, kuna ekspressiooni muutus ühes duplitseeritud ribosoomi valgu geenipaaris võiks eeldatavalt tõsta teise geenipaari ekspressiooni, et saavutada ekspressiooni stöhhiomeetrist

tasakaal. Vastupidise tulemuse saame aga jälgides sama protsessi *wild type* rakkudes- 70% kõigist duplitseeritud ribosoomi valkude geenidest ekspresseeritakse asümmeetriliselt (Parenteau *et al.*, 2011). Sellest järeldub, et pämirakkudes on paraloogide proportsioon reguleeritud ning tegemist pole kõigest võrdväärsete, vaid funktsionaalsete asendajatega. On väga ahvatlev spekulatsioon, et teatud variatsioonid ribosoomi koostises, nagu erinevate paraloogide liitmine, on võimalikuks mehhanismiks ribosoomi aktiivsuse reguleerimisel. Ning kuigi paljud funktsiooni kaotanud (ingl k *loss-of-function*) fenotüübid toetavad seda võimalust, siis tänaseks on veel liiga vähe andmeid, et väita mingi seose olemasolu ribosoomi paraloogvalkude ja translatsioonilise kontrolli vahel (Xue ja Barna, 2012).

1.2.2. Paraloogvalgud taimedes

Taimede puhul on asi isegi veel mitmetahulisem- nimelt omavad taimed isegi veel enam geenikoopiaid ühe ribosoomi valgu kohta. Näiteks müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) iga ribosoomi valgu kohta esineb 2 kuni 7 geeni (Barakat *et al.*, 2001) samal ajal omab raps (*Brassica napus*) 966 geeni, mis kõik kodeerivad 79 ribosoomi valku (Whittle ja Krochko, 2009). Mõned nendest ribosoomi valkude geenidest omavad identset järjestust, samal ajal esineb aga paljudel paraloogidel järjestuses variatsioone ning samuti erineb ekspressiooni tugevus erinevatel arenguetappidel (Weijers *et al.*, 2001; Falcone Ferreyra *et al.*, 2010). Näiteks müürlooga puhul on ribosoomi valk RPS5A kõrgelt ekspresseeritud jagunevates rakkudes, samal ajal kui RPS5B-d ekspresseeritakse rakkudes, milles toimub diferentseerumine (Weijers *et al.*, 2001). Sama liigi kohta teatakse veel, et tema ribosoomi valgu L23 paraloogide järjestused omavad suurt homoloogiat, kuid ei oma sarnast tähtsust normaalse taime arengus (Degenhardt ja Bonham-Smith, 2008). RPL23A geeni deletsioon viis taime ebanormaalsete morfoloogiatunnusteni, mis viitab spetsiaalsete paraloogide spetsiaalsetele funktsioonidele. Tervet genoomi hõlmav uuring rapsi ribosoomi valkude kohta annab teavet selle kohta, et sama ribosoomi valgu erinevaid paralooge ei reguleerita sama mustri järgi eri kudedes. Enam kui 2/3 ribosoomi valkudest on kodeeritud paraloogide poolt, millel on vastastikused ekspressioonimustrid nii embrüo kui idu arenguetappides. Antud info viitab, et varajases arengus kasutab organism erinevat ribosoomi valkude paraloogide kompleksi (Whittle ja Krochko, 2009).

1.2.3. Paraloogvalgud imetajate näitel

Ribosoomi valkude paraloogide ekspressiooni heterogeensus esineb ka toakärbse (*Drosophila melanogaster*) puhul. Näiteks omavad mõned paraloogid erinevaid ekspressioonitasemeid täiskasvanud testises (Marygold *et al.*, 2007). Kui RPL22 transkribeeritakse pidevalt üle kogu organismi, siis RPL22-sarnaseid valke ekspresseerub suures mahus testises. Teadaolevalt on mõlemad geenid kärpse arengus olulised, seega ei saa kumbagi pidada funktsionaalselt üleliigseks. Lisaks sellele näitavad ribosoomi valgud S4b, S19a, L10a ja L37b võrreldes oma paraloogidega suurenenud ekspressiooni just testises (Marygold *et al.*, 2007). Selline ribosoomi valkude heterogeensus avaldumine viitab, et testises paiknevad sugurakud vajavad arenguks koespetsiifilisi variatsioone translatsioonil (Xue ja Barna, 2012). Inimeste juurde tulles on leitud, et eesnäärmevähi tekkepõhjuseks on ribosoomi valgud, mis ekspresseeruvad ebatavaliselt võrreldes normaalse eesnäärmelega. Ribosoomi valku L19 peetakse eesnäärme puhul tuumorogeneesi edendajaks, kuna tema näitajaid kipuvad erinevate juhtude korral väga kõrgeks. Antud valgu ekspressiooni mahasurumine (ingl k- *knockdown*) viib palju väiksema tõsidusega kasvaja tekkele (Wong *et al.*, 2014).

Üks paremaid näiteid antud teema kohta tuleb selgroogsete maailmast ja selleks on närilised, kellega inimkond on armastanud katseid teha juba ammustest aegadest. Hiirte ribosoomi valkudest on teada paraloogid valkude L10, L22 ja L39 kohta, mida ekspresseeritakse üle organismi erinevalt. Selle uurimiseks eraldati närilise maks, rinnanääre ja testis. Tulemusteks saadi, et nii rinnanäärmes ja maksas leidis L22-sarnaseid valke ning testisest leiti L10-ning L39-sarnaseid valke. Nagu ka toakärpse puhul, viitab ka antud tulemus sellele, et erinevates kudedes ekspresseeritakse unikaalseid ribosoomi valkude paralooge ning sarnaselt kärpsele, on tegu ekspressiooni mustritega, mis on evolutsiooniliselt konserveerunud ja eriti ilmne sugurakkudes (Xue ja Barna, 2012).

Eukarüootidel tehtud geeniekspressiooni uuringud on pannud tugeva kahtluse alla ribosoomi valkude stöhhiomeetria. Kuigi seda on peetud aastaid üheks kindlamaks tugipunktiks, siis tõendid selle kohta on puudlikud. Paljud geenuuringud on nüüdseks toonud välja, et ribosoomi valkude koosseis erinevates kudedes ja erinevates kasvufaasides on muutuv (Lopes *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 1990; Sugihara *et al.*, 2010). Tegemist on küll ebatavalise ülestähendusega, kuid pärmi ribosoomi valke uurides on leitud, et paljud tuumavalgud on täielikult mittevajalikud. Sellest

lähtuvalt võib järeldada, et ribosoomi valgud, mõjutades ainult teatud hulka mRNA-sid, võivad mängida palju spetsiifilisemat rolli kui lihtsalt tavasüsteemis toimuv valkude süntees.

1.2.4. Paraloogvalkude roll bakteri *Bacillus subtilise* näitel

Bacillus subtilis on hästi iseloomustatud Gram-positiivne mullabakter, kelle üheks kohastumuslikuks käitumiseks toitainete puudumisel on sporulatsioon. Teadaolevalt lülitub bakter limiteerivates olukordades üle energiasäästlikule režiimile ning teades asjaolu, et valgusüntees ribosoomides on üks suurema energiakulutusega protsess rakus, oleks läbimurdev mõista mehhanisme, millega reguleeritakse translatsiooni sporulatsiooni ajal. Et saada rohkem teavet nii sporulatsiooni ajal toimuvast, kui ka *B. subtilise* ribosoomi enda funktsioonist valgusünteesis, on koostatud geneetilised ja biokeemilised süsteemid, millega analüüsida ribosoomi komponente.

Proteoomikaardi (ingl k *proteomic map*) koostamisel ribosoomi valkudest leiti, et kaks erinevat tüüpi L31 (geenide *RpmE* ja *YtiA* poolt kodeeritud valgud) valku seondusid alternatiivsetel viisidel ribosoomiga. *YtiA* geeni ekspressioon on indutseeritud Zn^{2+} -limiteerivatel tingimustel, kus *Zur* geeni transkriptsioon mõjub de-repressioonina. Tsink on teadagi üks väga olulisest komponendist valkude jaoks, mängides rolli valkude struktuuris, regulatsioonis ja katalüütilistes reaktsioonides (Berg ja Shi, 1996; Frausto da Silva ja Williams, 2001). Lisaks sellele on teada, et tsink kontrollib mõnede ribosoomi valkude transkriptsiooni, praeguse seisuga on see ära tõestatud *B. subtilise* S14, L31, L33 ja L36 puhul. *B. subtilise* puhul vahetab Zn^{2+} -limiteerivatel tingimustel valk *RpmE* valgu *YtiA* ribosoomi 50S subühikul välja, kuna *YtiA* ei oma tsingi aatomeid. Teades, et *RpmE* olemasolu ribosoomis tähendab ebastabiilseid rakke, võib selline vahetus kaasa aidata tsingi mobiliseerimisele, kus *RpmE* poolt väljastatud tsink varustab tsingi puuduse all kannatavaid rakke. Tsinki puudutavad leiud jäävad siiski uurijatele veel ähmaseks ning küsitavaks, kuna tsingi taseme kõikumist võib rakus põhjustada nii mõnigi muu asjaolu.

