

Tartu Ülikool
Bioloogia-Geograafiateaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut
Molekulaarbioloogia Õppetool

Diana Karitkina

***Escherichia coli* 23S rRNA heeliks 69 roll**
ribosoomis

magistritöö

Juhendaja: prof. Jaanus Remme

Dr. Aivar Liiv

Tartu 2004

LÜHENDID

A	– adensiinkolmfosfaat
C	– tsütidiinkolmfosfaat
G	– guansiinkolmfosfaat
T	– tümidiinkolmfosfaat
U	– uridiinkolmfosfaat
Ψ	– pseudouridiin
30S	– prokarüoodi ribosoomi väike subühik
50S	– prokarüoodi ribosoomi suur subühik
70S	– prokarüoodi ribosoom
80S	– eukarüoodi ribosoom
EF-G	– elongatsiooni factor G
EF-Tu	– elongatsiooni factor Tu
RNA	– ribonukleiin hape
mRNA	– matriits RNA
rRNA	– ribosomaal RNA
tRNA	– transport RNA
EM	– elektron mikroskoopia
PTC	– peptidüültransferaasne keskus

1 SISUKORD

1	Sisukord	3
2	Sissejuhatus	5
3	Kirjanduse ülevaade	6
3.1	Ajalugu	6
3.2	Ribosoomid rakkudes	6
3.3	Ribosoomide struktuur	7
3.3.1	rRNA domeenide struktuur	8
3.3.2	Ribosomaalsed valgud	12
3.3.3	Kasvava peptiidi tunnel	12
3.4	tRNA ja ribosoom	14
3.4.1	A-sait	15
3.4.2	P-sait	16
3.4.3	E-sait	17
3.5	Initsiatsioon	17
3.6	Elongatsioon	18
3.7	Ribosoomi struktuuri ja subühikute kontaktide uurimise meetodit	19
3.8	Sillad	20
3.9	Heeliks 69	24
3.10	rRNA geenid	25
3.11	Pseudouridiinid ja neid sünteesivad ensüümid	27
3.11.1	Modifikatsioonid	27
3.11.2	RNA-d modifitseerivad ensüümid	31
3.11.3	Ψ süntees	33
4	Praktiline osa	34
4.1	Töö eesmärk	34
4.2	Materjal ja meetodid	35
4.2.1	Bakteritüved ja plasmiidid	35
4.2.2	Mutagenees	35
4.2.3	Kasvukõvera mõõtmine	38
4.2.4	Ribosoomide eraldamine	38
4.2.5	rRNA eraldamine ribosoomidest	39
4.2.6	<i>In vitro</i> valgusüntees	39
4.2.7	“Primer extension” analüüs	40
4.3	Tulemused ja arutelu	42

4.3.1	Mutagenees	42
4.3.2	Mutatsioonide mõju raku kasvule	43
4.3.3	Mutantsete 50S subühikute assambleerumine ribosoomidesse	47
4.3.4	<i>In vitro</i> translatsioon	52
5	<i>Kokkuvõtte</i>	56
6	<i>Summary</i>	58
7	<i>Kasutatud kirjandus</i>	59

2 SISSEJUHATUS

Ribosoomid on valke sünteesivad kompleksid. Nad koosnevad kahest subühikust ning sisaldavad ribosomaalsed RNA-d ja valke. Prokariootse ribosoomi suurem subühik ehk 50S subühik koosneb 23S ja 5S rRNA-st ja 33 valgust, väiksem subühik ehk 30S subühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 valgust.

Ribosoomi on uuritud kuuekümnelt aastalt erinevate meetoditega ja saadud palju informatsiooni kompleksi ehituse ja funktsiooni kohta, kuid vaatamata sellele on paljud küsimused tänaseni vastuseta.

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida *Escherichia coli* 23S rRNA heeliks 69 rolli ribosoomis. Kolm uridiini heeliksi 69 lünga positsioonides 1911, 1915 ja 1917 on posttranskriptsiooniliselt muudetud pseudouridiinideks, Ψ1915 on lisaks ka metüleeritud. Heeliks 69 asukoht ribosoomis viitab sellele, et uuritav struktuur on funktsionaalselt oluline, kuna ta asub ribosoomi aktiivsentril lähedal. Heeliks 69 interakteerub A- ja P-saidis olevate tRNA-dega. A-saidi tRNA D-õlg interakteerub heeliks 69 lünga positsioonidega 1913-1915. P-saidi tRNA väike vagu interakteerub heeliksi 69 väikese vao nukleotiididega 1908, 1909, 1922 ja 1923 (Yusupov *et al.*, 2001). Lisaks heeliks 69 lünga alused 1913, 1914 ja 1918 interakteeruvad 16S rRNA heeliks 44 alustega, moodustades subühikutevahelise silla B2a (Gabashvili *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001).

Kuna heeliks 69 pseudouridiin on juba varem uuritud Aivar Liivi poolt, siis selle töö huviorbiiti sattusid pseudouridiin ümbritsevad nukleotiidid ja nende võimalik roll ribosoomi funktsioneerimisel.

3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1 Ajalugu

1940. aastal eraldas ameerika teadlane A. Claude loomarakkudest graanuleid, mis ta nimetas mikrosoomideks, kuna nad olid väiksemad kui mitokondrid ja lüsoosoomid (Claude, 1940). Hiljem tehti kindlaks, et need graanulid koosnevad fosfolipiidsetest-ribonukleoproteiidsetest kompleksitest.

1953-1955. aastatel näitas ameerika teadlane G. Palade oma elektronmikroskoopiliste uuringutega, et rakk sisaldab palju väikeseid tihedaid graanuleid (Palade, 1955). Graanulid olid mikroskoobis nähtavad kas seotuna endoplasmaatilise retiikulumi membraaniga, või vabalt tsütoplasmas.

1956-1958. aastatel olid terves reas ameerika laborites puhastatud ja uuritud ribonukleoproteiidsed partiklid, alguses pärmidest (Chao *et al.*, 1956), taimedest (Ts'ó *et al.*, 1956), loomadest (Petermann *et al.*, 1957) ja siis *E.coli* rakkudest (Tissieres *et al.*, 1958).

1958. aastal toimus esimene sümpoosium, mis oli pühendatud nendele osakestele ja nende rollile valgubiosünteesis (1st Symp. of the Biophysical Society, at the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., February 5, 6 and 8, 1958). Sümpoosiumil tegi R. B. Roberts ettepaneku nimetada need partiklid ribosoomideks (Roberts, 1958).

1959. aastal tõestas Roberts lõplikult, et valgud sünteesitakse ribosoomides ja hiljem transporditakse raku teistesse osadesse.

3.2 Ribosoomid rakkudes

Elusorganismid kulutavad valgusünteesiks rohkem energiat kui mistahes teisteks metabolismireaktsioonideks. Umbes üks kolmandik raku kuivmassist moodustvad molekulid, mis on seotud valgusüntesiga. *E. coli* rakus on umbes 200 000 ribosoomi.

Eukarüootsetes rakkudes on ribosoomide suhteline sisaldus väiksem ja sõltub koe- või rakutüübist.

Prokarüootide ribosoomid on jaotatud üle raku, eukarüootide ribosoomid paiknevad tsütoplasmas. Valgud, mis on määratud funktsioneerima ER-i, Golgi kompleksi, lüsoosoomi membraanis või selle valendikus, raku välismembraanis või hoopis raku väliskeskkonnas, seostuvad oma N-terminaalse osaga ER-i membraani külge, koos valguga seondub sinna ka seda valku sünteesiv ribosoom. Nii, et osa ribosoomide on seotud ER-iga ja osa vabad. Mitokondrid ja plastiidid omavad enda ribosoomide, mis paiknevad mitokondri maatriksis ja plastiidide stroomas.

Endoplasmaatilise retiikulumiga seotud ribosoomid sünteesivad enamasti sekretoorseid valke, vabad ribosoomid aga rakusiseseid valke. Kiiresti kasvavate ja paljunevate diferentseerumata embrüonaalsete rakkude ribosoomid on enamasti vabad.

Peegeldades mitokondrite bakteriaalset päritolu, sarnanevad mitokondriaalsed ribosoomid bakteriaalsete ribosoomidega. Nad erinevad tsütoplasmaatilistest ribosoomidest suuruselt, rRNA ja valkude koostise poolest, reageerivad erinevalt antibiootikumidele. Näiteks klooramfenikool blokeerib valgusünteesi bakterite ja enamuse mitokondriaalsete ribosoomide, kuid mitte tsütoplasma ribosoomide poolt. Tsükloheksimiid aga inhibeerib eukarüootide tsütoplasmaatilisi ribosoomide, kuid mitte bakterite ja mitokondrite ribosoomide (Lodish *et al.*, 2001).