Lisaks sellele on teada veel, et geenid, mis kodeerivad kahte tüüpi S14 (*RpsN* ja *YhzA*) valku, on samuti leitud *B. subtilise* genoomist. *RpsN* omab Zn^{2+} -seondavaid motiive, samal ajal kui *YhzA* seda ei suuda. Edasised uuringud on näidanud, et *YhzA* moodustab “ebaõnnestumiskindla” (ingl. k “*fail safe*”) mehhanismi, mis hoiab 30S subühiku funktsionaalsuse ka tsingi puuduses. Sellised tulemused annavad uuendusliku vaatenurga ribosoomi paraloogvalkude kohta, kui rakk elab üle Zn^{2+} -i puudust (Nanamiya ja Kawamura, 2010).

Huvitav korrelatsioon esineb ribosoomi valkudes tsingi sõrme motiivi leidumise ja geeni duplikatsiooni vahel (Makarova *et al.*, 2001). Eelnevalt mainitud valgud omavad enam kui ühes bakterigenoomis duplikatsioone ning võrreldes valkude paralooge, omab orginaalne ribosoomi valk sõrmjat tsingi (ingl k *Zn-ribbon*) motiivi, samal ajal kui tema paraloogil on motiiv puudulik/defektne. Sellest tulenevalt on teada, et tsingirikastes tingimustes on valkude S14, L 31, L33 ja L36 paraloogid represseeritud vastavate regulaatorite poolt ning ribosoomis funktsioneerivad orginaalsed r-valgud. Tsingivaeses keskkonnas toimub aga muutus, kuna ribosoomi orginaalvalgud L36, L33, L31 ja S14 kasutavad kogu olemasoleva tsingi enda tarbeks, viies ülejäänud Zn²⁺-sisaldavad valgud (DNA polümeraas, primaas) tõsisesse tsingidefitsiiti. Sellise olukorra ära hoidmiseks ekspresseeritakse lintjat tsingimotiivi mitteomavat ribosoomivalgud, mis vahetavad orginaalvalgud välja ning tööpostile jõudes vabastavad nad tsütoplasmasse tsinki, mis juhitakse teiste tsinki vajavate valkudeni (Panima *et al.*, 2003).

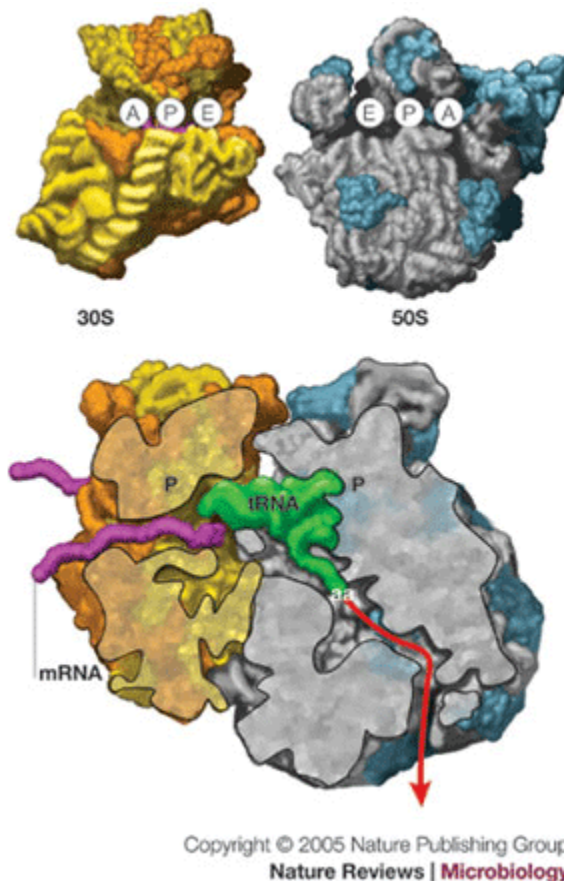
1.3. Ribosoom kui antibiootikumide märklaud

Valgusünteesi aparaat ehk ribosoom on eluslooduse suurim ja kõige keerulisem ensüüm, mis eksisteerib ka kõige algelisematel organismidel (Poehlsaard ja Douthwaite, 2005). Kuna ribosoom on oma olemuselt väga kompleksne, siis omab ta seeläbi palju potentsiaalseid saite funktsionaalsetele segajatele, mis teeb temast ideaalse märklaua antibiootikumidele. Saades järjest paremat ülevaadet ribosoomi struktuuri ja funktsiooni kohta, on samaaegselt paranenud meie arusaam antibiootikumide toimemehhanismidest. Seda võib tõlgendada ka vastupidi, kuna antibiootikume on kasutatud tööriistadena, et põhjalikumalt uurida translatsiooni tsükli. Saades juurde pidevalt uut informatsiooni, suudame aina täpsemalt kirjeldada valgusünteesi. Praeguses ajajärgus, kus bakterid näitavad aina kasvavat trendi antibiootikumide resistentsuse suhtes, on uute ja veelgi tõhusamate antibiootikumide väljatöötamine hädavajalik. Järgevates alapeatükkides üritan anda üldise ülevaade antibiootikumide funktsioonist valgusünteesi inhibitsioonis ning toon välja mõned antibiootikumid, mis on hästi kirjeldatud nii biokeemiliselt kui ka struktuuriliselt (Wilson ja Nierhaus, 2004).

1.3.1. Antibiootikumide seundumissaidid ribosoomil

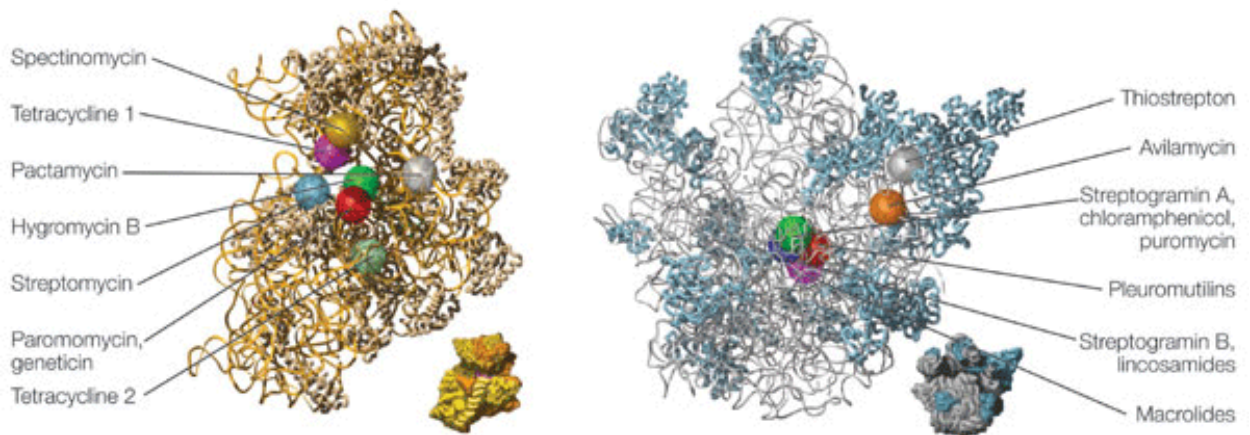
Translatsiooni masin kindlustab geneetilise informatsiooni täpse konversiooni vastavaks polüpeptiidahelaks. Ribosoom omab platvormi, millel toimub mRNA dekodeerimine tRNA-de poolt. Iga tRNA kannab kindlat aminohapet, mis hiljem lootusrikkalt lisatakse kasvavale

polüpeptiidahelale. Ribosoomil esineb 3 tRNA seondumissaiti: A-sait on sait, kus toimub dekodeerimine: siin valitakse õige aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) vastavalt oma mRNA koodonile. Enne peptiidsideme formeerimist asub P-saidis peptidüül-tRNA, millel põhineb polüpeptiidahela kasv ning viimaseks saidiks on E-sait, mis seob deatsetüleeritud tRNA-d ehk need tRNA-d, mis on läbinud peptiidsideme tekke ning on nüüd valmis ribosoomist lahkuma. Põhimõtteliselt jaguneb valgusüntees seega kolmeks etapiks: initsiatsiooniks ehk translatsiooni algatus, elongatsioon ehk polüpeptiidahela pikenemine ning valgusünteesi lõppetapp ehk terminatsioon. Iga etapp on potentsiaalseks märklauaks antibiootikumidele, madalmolekulaarsetele ühenditele, mille on produtseerinud mikroorganismid. Tranlatsiooni kui antibiootikumide märklaua kohta tehtud uurimustööd on võrreldes 1970. aastatega jäänud tänapäeval unarusse, kuid tänu paremale arusaamisele ribosoomi enda kohta, on ka antibiootikumide toime aina paremini kirjeldatud (Wilson ja Nierhaus, 2004). Tänuväärseks on osutunud 20. sajandi lõpus võimalikuks saanud kristallstruktuuride jäädvustamine nii suurest kui väikesest subühikust, mis näitavad, et vastavate subühikute funktsionaaltsentrid koosnevad peaaegu täielikult rRNA-st ning kõige lähemal paiknev ribosoomi valk peptiidsideme loomisele on vähemalt 18 Å kaugusel (Moore ja Steitz, 2003 ja 2002; Ramakrishnan, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Yonath, 2002; Poehlsgaard ja Douthwaite, 2005). Sellest lähtuvalt on ainuõige eeldada, et rRNA tähtsus tundub funktsiooni osas kõige olulisem, kuid vajalikeks peetakse ka ribosoomi valke, mis lõövad kaasa hiljem toimuvaks “*fine-tune*” protsessis. Seega on ribosoomi näol tegemist ühe kompleksse süsteemiga, mille moodustavad vastastikusel sõltuvuses olevad komponendid, mille koosfunktsioneerimise eelduseks on kindel asetus ribosoomis.



Joonis 2. Bakterite ribosoomi subühikud 30S ja 50S (Poehlsgaard ja Douthwaite, 2005).

Nii, nagu on kõigile elusüsteemidele omane, saab ka ribosoomi talitlus häiritud, kui tema ehituses toimuvad ümberkorraldused ribosoomi valkude ja RNA näol (Poehlsgaard ja Douthwaite, 2005). Ning see ongi põhimõtteliselt antibiootikumide töö tulemuseks valgusünteesil: nad asetavad end oluliste komponentide vahele, segades sellega ribosoomi loomupärast tööd ehk valgusünteesi. Selle nähtuse on meile silmaga nähtavaks teinud röntgenkristallograafia ning tänu sellele on avastatud mitmeid antibiootikumide seondumissaite ribosoomkompleksis. Kuna rRNA omab fundamentaalset tähtsust ribosoomi valgusünteesis, siis pole eriti üllatav, et enamik inhibiitoreid on valinud oma märklauaks rRNA-rikkad pinnad nii 30S kui ka 50S subühikul (Wilson ja Nierhaus, 2004).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Joonis 3. Antibiootikumide sendumissaidid ribosoomi subühikutel (Poehlsgaard ja Douthwaite 2005).

30S subühikut ründavad tetratsükliin, paktamütsiin ja aminoglükosiidid, mis kõik takistavad subühikul mRNA-st pärineva geneetilise informatsiooni kättesaamist. 50S subühikut ründavad paljud erinevad antimikroobsed ained, mis seonduvad kolmele põhiregioonile ribosoomil. Sellega häiritakse subühiku põhifunktsioone, nagu GTP hüdrolyüsi kontroll, peptiidsideme loomine ning sünteesitud valgu suunamine läbi subühiku tunneli.

1.3.2. 30S subühikut ründavad antibiootikumid

30S ribosoomi subühik on subühikutest väiksem ning koosneb 16S rRNA-st ja valkudest, mille funktsiooniks on mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni interaktsiooni tagamine. Seda ribosoomi osa ründavad antibiootikumid, nagu aminoglükosiidid ja tetratsükliinid. Aminoglükosiidide (nt streptomütsiin, paramomütsiin, tobramütsiin, kanamütsiin, neomütsiin ja gentamütsiin) kasutatakse nii inimeste kui ka loomadega seotud ravameditsiinilistes olukordades, kuna nad omavad kiiretoimelist ning laiaulatuslikku toimet nii Gram-negatiivsete kui Gram-positiivsete bakterite hulgas. Teiste valgusünteesi inhibiitoritega võrreldes on aminoglükosiidide bakteriotsiidseks toimeks veidi ebatavaline efekt: nimelt indutseerivad nad peremeesbakteris oksüdatiivse stressi (Lambert, 2012). Pleiotroopsete inhibitsioonirünnakute tagajärjel muudetakse translatsiooni erinevaid etappe, sh initsiatsiooni, elongatsiooni ning terminatsiooni (Davies, 1991). Nende märklauaks on 16S rRNA ning täpsemalt ribosoomi A-sait, mis tulemusena transleeritakse vale valk (Lambert, 2010).

Teiseks struktuurseks rühmaks, mis seonduvad 30S subühikuga, on tetratsükliinid. Tegemist on samuti laiatoimelise antibiootikumide rühmaga, hõlmates nii Gram-positiivseid kui Gram-negatiivseid baktereid (Hlavka ja Boothe, 1985; Chopra *et al.*, 1992). Oluliseks peetakse tetratsükliine ka seetõttu, et neid kasutatakse patogeenide nagu *Brucella*, *Chlamydia* ja *Rickettsia* vastu võitlemisel tavameditsiinis. Valgusünteesi aparaaadi tööd segavad nad seondues aminoatsüül-transferaasile ribosoomi A-saidis (Chopra ja Roberts, 2001). Sellega blokeeritakse aa-tRNA seondumine ning seega on valgusüntees inhibeeritud (Brodersen *et al.*, 2000). Lisaks sellele on teada, et tetratsükliin ei lase terminatsiooni faktoritel RF-1 ja RF-2 ribosoomi kompleksile seonduda, hoolimata sellest, millise stoppkoodoniga on tegu (Brown *et al.*, 1993).

1.3.3. 50S subühikut ründavad antibiootikumid

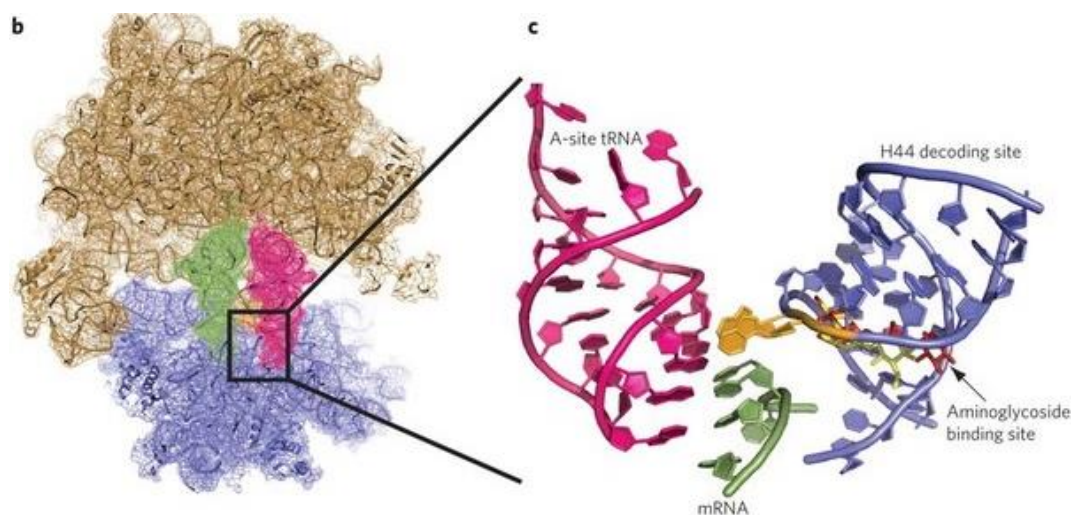
50S subühik on suurem subühik prokarüootide ribosoomkompleksis. See koosneb 5S ja 23S rRNA-st ning rohkem kui 30 ribosomaalsest valgust. 23S rRNA sekundaarstruktuur jaguneb omakorda kuueks domeeniks, kusjuures huvipakkuvaks on viies piirkond, kus paikneb ribosoomi peptidüültransferaasne aktiivsus. 50S subühikut ründavad antibiootikumide rühm, mida nimetatakse makroliidideks. Makroliididest ja valgusünteesi inhibeerimisest rääkides mainitakse alati ka linkosamiide ja spreptogamiine. Nad on struktuurilt küll erinevad, kuid omavad sarnast rünnakut ribosoomi 50S subühikule. Kokku nimetatakse neid **MLS**- rühma antibiootikumideks (ingl k. *Macrolide- Lincosamide- Streptogramin*). MLS antibiootikumid seonduvad 23S rRNA-le, mis asub lähedal peptiidisidet katalüüsivale peptidüültransferaastsentrile (Lambert, 2012). Seondumisega blokeeritakse peptiidahela pikenemine ning tulemuseks on peptidüül-tRNA (Leclercq, 2010). Lisaks MLS- rühmale ründavad 50S subühikut veel ka pleuromutiliinid, mis seonduvad otseselt 23S rRNA viiendale domeenile ning inhibeerivad sellega peptiidi moodustumist (Long *et al.*, 2006 ja 2009). Ribosoomi valkudest rääkides on oluline mainida ka fenikoolide rühma kuuluvat klooramfenikooli, mis seondub kindlatele nukleotiididele samuti viiendas domeenis, takistades sellega peptiidisideme moodustumist. Sealjuures on kristallograafia piltidelt näha, et seondumisel osalevad ka valgud L16, L2 ja L29. Uuringud ribosoomi valkude rollist antibiootikumide seondumisel on aga tänapäeval veel algusjärgus.

Kristallstruktuurid antibiootikumide seondumissaitidest ribosoomil on suuresti kaasa aidanud biokeemistel ja geneetilisel uuringutel saadud faktide tõestamisel või ümberlükkamisel. Oleme parasjagu huvitavas ajajärgus ribosoomi ja antibiootikumide maailma suhtes. Praegused kristallstruktuurid, mis väljendavad meie teadmisi antimikroobsete ainete ja ribosoomide vahel,

koos paremini lahtimõtestatud informatsiooniga, viivad meid kahtemata uute efektiivsete koosluste defineerimiseni.