Ribosoom loeb mRNA-s kodeeritud informatsiooni ja tõlgib selle aminohapetejärjestuseks. Peptiidside süntees toimub kiirusega 10 kuni 20 aminohapet sekundis. Ilma katalüsaatorita (ribosoomita) on vastav kiirus $< 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, mis on 10^5 korda madalam (Weber, 1979). Valgusüntees on märkimisväärselt täpne: üks viga 3000 aminohappe kohta (Bouadloun, 1983). Kui arvestada seda, et valgud on keskmiselt 300-500 aminohapet pikkad, siis teeb ribosoom ühe vea iga 6-10 valgu kohta.

3.3 Ribosoomide struktuur

Bakteri ribosoomi mass on umbes 2,6-2,8 MDa, sedimentatsiooni koefitsient 70S (Svedbergi ühikutes) ja diameeter 200-250 nm. Teatud funktsionaalses seisundis (translatsiooni lõpp), või ioonsetel tingimustel (madal

Mg²⁺ konsentratsioon) laguneb 70S ribosoom kaheks subühikuks: väikeseks ehk 30S ja suureks ehk 50S subühikuks. Kaks kolmandikku ribosoomi massist moodustub RNA ja ühe kolmandiku valgud. *E. coli* suurem subühik koosneb 23S rRNA-st (molekulmass 1,2x10⁶ Da, pikkus ~2900 nt), 5S rRNAst (4x10⁴ Da, 120 nt) ja 33 valgust. Väiksem subühik sisaldab 16S rRNA-d (6x10⁵ Da, ~1500 nt) ja 21 valku (Wilson *et al.*, 2002; Wilson and Nierhaus 2003).

Eukarüootse ribosoomi rRNA on pikem, kuna sisaldab lisanukleotiide niinimetatud ekspansiooni järjestustes (ES). Lisa rRNA ja 20-30 lisavalgu suurendavad eukarüootide ribosoomi 30% võrra, võrreldes *E. coli* omaga (Wilson and Nierhaus, 2003). Eukarüooti tsütoplasmaatilise ribosoomi sedimentatsiooni koefitsient on umbes 80S, mitokondrite ja kloroplastide ribosoomide oma on umbes 60S. Imetajate ribosoomi väike subühik koosneb 18S rRNA-st ja 33 valgust, ja suur subühik – 5S, 5,8S, 28S rRNA-dest ja 49 valgust. Organellide ribosoomid koosnevad 5S, 13S ja 21S rRNA-st. Kuigi ribosoomide moodud ja makromolekulaarne koosseis on erinev, on kolmedimensionaalne struktuur neil sarnane (Wilson and Nierhaus, 2003).

3.3.1 rRNA domeenide struktuur

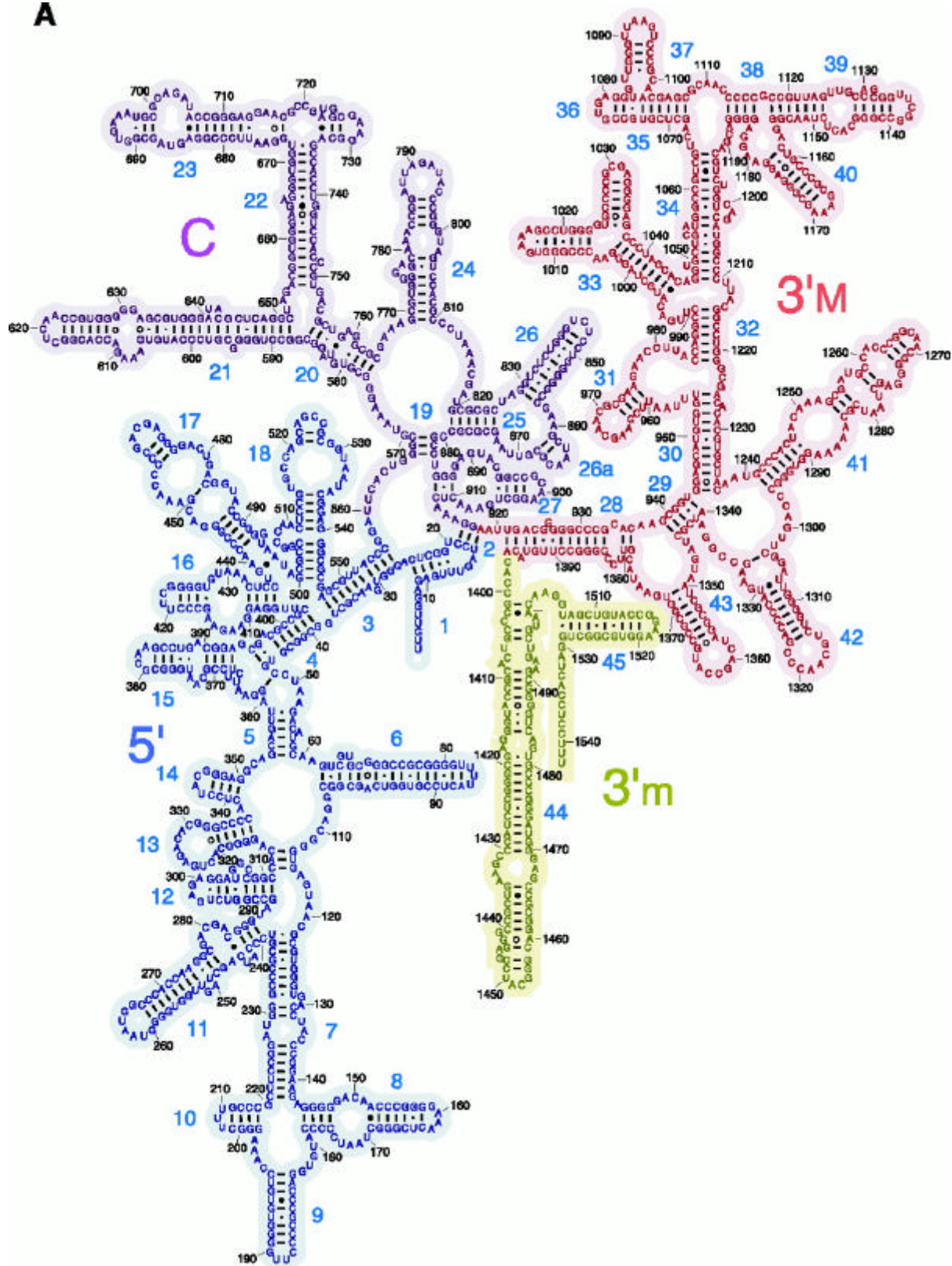
Ribosomaalsete rRNA-de sekundaarstruktuuri on uuritud, võrreldes erinevate liikide rRNA järjestusi (Joonis 1) (Gutell, 1996). Viimaste aastate jooksul on kindlaks tehtud termofiilse bakteri *Thermus thermophilus*'e ribosoomi väikese subühiku struktuur lahutuvusega 3 Å (Wimberly *et al.*, 2000; Schlunzen *et al.*, 2000), arhebakteri *Haloarcula marismortui* ribosoomi suure subühiku struktuur lahutuvusega 2,4 Å (Ban *et al.*, 2000) ja mesofiilse eubakteri *Deinococcus radiodurans*'i ribosoomi suure subühiku struktuur lahutuvusega 3,1 Å (Schlunzen *et al.*, 2001).