1.3.4. Kasutatavate antibiootikumide tutvustus

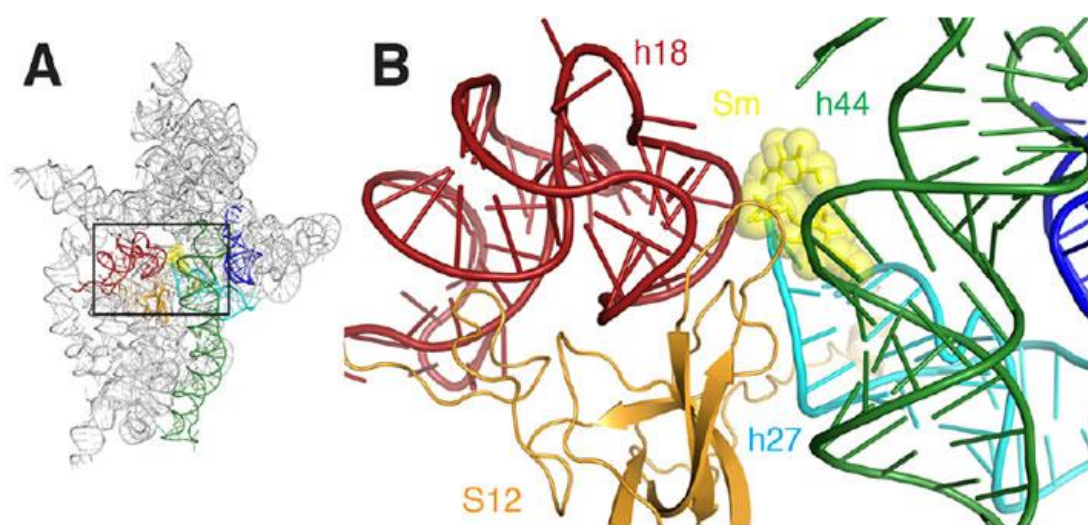
Kanamütsiini ja streptomütsiini näol on tegemist aminoglükosiidide perekonda kuuluva antimikroobsete ainetega, mis seonduvad pöördumatult 30S subühiku 16S rRNA-le ja inhibeerivad valgusünteesi toimumist blokeerides elongatsiooni toimumist (Davies, 1991). Mõlemad antibiootikumid võivad 30S subühikule seondues samuti peatada initsiatsiooni kompleksi (30S-mRNA-tRNA) moodustumist, blokeerides samuti ka translatsiooni initsiatsiooni. Lisaks sellele võivad kanamütsiin ja streptomütsiin mõjutada valgusünteesi, mis on juba initsieeritud, põhjustades mRNA valestilugemist (Kestell *et al.*, 2002). Kanamütsiini puhul on samuti ammu teada, et tegemist on tugeva translokatsiooni inhibiitoriga, stabiliseerides peptidüül-tRNA seondumist A-saiti (Cabanas *et al.*, 1978; Misumi *et al.*, 1978; Misumi ja Tanaka 1980; Semenov *et al.*, 1982). Samuti omab ta efekti raku vigade paranduse (ingl k *proofreading*) ning valgusünteesi täpsuse toimumises (Jelenc ja Kurland, 1984).



Joonis 4. Aminoglükosiidide kanamütsiin, gentamütsiin, neomütsiin ja paromomütsiin seondumiskoht ribosoomil. Dekodeeriv sait on märgitud kastiga. b) Ülevaade prokarüoodi 70S ribosoomi struktuurist. Helepruun = suur 70S subühik, Sinakas = väike 30S subühik. c) Dekodeeriv sait suurendatud. Näha on aminoglükosiidide seondumised h44 dekodeerivale saidile (Feldman *et al.*, 2010).

Streptomütsiin (Stp), nagu ka kõik teised aminoglükosiidi perekonna liikmed, indutseerib translatsiooni valesti lugemist (ingl k *misreading*) (Kurland *et al.*, 1996). Ribosoomile seondub ta

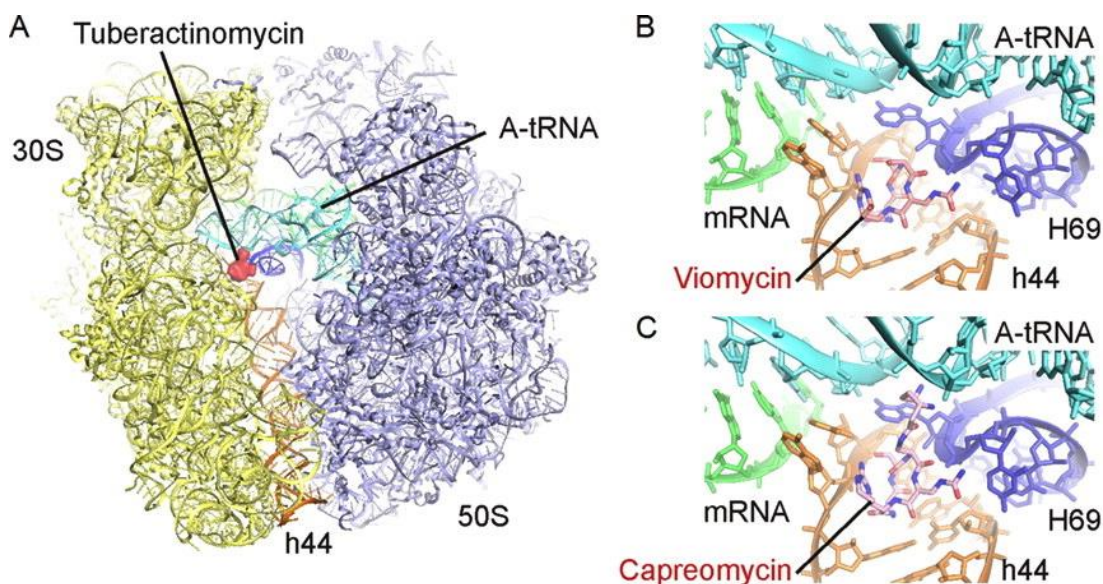
aga erinevalt teistest aminoglükosiididest, millest tulenevalt omab ta erinevaid inhibitoorseid ja valesstilugemist põhjustavaid mehhanisme. Kui teised perekonna liikmed seonduvad h44 domeenile, siis Stp ühendab heelikseid 4-lt erinevalt domeenilt, nimelt h1, h18, h27 ja h44 ning samal ajal omab interaktsioone ribosoomi valguda S12. Stp seondumise mõjul toimub domeeni sulgemine, mis eeldatavalt vähendab GTPaasi aktivatsiooni naaber tRNA-des ja samal ajal kergelt suurendab läheduses olevate naaber tRNA-de aktiivsust. Sellega tekitab Stp üldiste tasemete samalaadse suuruse, kuid samuti tekitab tema juuresolek taseme limiteerimist (Gromadski ja Rodnina, 2004). See seletab ka Stp tugevat efekti translatsiooni valesstilugemisel (Wilson, 2004).



Joonis 5. A) Streptomütsiini seondumispaik ribosoomil. B) Suurendatult näidatud seondumissait (Stp = kollane). Veel on välja toodud ka seondumisheeliks h18, h27, h44 ning ribosoomi valg S12 (Mgrdichian, 2013).

Neomütsiini puhul on samuti tegemist aminoglükosiidide perekonda kuuluva antibiootikumiga, mis seondub 30S subühiku 16S rRNA dekondeeriva saidi sisemisele silmusele (Joonis 1.) (Moazed ja Noller, 1987; Recht *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000). Selline seondumine põhjustab konserveerunud aluspaarides, mis paiknevad A-saidi silmuses konformatsioonilisi muutusi. Selle tulemusena seotakse sisemise silmuse rRNA tihedalt kokku I ja II aminoglükosiidse antibiootikumi sõrmusega (ingl *k rings*) (Fourmy *et al.*, 1996; Fourmy *et al.*, 1998; Ogle *et al.*, 2001). Tugevalt seondunud antibiootikum annab oma panuse koodoni valesstilugemisele ja mRNA vigasele transleerimisele (Metha ja Champney, 2002).

Kahe viimase antibiootikumi, viomütsiini ja kapreomütsiini puhul teada, et tegemist on struktuurilt sarnaste antimikroobsete ainetega (Wilson, 2009). Mõlemad antibiootikumid seonduvad ribosoomi interfaasi 23S rRNA h69-le ja 16S rRNA h44-le. Seondumisalad h44 puhul kattuvad suuresti aminoglükosiididega, mistõttu toimub nendevaheline võitlus seondumisele antud piirkonnas (Akbergenov *et al.*, 2011).



Joonis 6. A) Ülevaade tuberaktinomütsiinide seondumissaidist 30S (kollane) ja 50S (sinine) subühikute interfaasis. Samuti on ära märgitud ka h44 (kuldne kollane), A-tRNA (helesinine) ja P- tRNA (roheline). B) ja C) Ülevaate suurendus näitamaks viomütsiini ja kapreomütsiini seondumist h44-le (oranž) 30S subühikul ja h69-le (lillakas) 50S subühikul. Joonistel on samuti ära märgitud mRNA ja A-tRNA, vastavalt rohelse ja helesinisega (Akbergenov *et al.*, 2011).