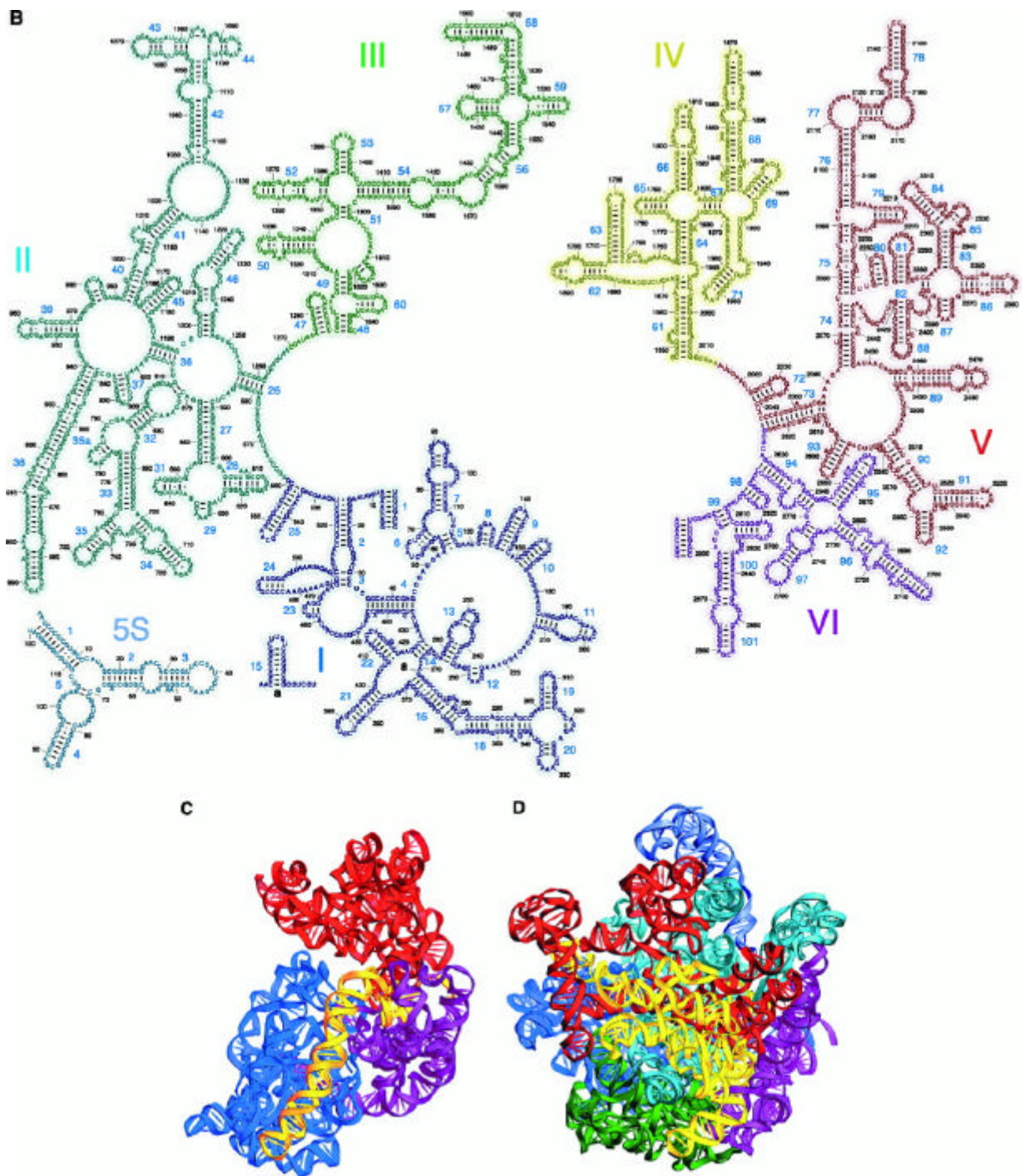
16S rRNA sekundaarne struktuur jagatakse kolmeks domeeniks: 5'-, tsentraalne-, 3' suur- ja 3' väike domeen (Joonis 1A ja C). Erinevalt 23S rRNA-st pole 16S rRNA domeenid omavahel läbipõimunud (Joonis 1C). 5'domeen moodustab 30S subühiku keha, tsentraalne domeen – platvormi, 3' suur domeen – pea. 3' väike domeen koosneb kahest heeliksist: h44 ja h45, nad jooksevad

mööda 30S sisepoolt kaelast alla, siis jälle ülesse kaela juurde ja lõppevad üheaahelalise 3'otsaga, mis sisaldab anti Shine-Dalgarno järjestust.

23S rRNA moodustab suurema osa 50S subühikust, 5S rRNA aga kroonib keskmist mügarikku (*central protuberance*). 23S ja 5S rRNA jagatakse kuueks domeeniks (Joonis 1B ja D). Iga domeen omab teatud kolme-dimensionaalset kuju ja koos moodustavad nad kompaktse ja tihedalt läbipõimunud struktuuri, erinedes selle poolest väikesest subühikust, mille domeenid on hästi eraldatavad (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Teadlased on kokkuleppele jõudnud, et heeliks 25, mis algselt kuulus esimesse domeeni, on nüüd ümberpaigutatud teise domeeni, kuna nende vahel on rohkem sidemeid (Ban *et al.*, 2000). Arvatakse, et ribosoomi 50S subühik on evolutsiooniliselt vanem, tal oli rohkem aega evolutsioneeruda nii keeruliselt läbipõimunud struktuuriks (Wilson *et al.*, 2002). Samas võib olla ka nii, et 30S vajab suuremat liikumisvabadust ja just seepärast on ta lihtsama ehitusega (Ramakrishnan and Moore, 2001).

A





Joonis 1. *T. thermophilus* 16S, 23S ja 5S rRNA-de sekundaar- ja tertsiaalstruktuur. (A) *T. thermophilus* 16S rRNA sekundaarstruktuur. (B) *T. thermophilus* 23S ja 5S rRNA-de sekundaarstruktuur. (C) 16S rRNA kolmedimensiooniline struktuur. (D) 23S ja 5S rRNA-de kolmedimensiooniline struktuur. rRNA on nummerdatud vastavalt *E. coli* numeratsioonile (Brosius *et al.*, 1980), rooma nubritega on tähistatud rRNA domeenid. Joonis on võetud Yusupov *et al.*, 2001.

3.3.2 Ribosomaalsed valgud

Prokarüootide ribosoomi 50S subühiku valgud on ühtlaselt hajutatud suure subühiku tsütosoolsel pinnal, 30S subühikul paiknevad nad enamasti pea ja kaela piirkonnas. Ribosoomi subühikute vaheline ruum on vaba globulaarsetest valkudest. Sageli seonduvad ribosomaalsed valgud heeliksile ühenduskohtadesse ja tihtipeale seovad nad erinevaid rRNA domeene omavahel, näiteks S17 valk seob üheaegselt 16S rRNA 5' domeeni heeliks 7 (h7), h11 ja keskmise domeenist h21 (Ban *et al.*, 2000; Schlutzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Paljud valgud, näiteks S17, omavad globulaarseid domeene, mis paiknevad subühikute pinnal, ja pikki jätkeid, mis ulatuvad kaugemale ribosoomi sisse ja moodustavad seal sidemeid rRNA-ga (Schlutzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001). Jätkeid ei oma defineeritud tertsiaar-, mõnel juhul isegi sekundaarstruktuuri, näiteks PTC keskuse übruses olevad valgud (Nissen *et al.*, 2000).

Peaegu pooled prokarüootide ribosoomi valgud omavad pikka jätkeid (Ban *et al.*, 2000). Väikeses subühikus omavad jätkeid S2, S6, S9, S11, S12, S14, S16, S17 ja *Thermus thermophilus*'e spetsiifiline valk Thx. Suures subühikus on jätkeid L2, L3, L4, L15, L18, L19, L22, L24 valkudel. Jätkeid on rikkad aluselistel aminohapete poolest. 30S subühikus jätkeid leidub ainult nendes valkudes, mis seonduvad 16S rRNA-ga assambleerumise hilistes staadiumites (Ban *et al.*, 2000; ülevaade Wilson *et al.*, 2002). Ilmselt fikseerivad nad 16S rRNA konformatsiooni hilises asambleerimisjärgus, stabiliseerides niimoodi valkude ja rRNA kolmedimensionaalset struktuuri. 50S subühiku valgud L3, L4, L22 ja L25 kuuluvad nende valkude hulka, mis määravad 23S rRNA voltumist ribosoomi asambleerumise varastes staadiumites (Spillmann *et al.*, 1977), antud juhul seovad valgud kaks rRNA domeeni ja lihtsustavad nende assotsiatsiooni.

3.3.3 Kasvava peptiidi tunnel

Tunnel läbib bakteri ribosoomi 50S subühikut, alates peptidüültransferaaskeskusest (PTC) keskmise mügariku (*central protuberance*) alaosast ja lõppedes suure subühiku aluse tsütoplasmaatilisel poolel (Stark *et al.*,

1995). Esimene vihje sellest, et valgutunnel eksisteerib oli saadud kana embrüodest isoleeritud 80S ribosoomide elektronmikroskoopilistel (EM) uuringutel (Milligan *et al.*, 1986). *E. coli* ja roti maksa ribosoomide krüo-EM struktuuride võrdlus tõestas, et valgutunnel on evolutsiooniliselt konserveerunud ja nähtavasti omab tähtsat funktsionaalset rolli (Dube *et al.*, 1998).

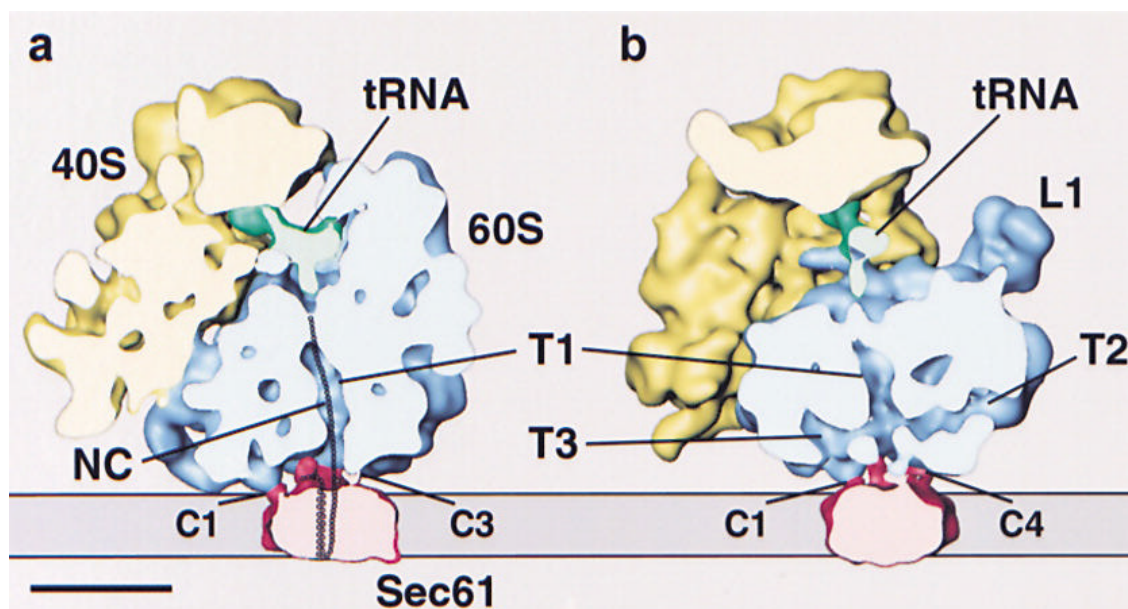
Kasvava peptiidi tunneli pikkus on 100 Å ja sinna võib mahtuda 30-40 aminohappe pikkune peptiid. Tunneli laius on 10-20 Å, diameeter on nii väike, et vastsünteesitud valgul on seal võimatu voltuda (Ban *et al.*, 2000). Tunneli seinad koosnevad enamasti rRNA-st, kuigi tunnelis on ka valkude mitteglobulaarseid osi, mis koosnevad hüdrofiilsetest laenguta rühmadest (Nissen *et al.*, 2000). Näiteks on tunneli kitsaim koht tehtud valdavalt suure subühiku valkudest L22 ja L4 (Nissen *et al.*, 2000; Tenson and Ehrenberg, 2002).

Valgu tunnel on märklauaks valgusünteesi inhibeerivale antibiootikumile - erütromütsiinile (Tenson and Mankin, 2001). Erütromütsiin kutsus esile kuut kuni kaheksat aminohapet kandva, peptidüül-tRNA dissotsiatsiooni ribosoomist (Tenson and Ehrenberg, 2002). *E. coli* suure subühiku kristallstruktuuri pealt on näha, et antibiootikum seondub tunneli sissekäigu ette ja ei lase valgul siseneda tunnelisse (Gabashvili *et al.*, 2001; Tenson and Ehrenberg, 2002). Erütromütsiin peatab valgu sünteesi kuuenda kuni kaheksanda aminohape peal, kuna just nii pikk maa on PTC keskuse ja tunneli sissekäigu vahel (Tenson and Ehrenberg, 2002).

Nagu juba varem oli mainitud, võivad eukarüootsed ribosoomid olla vabad või ER membraaniga seotud. Teadlased võrdlesid vabu 80S ribosoomi ja endoplasmaatilise retikulumiga (ER) seotud 80S ribosoomi (Beckmann *et al.*, 1997). Võrdlus näitas, et ribosoom on seotud ER-iga 50S subühiku alumise osaga. Seda kinnitati hiljem pärmi ribosoomi-Sec61 kompleksi krüo-EM uuringutega (Beckmann *et al.*, 1997). Endoplasmaatilise retiikulumi pooride peamise komponendi Sec61 kolmikkompleks, mis vastutab selle eest, et kasvav peptiidahel sattuks ER-i, asub valgutunneli tagaotsa juures (Beckmann *et al.*, 1997).

Pärmi 80S ribosoomide krüo-EM analüüsidega identifitseeriti, et põhitunnel jaguneb subtunneliteks (Joonis 2), ja sünteesitav valk võib teoreetiliselt väljuda neljast erinevast väljakäigust (Beckmann *et al.*, 2001). Samasugune tunnelite võrk on leitud arhebakteri - *Haloarcula marismortui* 50S kristallstruktuuride uurimistel (Gabashvili *et al.*, 2001).

Hiljutised uuringud on näidanud, et mõned vastsünteesitud valgud sisaldavad väikeseid järjestusi, mis interakteeruvad valgutunneli seintega ja on võimelised mõjutama elongatsioonitsükli (Lovett and Rogers, 1996; Morris and Geballe, 2000; Tenson and Ehrenberg, 2002).



Joonis 2. Pärmi 80S ribosoomi rekonstruktsioon kompleksis Sec61. Sec61 on endoplasmaatilise retiikulumi pooride peamine komponent. Pildil on näidatud ribosoom lõikes. Vertikaalne peptiiditunnel on märgitud T1, kaks kõrvaltunnellit märgitud T2 ja T3. Kasvav peptiid ise on märgitud NC. C1, C3, C4 ribosoomi seondumis kohad Sec61 valguga (Beckmann *et al.*, 2001).

3.4 tRNA ja ribosoom

Ribosoomil on kolm tRNA seondumiskohta. A-sait on ribosoomi piirkond kuhu seondub aminoatsüül tRNA (aa-tRNA) vastavalt mRNA-s sisaldavale koodonile. Aminoatsüül tRNA toob kaasa uue aminohappe, mis hiljem lülitakse kasvavasse peptiidi. P-sait on see koht, kus asub peptidüül-tRNA enne

peptiidsideme teket. Peptidüül-tRNA küljes on kasvav peptiid. E-sait on koht, kus asub ja kust lahkub deatsetüleeritud tRNA. Deatsetüleeritud tRNA küljes pole aminohapet ega peptiidi. Iga tRNA seondub A-saidiga, liigub P-saiti ja väljub E-saidist. Erand on initsiaator tRNA, mis seondub otse P-saiti.

tRNA seondub mRNA-ga koodon-antikoodon interaktsiooni kaudu ja moodustab interaktsioone rRNA-ga. Need interaktsioonid aitavad stabiliseerida tRNA seondumist ribosoomiga ja osalevad funktsionaalsetes protsessides, näiteks tRNA valikus, tRNA translokatsioonis, peptiidsideme sünteesis (Yusupov *et al.*, 2001).

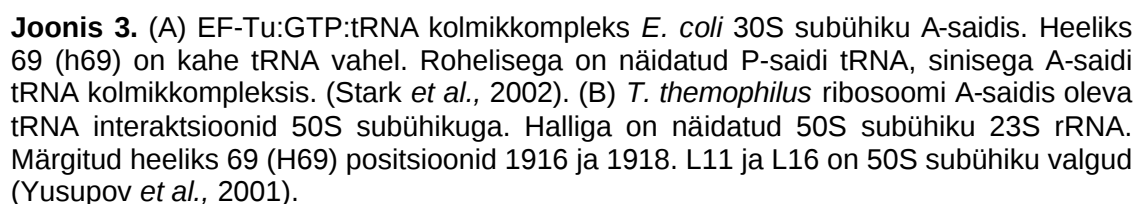
Kui tRNA on seotud ribosoomiga, siis A- ja P-saidis olevate tRNA-de tasapinnad on omavahel 26° nurga all (Yusupov *et al.*, 2001). P- ja E-saidi tRNA-de tasapinnad on 46° all (Yusupov *et al.*, 2001). Minimaalne kaugus A- ja P-saidi tRNA-de antikoodon õlg vahel on 10 Å (Yusupov *et al.*, 2001), mis tundub olevat suur kaugus arvestades seda, et need tRNA-d loevad kõrval olevaid koodoneid. See on võimalik tänu sellele, et mRNA teeb 45 kraadilise nurga A- ja P-saidi vahel. A- ja P-saidi tRNA aktseptorõlad asuvad 5 Å kaugusel üksteisest (Yusupov *et al.*, 2001). P- ja E-saidi tRNA-de antikoodon õlg vahe on 6 Å, mis on vähem kui A- ja P-saidis olevate tRNA vahel (Yusupov *et al.*, 2001). Kuid E-saidis oleva tRNA aktseptorõlg on pööratud P-saidis oleva tRNA poolt eemale ja nende 3'-otsad on 50 Å kaugusel (Yusupov *et al.*, 2001). tRNA antikoodon ots liigub 28 Å 30S A- ja P-saidi vahel ja 20 Å P- ja E-saidi vahel (Yusupov *et al.*, 2001).