Viomütsiin segab valgusünteesi toimumist päris mitmest aspektist: initsiatsiooni, tRNA selektsioonil ja peptiidahela elongatsioonil (Wank ja Wallis, 2001). Esiteks tõkestab ta tänu initsiatsiooni inhibeerimisele kompleksi formeerumise väikesel subühikul (Liou ja Tanaka, 1976). Teiseks tekitab ta valesilugemisi (ingl k *misreading*), näiteks suurendab ta geneetilise materjali ebatäpset transleerimist, sidudes vale aminoatsüül-tRNA A-saiti (Marreto *et al.*, 1980; Wurmbach ja Nierhaus, 1983). Kolmandaks ja kõige olulisema efektina hoiab viomütsiin A-saidis olevat peptidüül-tRNA-d kinni ja sellega piirab ta viimase väljumist ning järelkult blokeeritakse ka translokatsiooni toimumist (Modolell ja Vazquez, 1977; Misumi ja Tanaka, 1980). Samalaadselt paljudele teistele aminoglükosiididele omab ka viomütsiin kahte seondumissaiti- nii väikesel subühikul kui ka suurel.

Kapreomütsiini teatakse alates 2014. aastast kui ribosoomi valkude L10 ja L12 segajat. Nimelt interakteeruvad ribosoomi valgud L10 ja L12 omavahel ning moodustavad 50S subühikule varre, millele seonduvad valgusünteesi jooksul initsiatsiooni ja elongatsiooni faktorid. Seetõttu peetakse ribosoomi valkude L10 ja L12 vahelist koostööd hädavajalikuks ribosoomi funktsioneerimisel ja translatsiooni läbiviimisel. Nüüdseks on teada, et kapriomütsiin inhibeerib L10 ja L12 vahelisi interaktsioone. Veelgi enam – ka elongatsiooni faktorist G (EF-G) sõltuv GTPaasi aktiivsus väheneb kapriomütsiini juuresolekul silmnähtavalt, mis on samamoodi indikaatoriks eelneva jutu tõeseks pidamisel (Yuan *et al.*, 2014).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärgiks on võrrelda *E. coli* ribosoomi valkude mutantide antibiootikumide resistentsust *wild type*'iga. Selle uurimiseks jälgiti *E. coli* mutantide kasvu erinevates antibiootikumide kontsentratsioonides ja määrati minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon ehk **MIC** (ingl k *Minimal Inhibitory Concentration*).

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud tüved

E. coli tüvi:

- Keio kollektiooni tüvi BW25113 (*F*⁻, Δ *thrA722::kan*, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787(::rrnB-3)*, λ , *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*).

Antud Keio kollektiooni *E. coli* BW25113 tüvest saadi P1 transduktsiooni tulemusena *E. coli* MG1655 (*F*⁻ λ *ilvG- rfb-50 rph-1*) mutandid, millest olid deleteeritud järgmised geenid:

- Δ *rpmJ* (ribosoomi valgu L36A mutant)
- Δ *ykqO* (ribosoomi valgu L36B mutant)
- Δ *rpmE* (ribosoomi valgu L31A mutant)
- Δ *ykqM* (ribosoomi valgu L31B mutant)
- Δ *rpmE* Δ *ykqM* (ribosoomi valkude L31AB topeltmutant)
- Δ *ykqM* Δ *ykqO* (ribosoomi valkude L31B36B topeltmutant)

Pärast transduktsiooni toimumist eemaldati kõigist *E. coli* MG1655 tüvedest kanamütsiini kassett, kasutades Flp- FRT rekombinatsiooni.

Kõik töös kasutatavad tüved on saadud Aivar Liivalt ja Kai Virumäelt.

2.2.3. *E. coli* tüvede eeltöötlus ja antibiootikumilahuste valmistamine

Katsele eelneval päeval kandsime *E. coli* rakud tardsöötmetelt 2 ml-sesse vedelkultuuri (LB) ning asetaskime 37°C juurde loksutile. Rakke kasvataskime üleöö.

Katsepäeval lahjendasime üleöökultuuri 10 korda. Selle saavutamiseks lisaskime uuele 2 ml-le LB vedelsöötmele 200 µl üleöökultuuri. Saadud lahjenduse panime uuesti 37°C juurde loksutile. Kasvuaeg täpselt 1 tund.

Samal ajal, kui teha tüvedest lahjendusi, võib külmkapist (-20°C) võtta välja antibiootikumid ning asetada 42 °C juurde sulama. Pärast sulamist Vortex.

Antibiootikumide lahjendused tegime 1,5 ml tuubidesse, kasutades LB-söödet.

Vastavate antibiootikumide koguste lisamine LB- söötmele:

1) Kanamütsiini puhul võtsime 980 µl LB söödet ja lisaskime 20 µl kanamütsiini (alkkontsentratsiooniga 1 mg/ml). *E. coli* BW125113 Δ31a mutandi puhul kasutasime kanamütsiini alkkontsentratsiooniga 50 mg/ml. Suspendeeriskime, et kogu antibiootikumis saaks tuubi.

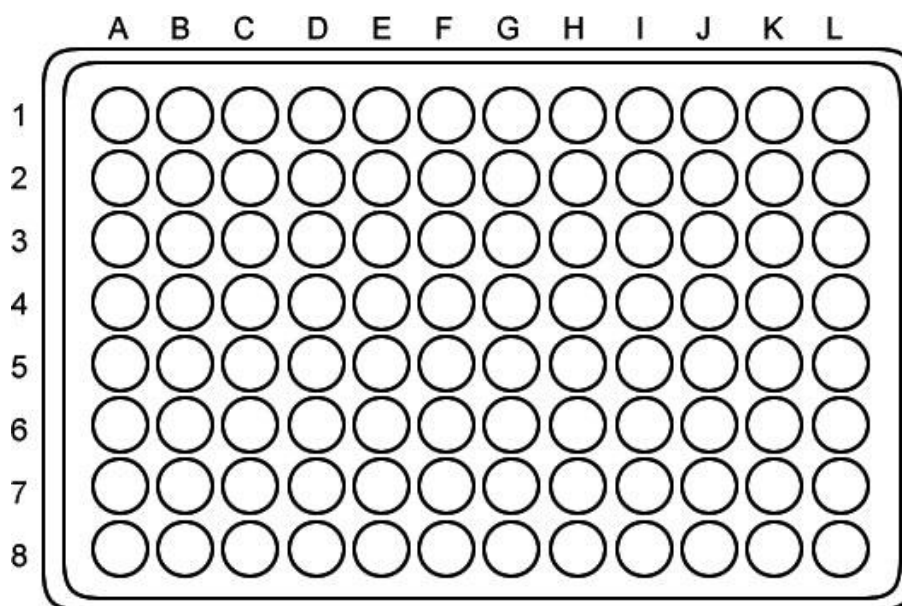
2) Streptomütsiini, viomütsiini ja neomütsiini puhul lisaskime 984 µl LB söötmele 16 µl vastavat antibiootikumi. Alkkontsentratsioonid vastavalt 16 ml/mg, 16 ml/mg ja 1 mg/ml. Δ31b mutandi puhul kasutasime viomütsiini alkkontsentratsiooniga 64 mg/ml.

3) Kapreomütsiini puhul lisaskime 297 µl LB-söötmele 703 µl kapreomütsiini. Alkkontsentratsiooniks 64 mg/ml.

Lahused tegime 1,5 ml tuubidesse ja segaskime hiljem Vortexil.

2.2.4. Antibiootikumide lahjendusrea valmistamine

Antibiootikumide lahjendusrea saamiseks kasutasime steriilseid BMG mikrotiiterplaate (Cellstar), mis tulevad kaasa masinaga POLARstar Omega.



Joonis 7. Mikrotiiterplaat 96 avaga.

Lahjendusrea valmistamiseks asetame mikrotiiterplaadi igasse avasse A real 200 μ l eelnevalt valmistatud antibiootikumi lahjendust. Igale järgnevale reale asetame multikanal-pipetiga 100 μ l LB-söödet.

Valmistame antibiootikumide 2-kordse lahjenduste rea. Võtame multikanal-pipetiga A-rea aukudest 100 μ l ja lisame selle ettevaatlikult B-rajale. Segame edasi-tagasi pipeteerides. Korrata kuni H-reani. Sealt võtame 100 μ l ja viskame minema, et igasse auku jääks 100 μ l vedelikku. Kandes vedelikke ühest reast järgmisesse võib mikrotiiterplaadi kattega kaitsta teisi avasid, et vältida lahuste segunemist piiskadega.

2.2.5. Lahjendatud *E. coli* tüvede mikrotiiterplaadile kandmine

Loksutil olnud lahjenduskultuurist tegime veel 2000 kordse lahjenduse. (20 ml LB kohta lisame 10 μ l kultuuri). Lahjendused tegime 50 ml-sesse tuubidesse. Segame.

Saadud tuubi sisu valasime steriliseeritud Petri tassile. (Üks tüvi = üks tass). Tõstisime multipipet-kanaliga 100 μ l vastavat tüve vastavasse avasse. Aetasime plaadile kaane ning lõikasime 2 ruudu (ca 12 cm) pikkuse parafilmi tüki, mille laius ei tohiks olla rohkem kui 1 cm. Äärستا mikrotiiterplaat ettevaatlikult parafilmiga. Jälgida, et näpud ei jääks äärstamisest ja transportimisel kaane peale, kuna masin võib seetõttu lugeda katset valesti.