3.4.1 A-sait

A-saidis oleva EF-Tu:GTP:tRNA kolmikkompleksi tRNA ja P-saidis oleva tRNA antikoodonite omavaheline kaugus on 22 ± 2 Å (Stark *et al.*, 2002). Kolmikkompleksis oleva aa-tRNA orientatsioon on teistsugune kui peale elongatsiooni faktori lahkumist (Yusupov *et al.*, 2001).

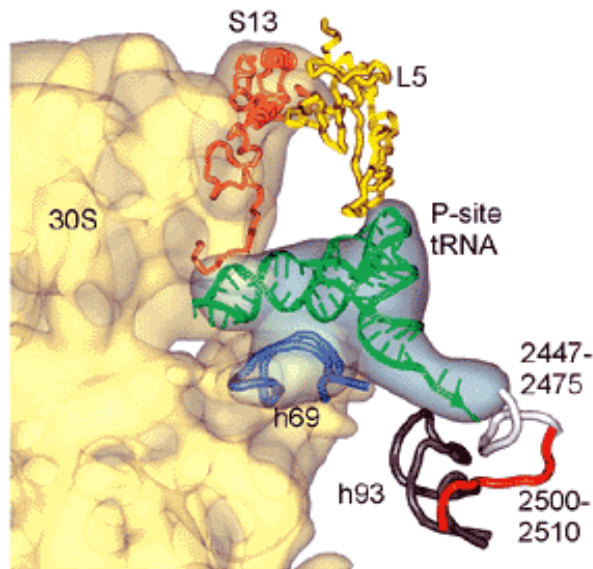
Kui tRNA on seotud A-saidiga, siis selle tRNA antikoodon-lingu ümbritsevad 16S rRNA kolm konserveerunud lämmastikalust G530, A1492 ja A1493, mis mõjutavad tRNA seondumist A-saiti (Powers and Noller, 1990). A-

Heeliks 69 ulatub välja A-saiti, kus ta interakteerub aa-tRNA D-õla väikese vaoga (Stark *et al.*, 2002; Yusupov *et al.*, 2001).



P-saidis oleva tRNA antikoodon õlg interakteerub 16S rRNA-ga kuues kohas (Cate *et al.*, 1999). Kahes nendest interaktsioonidest osalevad ka valkude S13 ja S9 C-terminaalsed sabad (Joonis 4). 23S rRNA heeliks 69 väiksem vagu interakteerub tRNA D-õla väiksema vaoga (Yusupov *et al.*, 2001).

Krüo-EM tulemuste andmetel P-saidi tRNA T-ling interakteerub 50S subühiku valguga L5 (Stark *et al.*, 2002), samasugused andmed on ka kristallstruktuuride uurijatel (Yusupov *et al.*, 2001).



Joonis 4. *E. coli* ribosoomi 30S subühiku kontaktid P-saidis oleva tRNA-ga. Rohelisega näidatud tRNA, sinisega 23S rRNA heeliks 69. (Stark *et al.*, 2002).

3.4.3 E-sait

E-saidi tRNA antikoodon õlg on 30S pea ja platvormi vahel, kus ta moodustab interaktsioone. L1 valk ja tema seondumiskoht (23S rRNA heeliks 76 ja 77) interakteeruvad E-saidi tRNA õlaga (Yusupov *et al.*, 2001). E-saidi tRNA aktseptor õlg oma väiksema vaoga interakteerub 23S rRNA heeliks 68-ga (Yusupov *et al.*, 2001). tRNA CCA saba interakteerub 23S rRNA heeliks 11, 74 ja 75, ning valguga L33 (Yusupov *et al.*, 2001).

3.5 Initsiatsioon

Initsiaator-tRNA tunneb ära start-koodoni AUG ja seondub sellega. Bakteriaalne initsiaator-tRNA kannab formüülmetioniini, eukarüootide ja ürgide initsiaator-tRNA kannab metioniini (Wilson and Nierhaus, 2003). Initsiaator tRNA seondumisprotsessi viivad läbi initsiatsioonifaktorid (bakterites IF1, IF2, IF3,

eukarüootides on initsiatsiooni faktoreid rohkem) (ülevaade Wilson and Nierhaus, 2003).

Esimesena seondub ribosoomi 30S subühikuga IF3, millel on vähemalt kaks funktsiooni. IF3 koosneb kahest domeenist, tema C-terminaalne domeen takistab 70S ribosoomi moodustumist (Carter *et al.*, 2001). IF3 on anti-assotsiatsiooni faktor. IF3 faktori N-terminaalne domeen vastutab koodon-antikoodon diskrimineerimise eest P-saidis (Wilson and Nierhaus, 2003).

IF1 funktsioon on ebaselge. IF1 seondub A-saiti, mis võiks tähendada seda, et ta takistab initsiaator tRNA seondumist A-saiti (Carter *et al.*, 2001). Samas on näidatud, et faktor-vaba 30S subühik seob tRNA ikkagi P-saiti (Gnirke *et al.*, 1986).

IF2 seob tRNA ja juhatab selle 30S subühikusse. IF2 homoloog eukarüootides on eIF5B, ürgides aIF5B (Wilson and Nierhaus, 2003).

3.6 Elongatsioon

Elongatsioonitsükli võib jagada kolmeks osaks:

1. tRNA seondumine A-saiti. Toimub madala afiinsusega koodon-antikoodon interaktsioon, millele järgneb aminoatsüül rühma seondumine PTC keskusega ja tRNA kõrge afiinsusega seondumine A-saidiga.
2. Peptiidsideme moodustumine, kus värskelt sünteesitud peptiidahel kantakse üle P-saidi tRNA pealt A-saidis oleva tRNA peale.
3. Translokatsioon. mRNA ja tRNA-de liikumine ribosoomis ühe koodoni võrra nii, et deatsetüleeritud-tRNA liigub P-saidist E-saiti ja peptidüül-tRNA liigub A-saidist vabanenud P-saiti. A-sait jääb vabaks ja ribosoom on valmis järgmise tRNA vastuvõtuks.

Neid reaktsioone katalüüsivad elongatsiooni faktorid EF-Tu ja EF-G. EF-Tu aitab aa-tRNA-l seonduda A-saidiga, EF-G aga vahendab tRNA liikumist A-saidist P-saiti. Mõlemad faktorid on visualiseeritud krüo-EM meetodiga (Stark *et al.*, 1997; Agrawal *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 2000).

Aminoatsüül-tRNA seondub ribosoomiga kolmikkompleksina koos elongatsioonifaktoriga (bakterites EF-Tu, eukarüootides EF1a) ja GTP-ga. Kui tRNA antikoodon tunneb ära mRNA koodoni, toimub kiire GTP hüdroolüüs, mis

omakorda põhjustab EF-Tu-GDP kompleksi konformatsiooni muudatust ja faktor laseb ennast tRNA küljest lahti. Vale koodon-antikoodon interaktsioon viib kolmikkompleksi tõrjumisele (mittekognaatne antikoodon), või aeglasele GTP hüdrolüüsile (near-cognate antikoodon). Nagu näha on tRNA valik ja GTP hüdrolüüs omavahel seotud (Rodnina and Wintermeyer, 2001; Pape *et al.*, 2000; Pape *et al.*, 1999; Rodnina *et al.*, 1996; Vorstenbosch *et al.*, 1996).

Peptiidsideme moodustumine toimub 50S subühikul PTC keskuses. Kasvav peptiidahel P-saidis oleva tRNA pealt kantakse üle aa-tRNA peale, mis asub A-saidis. Deatsetüleeritud P-saidi tRNA võib liikuda E-saiti, A-saidi tRNA mis muutus peptidüül-tRNA-ks liigub P-saiti. A-sait vabaneb ja on valmis vastu võtma järgmise aa-tRNA molekuli. Järgmise aa-tRNA seondumine vabastab deatsetüleeritud-tRNA E-saidist. Tsükkel kordub nii kaua kui A-saiti jõuab stopkoodon, siis toimub valgusünteesi terminatsioon.

t-RNA-de liikumist ühest saidist teise nimetatakse translokatsiooniks, ja seda viib läbi teine elongatsiooni faktor - bakterites EF-G, eukarüootides EF2. Pre- ja posttranslokatsiooni oleku vaheline energia barjäär *E. coli* ribosoomides on 120 kJ/mol (Schilling-Bartetzko *et al.*, 1992). Faktorvaba elongatsioon toimub neli korda aeglasemini (Gavrilova *et al.*, 1976).

3.7 Ribosoomi struktuuri ja subühikute kontaktide uurimise meetodit

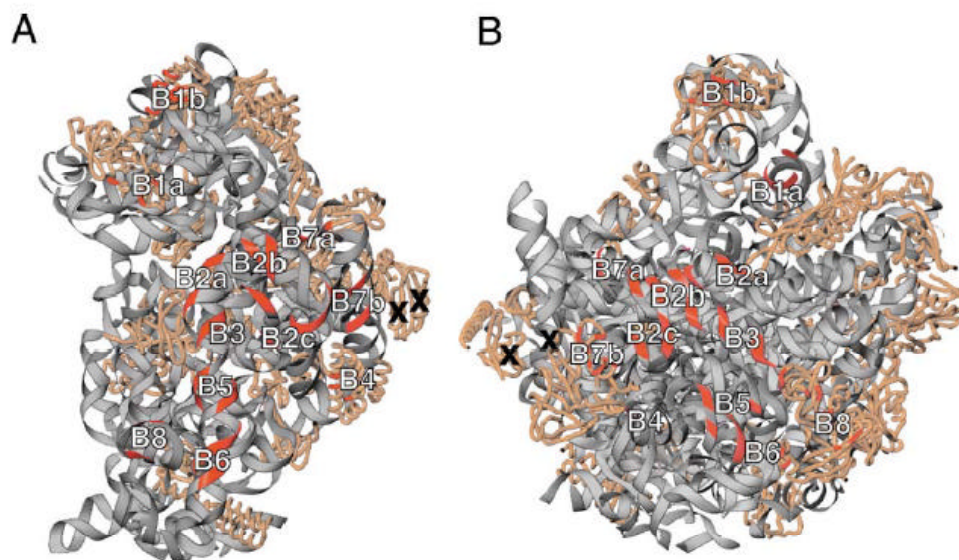
Ribosoomi struktuuri uurimine arenes tänu elektronmikroskopistidele. Madala resolutsiooni immunoelektronmikroskoopia meetodiga uuriti erinevate makromolekulaarsete komponentide asukohta ribosoomis (Stöffler-Meilecke and Stöffler, 1990). Krüoelektronmikroskoopia lubas tänu suuremale lahutuvusele täpsemalt uurida ribosoomi struktuuri ja funktsionaalseid komplekse (Frank *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1997; Gabashvili *et al.*, 2000). Hiljem kirjeldati röntgenkristallograafia meetodiga ribosoomi täpset aatomstruktuuri (Yusupov *et al.*, 1991; Cate *et al.*, 1999). Tänapäevaks on teada ürgi *Haloarcula marismortui* ribosoomi 50S subühiku kristallstruktuur 2,4 Å lahutuvusega (Ban *et al.*, 2000), *Thermus thermophilus* 30S subühiku kristallstruktuur 3,0-3,3 Å lahutuvusega

(Schluenzen *et al.*, 2000) ja 70S kristallstruktuur 5,5 Å lahutuvusega (Yusupov *et al.*, 2001).

Ribosoomi subühikute vahelisi interaktsioone uuriti biokeemiliste meetoditega nagu näiteks footprinting, cross-linking ja geneetiliste uuringutega (Brimacombe, 1995; Green and Noller, 1997).

3.8 Sillad

Ribosoomi subühikud on omavahel interaktsioonis, moodustades sildu, mis on tähtsad ribosoomi üldise struktuuri säilitamiseks (Frank *et al.*, 1995a; Cate *et al.*, 1999; Gabashvili *et al.*, 2000), lisaks võivad sillad osaleda ka translatsiooni dünaamikas (Frank and Agrawal, 2000, 2001).



Joonis 5. Subühikute vahelised sillad *E. coli* 70S ribosoomis. (A) 30S subühiku sisekülj ja (B) 50S subühiku sisekülj. Punasega näidatud kontaktide kohad, sillad märgitud numbritega, X tähistavad S6 ja L2/L9 valkude vaheliseid kontakte. RNA on näidatud hallina ja valgud pruunina. (Gao *et al.*, 2003).

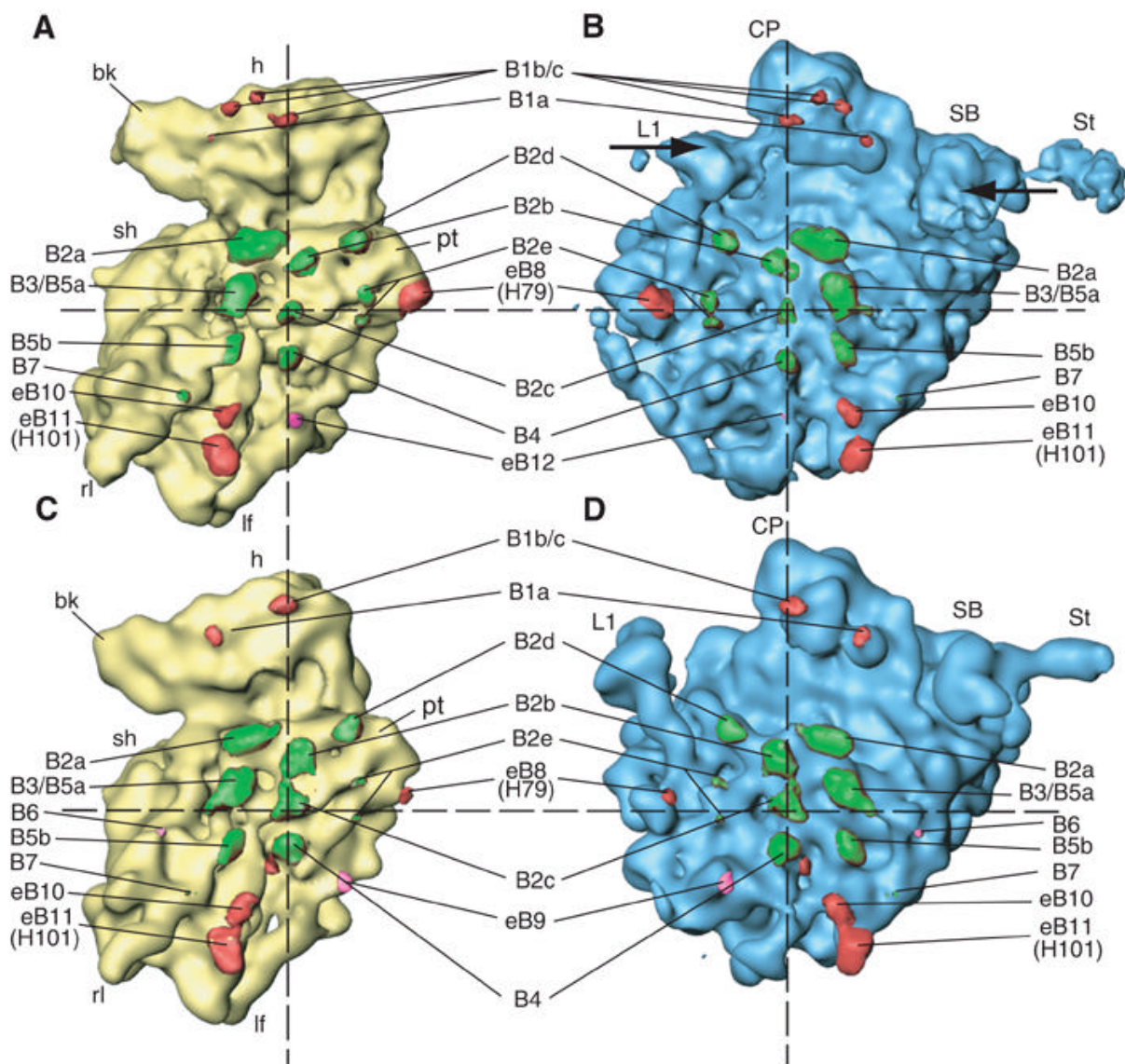
Sildade arv varieerub liikide vahel, kuid nende asukoht jääb üldiselt samaks. Gabashvili leidis oma krüo-EM uuringute käigus (2000a.) *E. coli* ribosoomis kolmteist subühikutevahelist kontakti (Joonis 5). Yusupov uurides (2001a.) *T. thermophilus* 70S ribosoomi 5,5 Å kristallstruktuure leidis rohkem kui 30 subühikutevahelist kontakti, mis olid jaotatud kaheteist silla vahel (Tabel 1). *E. coli* (Joonis 5), *T. thermophilus* ja pärmide (Joonis 6) ribosoomi subühikute

vahelised sillad on kõrgelt konserveerunud, mis viitab sellele, et nad on tähtsad ribosoomi funktsioneerimiseks (Spahn *et al.*, 2001).