Asetame mikrotiiterplaadi POLARstar Omega masinasse (37°C juurde). Programiks valime test11-12 (lainepikkus 600 nm).

2.2.6. MIC-i määramine

Järgmisel päeval määrasime MICi ehk minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (ingl k *Minimal Inhibitory Concentration*).

3. Tulemused ja arutelu

Eksperimendi eesmärgiks oli võrrelda erinevate tüvede mutantide tundlikkuse muutusi antibiootikumide suhtes. Pärast POLARstar Omega-ga mõõtmist nägime, millise kontsentratsiooniga kaevu juures enam kasvu ei toimu ehk saime teada minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni (ingl k *MIC- Minimal Inhibitory Concentration*). Antud ava märgitakse kontsentratsioonina, kus antibiootikum ei lase bakteril kasvada (mg/ml).

Järgnevalt on esitatud tabelitena kahe erineva *E. coli* tüvede tundlikkus antibiootikumidele. *E. coli* BW25133 tüvede võrdlus on toodud näitamaks, et antud tüvi võib omada kanamütsiini resistentsust tekitavaid gene. Seetõttu erinevad ka tulemused meid huvitavas *E. coli* tüves MG1655, kus segavaid gene seal enam pole.

Tabel 1. *E. coli* MG1655 *wild type*'i ja mutantide tundlikkuse võrdlus antibiootikumidele. (Olulised erinevused on eristumise mõttes rasvases kirjas ning sulgudes on toodud väärtused, mis on ilmselt tänu kanamütsiini kassetti sissejäämisele mõjutatud.)

Tüve nimetus	Antibiootikum (mg/ml)				
	Kanamütsiin	Neomütsiin	Streptomütsiin	Viomütsiin	Kapriomütsiin
wild type	0,03125	0,03125	1	16	16
Δ31A	0,015625	0,03125	1	8	-
Δ31B	0,5	0,0625	2	32	-
Δ36A	0,015625	0,0625	1	16	-
Δ36B	0,5	0,125	1	16	-
Δ31B36B	0,5	0,25	0,5	4	8
Δ36A31A	(2)	(2)	1	8	16

Tabel 2. *E. coli* BW125113 *wild type*'i ja mutantide tundlikkuse võrdlus antibiootikumidele. (Erinevuste väljatoomiseks on kasutatud rasvast kirja.)

Tüve nimetus	Antibiootikum (mg/ml)			
	Kanamütsiin	Neomütsiin	Streptomütsiin	Viomütsiin
<i>wild type</i>	0,0078125	0,03125	0,5	4
Δ31A	0,1953	0,03125	1	8
Δ36A	0,0156	0,0625	1	16
Δ36B	0,0156	0,03125	1	16
Δ31B36B	1	0,5	0,5	8

3.1. *E. coli* mutanttüvede võrdlus antibiootikumide tundlikkusele

Nagu tabelist 1. võib näha, siis kõige suurema erinevusega MIC-id esinevad *E. coli* MG1655 Δ31B mutandi puhul, kus kõikide antibiootikumide resistentsus on võrreldes *wild type*'iga mitmekordne. Kanamütsiini puhul on mutandis tundlikkuse saavutamiseks vaja 16 korda kangemat antibiootikumi lahust. Seega võiks eeldada, et 31B valgu ja kanamütsiini vahel esineb tugev allosteeriline seos. Kuna kanamütsiin seondub ribosoomil dekodeeriva saidi juurde (vt Joonis 4.) (Feldman *et al.*, 2010), siis võiks eeldada, et ka 31B valgu asukoht paikneb selle juures või läheduses. Kanamütsiini inhibitoorne toime seisneb translokatsiooni segamises, stabiliseerides peptidüül-tRNA seondumist A-saiti (Cabanas *et al.*, 1978; Misumi *et al.*, 1978; Misumi ja Tanaka 1980; Semenkov *et al.*, 1982) ning teadaolevalt omab ta rolli ka vigade paranduses (ingl k *proofreading*) ja valgusünteesi täpsuses (Jelenc ja Kurland, 1984). Kui vaadata MIC-i tulemusi, siis võiks eeldada, et ka ribosoomi valk 31B omab olulist rolli vastavates protsessides.

Teadaolevalt on ribosoomi valk L31 isoleeritud kompleksist, kuhu kuulusid lisaks temale veel 5S rRNA ja ribosoomi valgud L5, L18 ja L25 (Fanning ja Traut, 1981) ja teda eeldatakse olevat ka ristseotud (ingl k *crosslinked*) tRNA-ga P-saidis (Graifer *et al.*, 1989). Modelleerimise

tulemusena on arvatud, et ribosoomi valk L31 võiks osaleda ribosoomi valkude S13-L5 vahelise silla moodustumisel ja stabiliseerimisel (Shasmal *et al.*, 2010). Kirjaduses leidub ka ammuseid ülestähendusi, et ribosoomi valk L31 võib ka väga õrnalt olla seotud ribosoomiga (Eistetter *et al.*, 1999), kuid kuna *E. coli*-s pole ribosoomi kristallides valku L31 veel päriselt leitud, siis tegelikult võib meie tugev MIC-i kontrast avaldada meile ka valgu asukoha täpsust suurel ribosoomi subühikul.

Tabelist 1. näeme veel, et sama valgu (L31B) puudumine ribosoomist omab ka teiste antibiootikumidega kerget efekti võrreldes *wild type*'iga. Kõiki ülejäänusid antibiootikume tuleb võtta 2 korda kangema lahusena, et nad suudaks inhibeerida valgusünteesi. Antud antibiootikumid on meile andnud võimaluse jälgida huvitavat efekti. Nimelt omavad kõik antibiootikumid tegelikult seondmisala ribosoomi 30S subühikul 16S rRNA-l (va viomütsiin, mis omab mõlemal (Akbergenov *et al.*, 2011)), mistõttu on meil alust väita, et nii nagu ribosoomi valgud S4 ja S5 mõjutavad dekodeerivat tsentrit eemalt (Itoh ja Wittmann, 1973; Piepersberg *et al.*, 1975; Wimbery *et al.*, 2000), mõjutab ka meie uuritud L31B translatsiooni toimumist kaugemalt.

Järgmine ribosoomi valk, mis näitas suurejoonelisi muutusi võrreldes oma metsiktüüpiga, on ribosoomi valk 36B. Kuigi streptomütsiini ja viomütsiini puhul erilisi muutusi ei toimunud, siis taaskord toimus B-valgu (31B ja nüüd ka 36B) puhul kanamütsiini toimel tugeva kontrasti ilmumine. Tabelist näeme ka, et neomütsiini puhul on märgata eriti suurt tundlikkuse vahet. Kuid sellest nähtusest veel huvitavam on efekt, mida on võimalik näha tabeli järgmisel real, kus mõlemad B-valgud on deleteeritud. Mõlema valgu eemaldamisel ribosoomist saame kõikide antibiootikumide kohta erisuguseid korrelatsioone. Kui kanamütsiini puhul jääb tundlikkus samaks (võrdne üksikute deletsioonide väärtustega), siis neomütsiini puhul see kasvab 2 korda. Kahe järgmise antibiootikumi puhul toimub aga hoopis tundlikkuse mitmekordne langus ning kuigi kapriomütsiiniga ei saanud me võrdlusmomenti kahe erineva B- valguga, siis topelmutant B- valkudest näitab meile taas sarnast korrelatsiooni nagu kahe eelmise antibiootikumiga.

Kui nüüd vaadata tulemusi ribosoomi valkude paraloogide seisukohalt, siis on näha, et teatud juhtudel on näha suuremaid kõikumisi kahe paraloogivalgu vahel. Taaskord esineb tugev efekt kanamütsiini juures, kus ribosoomi valkude L31 ja L36 nii orginaal- ja ka paraloogvalkude puhul esineb suur kontrast tundlikkusele. Ülejäänud valkude puhul jääb tundlikkuse muutus veidi liiga väikeseks või isegi samaks. Kuigi konkreetseid mehhanisme ja mõjutusi antud katsest välja ei

loe, siis kindlasti saame väita, et teatud eripära siiski ribosoomi valkude paraloogide koha pealt esineb.

Antud töö tulemustest võime järeldada, et ribosoomi valgud L31 ja L36 omavad oma paraloogidega üpris suurt mõju valgusünteesi toimumisele antibiootikumide juuresolekul. Selleks, et saada teada täpseid mehhanisme ja mõjualasid nii orginaal- kui ka paraloogvalkude kohta, oleks vaja sooritada täpsustavaid biokeemilisi katseid.

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli anda kirjanduslik ülevaade ribosoomi paraloogvalkude funktsioonist valgusünteesi toimumisel, keskendudes *Escherichia coli* suurema subühiku (L) valkudele. Valgusüntees on raku jaoks esmase tähtsusega geenide ekspressioonil ning omab seega kriitilist väärtust rakulise elu kestvusel. Teise poolena kirjanduslikust ülevaatest keskenduti antibiootikumide inhibitoorsete mehhanismide seletamisele, mis takistavad valgusünteesi toimumist.

Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli välja selgitada erinevate *E. coli* MG1655 mutantide (tüved, millelt on deleteeritud vastav(ad) ribosoomi valk/valgud L31A, L31B, L36A, L36B, L31BL36B või L31A36A) tundlikkuse erinevused antibiootikumidele. Tundlikkuse väljaselgitamiseks koostati erinevate antibiootikumide lahjendused mikrotiiterplaadil ning määrati minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (MIC). Eksperimentaaltöö ülesandeks oli määrata kindlaks, kas erinevate paraloogvalkude geenide deleteerimine mõjutab bakterite tundlikkust erinevaile antibiootikumidele.

Eksperimentaalse töö tulemusena leiti, et bakteritüved, milles puuduvad ribosoomi valgud L31B ja L36B kas üksikdeletsioonina kui topeltmutandina (Δ L31BL36B) omavad olulisi efekte antibiootikumide tundlikkusel. Antud tüvede puhul esines mitmekordseid muutusi peaaegu kõigi uuritud antibiootikumide suhtes, mis võimaldab järeldada, et nende valkudel esineb veel teadmata roll translatsiooni toimumisel. Samalaadset efekti ootati ka paraloogvalkude suhtes ning antud tulemuste juures võime taas järeldada, et ribosoomi paraloogvalkudel on veidi erinevad funktsioonid valgusünteesil, kuna ka nende võrdlusel orginaalvalkudega esines mõnekordseid erinevusi antibiootikumide tundlikkusele.

Katsete käigus selgus, et mikrotiiterplaadile antibiootikumide lahjenduste gradiendi loomine on sobiv süsteem uurimaks ribosoomi valkude tundlikkust antibiootikumidele ning sama süsteemi võib kasutada ka edasiste katsete käigus.

Variations of ribosomal proteins and their relation with antibiotic resistance

Kadri Torp

Summary

The aim of the present study is to give an overview of the ribosomal paralogue proteins and their function in translation. The study is concentrated on the L-proteins of the bacteria *Escherichia coli* in the large subunit of the ribosome. Protein synthesis has an essential role in the expression of genes and therefore possesses a critical value in the cellular life. The other goal of the study is concentrated on explaining the mechanisms of antibiotics- what kind of antibiotics exist and how they inhibit translation.

The purpose of the experimental study was to identify the difference of the antibiotic resistance of the mutants of *E. coli* MG1655 (that lack some of the ribosomal proteins). To examine that we composed an experiment on a micro titre plate with 96 wells that had different solutions of antibiotics in it. On the plate we were able to measure the minimal inhibitory concentration (MIC).

The results of the experimental study showed that mutants that lack ribosomal proteins L31B and L36B (whether deleted as a single-gene or both i.e. Δ L31BL36B) show significant differences with almost all the antibiotics that they were tested with. With our knowledge we are able to make a conclusion that these ribosomal proteins have an important role in the protein synthesis. With the paralogue proteins we expected to see same kind of results and with our results we can again say that the paralogues of the ribosomal proteins impact translation in a slightly different way than do the original ribosomal proteins.

The experiment shows that it is suitable to study antibiotic resistance of different ribosomal proteins and the same system may be used for further experiments.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada oma juhendajaid Jaanus Remmet ja Kai Virumäed, kes abistasid mind selle lõputöö koostamisel. Samuti ei saa mainimata jätta Molekulaarbioloogia õppetooli liikmeid ja teisi üliõpilasi, kes abi vajamisel mulle aega leidsid.

Täna ka Tiina Tamme Biokeemia õppetoolist, kes lubas mul kasutada multipipet-kanalit.

Kirjanduse loetelu

Ajakirjad:

Zimmermann, B. A. ja Maguire, R. A. 2001. The ribosome in focus. *Cell*. 104(6): 813-6.

Arnold, R. J. and Reilly, J.P. 1999. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem*. 269(1): 105-12.

Kirithi, N., Roy-Chaudhuri, B., Kelley, T. and Culver, G. M. (2006). A novel single amino acid change in small subunit ribosomal protein S5 has profound effects on translational fidelity. *RNA J*. 12(12): 2080–2091.

Nomura, M. (1987). The role of RNA and protein in ribosome function: A review of early reconstitution studies and prospects for future studies. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 653–663.

Guthrie, C., Nashimoto, H. and Nomura, M. (1969). Structure and function of *E. coli* ribosomes. VIII. Cold-sensitive mutants defective in ribosome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63: 384–391.

Itoh, T. and Wittmann, H.G. (1973). Amino acid replacements in proteins S5 and S12 of two *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence to independence. *Mol. Gen. Genet.* 202: 446–454.

Piepersberg, W., Böck, A. and Wittmann, H.G. (1975) Effect of different mutations in ribosomal protein S5 of *Escherichia coli* on translational fidelity. *Mol. Gen. Genet.* 140: 91–100.

Zaman, S. M., Fitzpatrick, M., Lindahl, L., Zengel, J. (2007). Novel mutations in ribosomal proteins L4 and L22 that confer erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 66(4): 1039–1050.

Ban, N. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905–920.

- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. and Steitz, T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289(5481): 920- 930.
- Schuwirth, B. S., 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310: 827–834.
- Apirion, D. 1967. Three genes that affect *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol*. 30: 255–275.
- Wittmann, H.G., Stöffler, G., Apirion, D., Rosen, L., Tanaka, K., Tamaki, M., Takata, R., Deiko, S. and Otaka, E. 1973. Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins. *Mol Gen Genet*. 127: 175–189.
- Chittum, H. S., 1994. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 176: 6192–6198.
- Zengel, J. M., Young, R., Dennis, P.P. and Nomura, M. (1977). Role of Ribosomal Protein S12 in Peptide Chain Elongation: Analysis of Pleiotropic, Streptomycin-Resistant Mutants of *Escherichia coli*¹. *J Bacteriol*. 129(3): 1320-1329.
- Jaskunas, S. R., M. Nomura, and J. Davies. 1974. Genetics of bacterial ribosomes. In M. Nomura, A. Tissieres, and P. Lengyel (ed.), *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.: 333-368.
- Spotts, C.R., 1962. Physiological and biochemical studies on streptomycin dependence in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol*. 28: 347-365.
- Spotts, C.R. and Stanier, R.Y., 1961. Mechanism of streptomycin action on bacteria, a unitary hypothesis. *Nature (London)*. 192: 633-637.
- Maaloe, O., 1969. An analysis of bacterial growth. *Dev. Biol. Suppl*. 3: 33-58.
- Gorini, L. 1971. Ribosomal discrimination of tRNAs. *Nature (London) New Biol*. 234: 261-264.
- Strigini, P. and Brickman, E. 1973. Analysis of specific misreading in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. 75: 659-672.

- Maeder, C. and Draper, D. E. (2005). A Small Protein Unique to Bacteria Organizes rRNA Tertiary Structure Over an Extensive Region of the 50 S Ribosomal Subunit. *J Mol Biol.* 354(2): 436-446.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore P. B. and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 resolution. *Science.* 289: 905-920.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D. and Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucl. Acids Res.* 30: p. 5382-5390.
- Klein, D. J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large subunit. *J Mol Biol.* 340: 141-177.
- Cummings, L., Riley, L., Black, L., Souvorov, A., Resenchuk, S., Dondoshansky, I. and Tatusova, T. (2002). Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. *FEMS Microbiol. Letters.* 216: 133-345.
- Panima, E. M., Mironov, A. A. and Gelfand, M. S. (2003). Coparative genomics of bacterial zinc regulons: Enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *PNAS.* 100(17): 9912-9917.
- Berg, J. M. and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science.* 271: 1081-1085.
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A. and Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biol.* 2 (9).
- Graham, A. I., Sanguinetti, G., Bramall, N., McLeod, C. W. and R. K. Poole, R. K. (2012). Dynamics of a starvation-to-surfeit shift: a transcriptomic and modelling analysis of the bacterial response to zinc reveals transient behaviour of the Fur and SoxS regulators. *Microbiology.* 158: 284-292.
- Poehlsgaard, J. and Douthwaite, S. (2005). The Bacterial ribosome as target for antibiotics. *Nature reviews. Microbiol.* 3(11): 870- 881.

Moore, P. B., Steitz, T. A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem.* 72: 813-50.

Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418: 229-235.

Ramakrishnan V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell.* 108(4): 557-72.

Wilson, D.N., Blaha, G., Connell, S.R., Ivanov, P.V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y., Nierhaus, K.H. (2002). Protein Synthesis at Atomic Resolution: Mechanistics of Translation in the Light of Highly Resolved Structures for the Ribosome. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3(1): 1-53.

Yonath, A. (2002). The search and its outcome: high-resolution structures of ribosomal particles from mesophilic, thermophilic, and halophilic bacteria at various functional states. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 257–273.

Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *International Office of Epizootics,* 31(1): 57-64.

Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., Ramakrishnan, V. (2000). The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell.* 103(7): 1143-1154.

Hlavka, J.J., Boothe, J.H. 1985. (Eds.), *The Tetracyclines*, Springer-Verlag, Heidelberg.

Chopra, I., Hawkey, P. M. and Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 29: 245-277.

Lambert, T. (2010). Aminoglycosides and Gram-negative bacteria. *In Antibiogram* (P. Courvalin, R. Leclercq & L. Rice, eds). ESKA, Portland, Oregon, 225–242.

Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. mol. Biol. Rev.* 65: 232–260.

- Leclercq, R. (2010). – Macrolides, lincosamides, and streptogramins. *In* Antibioqram (P. Courvalin, R. Leclercq & L. Rice, eds). ESKA, Portland, Oregon: 305–326.
- Long, K.S., Hansen, L.H., Jakobsen, L. and Vester, B. (2006). Interaction of pleuromutilin derivatives with the ribosomal peptidyl transferase center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1458–1462.
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Hansen, L.H., Hobbie, S.N., Böttger, E.C. and Vester, B. (2009). Single 23S rRNA mutations at the ribosomal peptidyl transferase centre confer resistance to valnemulin and other antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* by perturbation of the drug binding pocket. *Mol. Microbiol.*, 71: 1218–1227.
- Kestell, D., Lai, S., Liang, G., Waters, S. and Wladichuk, A., 2002. Effects of Kanamycin and Streptomycin on the Macromolecular Composition of Streptomycin-Sensitive and Resistant *Escherichia coli* Strains. *J Exp Microbiol and Immunol. (JEMI)*: 2: 103-108.
- Davies, J. E. 1991. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. in *Antibiotics in laboratory medicine*, ed Lorian V. (The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md), 3rd ed.: 691–713.
- Jelene, P. C. and Kurland, C. G. 1984. Multiple effects of kanamycin on translational accuracy. *Mol. Gen. Genet.* 194 (1-2): 195-199.
- Cabanas, M. J., Vazquez, D., Modolell, J., 1978. Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun.* 83: 991–997.
- Misumi, M. and Tanaka, N. 1980. Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin: a comparative study with fusidic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 92: 647–654.
- Misumi, M., Nishimura, T., Komai, T., Tanaka, N. 1978. Interaction of kanamycin and related antibiotics with the large subunit of ribosomes and the inhibition of translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 84: 358–365.

- Semenkov, Yu. P., Katunin, V. I., Makarov, E. M., Kirillov, S. V. 1982. Quantitative study of kanamycin action on different functions of *Escherichia coli* ribosomes. FEBS Lett. 144: 121–124.
- Wilson, D. N. 2009. The A-Z of bacterial translation inhibitors. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 44(6): 393- 433.
- Gromadski, K. B. and Rodnina, M. V. 2004. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. Nat Struct Mol Biol. 11: 316–322.
- Kurland, C. G., Hughes, D. and Ehrenberg, M. 1996. Limitations of translational accuracy. Cellular and Molecular Biology, Washington DC: ASM Press. In: Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli* and *Salmonella*: 979–1004.
- Feldman, M. B., Terry, D. S., Altman, R. B. and Blanchard, S. C. 2010. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. Nature Chemical Biology. 6: 54–62.
- Metha, R. and Champney, W. S. 2002. 30S Ribosomal Subunit Assembly Is a Target for Inhibition by Aminoglycosides in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (5): 1546-1549.
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C. and Puglisi, J. D. 1996. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. Science. 274: 1367-1371.
- Fourmy, D., Yoshizawa, S. and Puglisi, J. D. 1998. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. J. Mol. Biol. 277: 333-345.
- Moazed, D. and Noller, H. F. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. Nature. 327: 389-394.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P. and Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. Science 292: p. 897-902.

Recht, M. I., Douthwaite, S., Dahlquist, K. D. and Puglisi, J. D. 1999. Effect of mutations in the A site of 16S RNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interactions. *J. Mol. Biol.* 286: 33-43.

Schroeder, R., Waldsich, C. and Wank, H. 2000. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* 19: 1-9.

Akbergenov, R., Shcherbakov, D., Matt, T., Duscha, S., Meyer, D., Wilson, D. N., and Böttger, E. C. 2011. Molecular Basis for the Selectivity of Antituberculosis Compounds Capreomycin and Viomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(10): 4712-4717.

Liou, Y-F., Tanaka, N. 1976. Dual actions of viomycin on the ribosomal functions. *Biochem Biophys Res Comm.* 71: 477-483.

Marrero, P., Cabanas, M. J., Modolell, J. 1980. Induction of translational errors (misreading) by tuberactinomycins and capreomycins. *Biochem Biophys Res Comm.* 97: 1047-1052.

Wurmbach, P., Nierhaus, K. H. 1983. The inhibition pattern of antibiotics on the extent and accuracy of tRNA binding to the ribosome, and their effect on the subsequent steps in chain elongation. *Eur J Biochem.* 130: 9-12.

Modolell, J., Vazquez, D. 1977. The inhibition of ribosomal translocation by viomycin. *Eur J Biochem* 1977; 81: 491-497.

Misumi, M., Tanaka, N. 1980. Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin: A comparative study with fusidic acid. *Biochem Biophys Res Comm.* 1980; 92:647-654.

Lin, Y., Li, Y., Zhu, N., Han, Y., Jiang, W., Wang, Y., Si, S. and Jiang, J. 2014. The anti-tuberculosis antibiotic capreomycin inhibits protein synthesis through disrupting interaction between ribosomal proteins L12 and L10. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Yamamoto, H., Qin, Y., Achenbach, J., Li, C., Kijek, J., Spahn, C. M. T. and Nierhaus, K. H. (2014). EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. (Figure 1.) *Nature Reviews Microbiol.* 12: 89-100.

Raamatud:

Wilson D. N and Nierhaus K. H. 2004. Protein Synthesis and Ribosome Structure. Translating the Genome: p. 449- 460. Wiley-VCH | ISBN: 3527306382.

Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. 2001. The Biological Chemistry of the Elements: the Inorganic Chemistry of Life, 2nd edition, Oxford: Oxford University Press.

Davies, J.E. 1991. – Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. *In* Antibiotics in laboratory medicine (V. Lorian, ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, 691–713.

Kasutatud veebiaadressid

http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/00Sc_activities.html

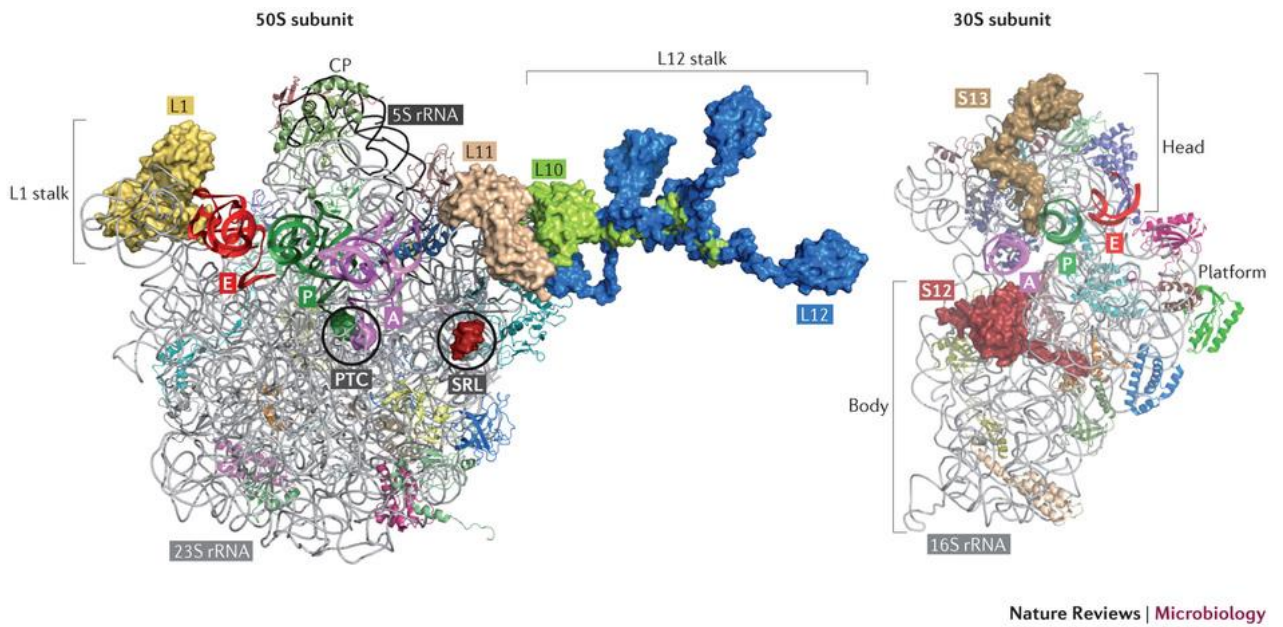
http://www.merckmanuals.com/professional/infectious_diseases/bacteria_and_antibacterial_drugs/aminoglycosides.html

<https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/translate.ht>

http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Microtiter_plate_-_96_wells.jpg

<http://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=24251> (Mgridichian, L. 2013. Molecular Structure Reveals How the Antibiotic Streptomycin Works.)

Lisa 1



Joonis 8. Ülevaade ribosoomi suurest ja väikesest subühikust. Oluline on 5S rRNA ja 23S rRNA paiknemine 50S subühikul ning 16S rRNA paiknemine 30S subühikul (Yamamoto *et al.*, 2014).

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Torp (sünnikuupäev: 02.08.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, „Ribosoomide variatsioonid ja nende seos antibiootikumide tundlikkusega“, mille juhendajad on Jaanus Remme ja Kai Virumäe,

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 seadustest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014