Tabel 1. *E. coli* ribosoomi subühikute vahelised sillad.

sild	silla tüüp	30S	50S
B1a	p-r	S13 (92-94)	H38 (886-888)
B1b	p-p	S13 (NH ₂ -term)	L5 (134-153)
B2a	r-r	H44 (1408-1410, 1494-1495)	H69 (1913-1914, 1918)
B2b	r-r	H24 (784-785, 794)	H67 (1836-1837) H69 (1922)
	r-r	H45 (1516-1519)	H71 (1932) H69 (1919-1920)
B2c	r-r	H24 (770-771)	H67 (1832-1833)
	r-r	H27 (900-901)	H67 (1832-1833)
B3	r-r	H44 (1484-1486)	h71 (1947-1948, 1960-1961)
B4	r-r	H20 (763-764)	H34 (717-718)
	p-r	S15 (40-44, COOH-term)	H34 (713, 717)
B5	r-r	H44 (1418-1419)	H64 (1768-1769)
	r-p	H44 (1420-1422)	L14 (44-49)
	r-r	H44 (1474-1476)	H62 (1689-1690)
	r-r	H44 (1474-1476)	H64 (1989)
B6	r-r	H44 (1429-1430, 1474-1476)	H62 (1689-1690, 1702-1705)
	r-p	H44 1431	L19
B7a	r-r	H23 (698, 702)	H68 (1848-1849, 1896)
B7b	r-p	H23 (712-713)	L2 (162-164, 172-174, 177-178)
	r-p	H24 (773-776)	L2 (177-178, 198-202)
B8	r-p	H14 (345-347)	L14 (116-119)

Sillad on nummerdatud B1a, B1b jne. On ära toodud silla tüüp RNA-RNA (r-r), RNA-valk (r-p), valk-valk (p-p). Märgitud ka sillas osalev komponent ja positsioonid. S – väikese subühiku valk; L – suure subühiku valk; H – heeliks. Näiteks: 30S S13 valgu aminohapped 92-94 ja 50S heeliks 38 positsioonid 886-888. (Yusupov *et al.*, 2001)

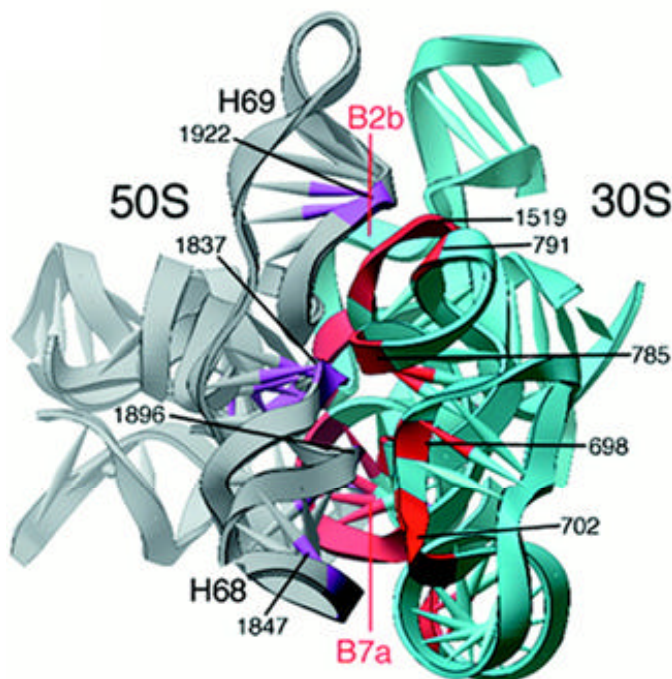


Joonis 6. Pärmi 80S ribosoomi subühikute vahelised sillad. (A,B) kompleks 80S, eEF2 ja antibiootikum sordariin vahel. (C,D) POST 80S ribosoom. A, C paneelil on näidatud 40S ja B, D paneelil 60S subühik. Subühikud on näidatud sisekülje poolt. Roosaga on märgitud sillad, mis on spetsiifilised ribosoomi ühe konformatsiooni jaoks, kuid mitte teise jaoks, rohelisega need mis subühikute liikumise korral jaavad muutumatuks. Punasega on näidatud need sillad mis koosnevad valk-RNA komponentidest. (Spahn *et al.*, 2004)

Kontakte on kolmet liiki: RNA-RNA kontaktid, RNA-valk kontaktid ja valk-valk kontaktid. RNA-RNA kontaktid esinevad ribosoomi subühikutevahelises ruumis, kuna see piirkond on enamasti valguvaba. Valk-valk ja RNA-valk kontaktid on aga perifeerias (Yusupov *et al.*, 2001).

Üle 80% *E. coli* ribosoomi subühikute vahelistest sildadest sisaldavad kontakte väikese subühiku heeliksile 23, 24, 44 ja suure subühiku heeliksile 64, 67-71 vahel (Yusupov *et al.*, 2001).

B1a ja B1b sillad asuvad A- ja P-saidi tRNA-de kohal ja seovad omavahel 30S “pea” ja 50S subühiku ülemise osa. B1b on ainuke valk-valk sild (Yusupov *et al.*, 2001). 16S rRNA heeliks 44 on B2a, B3, B5 ja B6 sildade komponent (Yusupov *et al.*, 2001). B2a sillad osalevad ka 23S rRNA heeliks 69 positsioonid 1913, 1914 ja 1918 (Yusupov *et al.*, 2001).



Joonis 7. *E.coli* ribosoomi subühikute vahelised sillad B2b ja B7a. B2b sillad osaleb 50S rRNA heeliks 69. (Yusupov *et al.*, 2001).

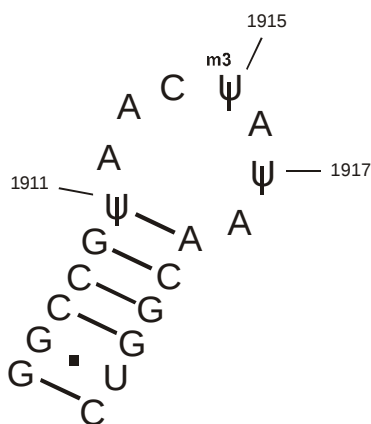
E. coli 70S ribosoomide struktuuri uurimisel erinevates seisundites (initsiatsiooni seisus ja kompleksina koos EF-G-GTP-ga), leiti muutusi ribosoomi konformatsioonis ja subühikutevahelistes kontaktides (Gao *et al.*, 2003). Erinevused olid enamasti valk-valk ja RNA-valk sildades nagu B1a, B1b ja B7b (Gao *et al.*, 2003). Osa sildu, näiteks B1a ja B7b kaob, kui ribosoomiga seondub EF-G:GTP (Gao *et al.*, 2003). Ainuke *E. coli* valk-valk sild B1b koosneb valkudest

S13 ja L5 kontaktidest (Gao *et al.*, 2003). Ribosoomi subühikute liikumise käigus muutuvad interaktsioonid nende valkude vahel ja kontaktis osalevad juba teised positsioonid. B5 ja B8 sillad, mille moodustumisest võtab osa valk L14, ei muutu märgatavalt kuigi valk ise pöördub 14° kraadi võrra (Gao *et al.*, 2003). Põhjalikum uuring näitas, et muutus sillas on väike kuna positsioonid, mis osalevad silla moodustumises, paiknevad valgu pöördumistelje lähedal (Gao *et al.*, 2003). Varem oli juba kirjeldatud “*ratchet*” liikumise suurest mõjust B1a ja B1b sildadele (Frank and Agrawal, 2000). RNA-RNA sillad sellised nagu B2a-c, B3, B5 ja B7a jäid subühikute liikumisel aga muutumatuks (Gao *et al.*, 2003).

B2b sild (Joonis 7) vahendab konformatsioonilisi muudatusi subühikute vahel (Yusupov *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2001).

3.9 Heeliks 69

Heeliks 69 on osa 23S rRNA IV domeenist, ta on 19nt pikk (positsioonid 1906-1924) ja on kõrgelt modifitseeritud.



Joonis 8. *E. coli* 23S rRNA heeliks 69 sekundaarstruktuur. Pildil on ära toodud pseudouridiinide positsioonid. Ψ - pseudouridiin. m³Ψ - 3-metüülpseudouridiin.

Kristallograafilised uuringud näitasid, et see konserveerunud struktuur ulatub 50S subühikust välja ja asub 16S rRNA dekodeerivas tsentris kahe tRNA vahel. Täpsemalt – heeliks 69 väiksem vagu interakteerub P-saidi tRNA D õla väikese vaoga. Heeliksi ling aga interakteerub A-saidi tRNA D õlaga (Yusupov *et al.*, 2001). Kuna heeliks 69, ulatudes suurest subühikust välja, asub väiksema

subühiku dekodeerivas tsentris ja kahe tRNA vahel, siis võib oletada, et sellel struktuuril on tähtis osa valgusünteesis. Heeliksi täpne bioloogiline ja struktuurne roll on veel teadmata. Seotus tRNA-dega tekitab tõenäoliselt heeliksi konformatsiooniilisi muutusi valgusünteesi tsükliks.

Heeliks 69 sekundaarne struktuur on fülogeneetiliselt kõrgelt konserveerunud, *E. coli* kolm nukleotiidi positsioonides 1911, 1915, 1917 on posttranskriptsiooniliselt modifitseeritud pseudouridiinideks (Ψ), 1915 on lisaks veel metüleeritud (Kowalak *et al.*, 1996). Modifikatsioonid võivad mõjutada heeliks 69 painduvust, või heeliksi interaktsioonide võimet (Chui *et al.*, 2002-I).

Ürgi *Sulfolobus acidocaldarius* 23S IV domeenis on leitud kaks Ψ positsioonides 2060 ja 2066 (*E. coli* numeratsiooni järgi vastavalt 1917 ja 1923) (Massenet *et al.*, 1999). Ψ positsioonis 2066 on leitud eukarüootidel: *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *H. sapiens*.) ja mitte kunagi bakteritel (Massenet *et al.*, 1999). Ψ positsioonis 1911 esineb nii *E. coli*'s kui ka sellistel organismidel nagu *B. subtilis*, *Zea mays*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *H. sapiens* kuid ei ole leitud *Sulfolobus acidocaldarius*'el (Massenet *et al.*, 1999).

Eelnevad uuringud on näidanud, et Ψ 1915 positsioonis destabiliseerib heeliks 69, kusjuures m^3U ei oma sellist efekti (Chui *et al.*, 2002-II). Pseudouridiini metüleerimine positsioonis 1915 stabiliseerib heeliksiti (Chui *et al.*, 2002-II). Stabiilsust lisavad ka uridiin ja 3-metüülpseudouridiin vastavas positsioonis (Chui *et al.*, 2002-II).

Nendest andmetest selgub, et metüülrühmal on tähtis struktuurne osa pseudouridiini koosseisus. Isegi väikesed muudatused RNA struktuuris võivad omada suurt bioloogilist tähtsust, sellest võib sõltuda näiteks 1920 lingu korrektne asetus ribosoomis (Chui *et al.*, 2002-II).

3.10 rRNA geenid

rRNA geenide transkriptsiooni käigus tekib prekursor-molekul, mis on palju suurem kui rRNA molekulid ribosoomis. Need prekursor-molekulid protsessitakse post-transkriptsiooniliselt. *E. coli* rakudes rRNA geeni transkript on 30S suur, mis lõigatakse 5S, 16S, 23S rRNA ja kaheks tRNA molekuliks. Nende kolme rRNA-

de pärinemine ühest transkriptist kindlustab selle, et neid saab võrdse hulgal. Inimese rRNA prekursor on 45S rRNA (umbes 13.000 nukleotiidi pikk). Sellest tekib edasise protsessingu teel kolm erinevat rRNA-d (28S, 5,8S ja 18S RNA). Eukarüootidel 5S rRNA protsessitakse eraldi geeni transkriptist. Lisaks post-transkriptsioonilisele lõikamisele toimub paljude nukleotiidide modifitseerimine (Lewin, 1994).

Enamustes elusorganismides rRNA geenid on esitatud mitmes koopias. *E. coli* rakus seitse rRNA operooni (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*) on jaotatud kromosoomi kolmes piirkonnas. Eukarüootidel rRNA geene on sadu ja isegi tuhandeid koopiaid (Lewin, 1994).

Eukarüotides ribosomaalse RNA süntees toimub tuumakeses ja on katalüüsitud RNA polümeraas I poolt. Tuumake on kõrgelt spetsialiseerunud tuuma piirkond, mis tekib rRNA geenide transkriptsiooni ja ribosoomi asambleerimise ajal. Elektronmikroskoobi abil võib tuumakeses eristada kolme eri piirkonda:

- fibrillaarne tsenter, sisaldab DNA-d mida parasjagu ei transkribeerita;
- tihe fibrillaarne komponent, sisaldab sünteesitavat RNA-d;
- granulaarne komponent, sisaldab formeeruvaid ribosoomi partikleid.

Tuumake moodustub ribosomaalse RNA geene sisaldavate kromosoomilõikude ümber. Vastavat kromosoomi osa, kus see geeniklaster paikneb, nimetatakse tuumakese organisaatori piirkonnaks (NOR). Tuumakese suurus peegeldab raku aktiivsust ja ta varieerub oluliselt erinevates rakkudes ning muutub ka ühes ja samas rakus rakutsükli eri faasides.

Inimese genoomis leidub NOR viiel eri kromosoomil (13, 14, 15, 21, 22). NOR-id paiknevad kromosoomide lühikeste õlgade otstes. Kokku on inimese genoomis umbes 200 rRNA geeni koopiat, mis on tandeemselt organiseerunud.

Mitokondriaalne DNA kodeerib rRNA-d ja paar ribosoomi valku, ülejäänud valgud imporditakse tsütosoolist. Enamuse eukarüootide tRNA mis osaleb valgu sünteesis mitokondris on kodeeritud mtDNA poolt. Kuid nisu, *Trypanosoma brucei* ja ripsloomade tRNA on kodeeritud rakulise DNA poolt ja transporditakse mitokondrisse (Lodish et al., 2001).

3.11 Pseudouridiinid ja neid sünteesivad ensüümid

3.11.1 Modifikatsioonid

rRNA biosünteesi käigus toimub pre-rRNA modifitseerimine post-transkriptsiooniliselt. On olemas kolm modifitseerimis põhitüüpi: uridiini muutmine pseudouridiiniks (Ψ), riboosi-2'-hüdoksüülide metüleerimine (Nm) ja lämmastikaluste modifitseerimine metüleerimise teel (mN). Modifikatsioonide arv ja keerukus erineb liikide vahel (Ofengand and Bakin 1997; Maden, 1990). Eukarüootide rRNA on rohkem modifitseeritud kui prokarüootide oma.

Tabel 2. rRNA-s esinevad modifikatsioonid ja nende arv.

liik/modifikatsioon	Ψ	Nm	mN
<i>Escherichia coli</i>	11	4	21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44	54	10
<i>Homo sapiens</i>	~91	105	10

Pseudouridiinid (Ψ), metüleeritud riboosi-2'-hüdoksüülid (Nm) ja metüleeritud lämmastikalused (mN).

Escherichia coli ribosomaalses RNA-s on teadaolevalt 35 modifitseeritud nukleotiidi, nendest 11 on pseudouridiinid. Üks pseudouridiin paikneb ribosoomi väikeses subühikus (Bakin *et al.*, 1994a), ülejäänud 10 aga suures subühikus (Bakin and Ofengand, 1993; Bakin *et al.*, 1994b; Kaya and Ofengand, 2003). Metüleeritud nukleotiide on suures subühikus 11 ja väikeses 10. Metüleeritud 2'-hüdoksüülidega nukleotiide on suures subühikus 3 ja väikeses 1. Suures subühikus on ka lisamodifikatsioon dihüdrouridiin (D) positsioonis 2449. Väikese subühiku 1402 positsioonis olev m⁴Cm on kaks korda modifitseeritud ja suure subühiku 1915 positsioonis paiknev pseudouridiin on ka metüleeritud (Kowalak *et al.*, 1996).

Tabel 3. *E. coli* rRNA modifikatsioonid.

<i>E. coli</i> rRNA modifikatsioonid			
16S		23S	
positsioon	modifikatsioon	positsioon	modifikatsioon
516	Ψ	745	m ¹ G
527	m ⁷ G	746	Ψ
966	m ² G	747	m ⁵ U (T)
967	m ⁵ C	955	Ψ
1207	m ² G	1618	m ⁶ A
1402	m ⁴ Cm	1835	m ² G
1407	m ⁵ C	1911	Ψ
1498	m ³ U	1915	m ³ Ψ
1516	m ² G	1917	Ψ
1518	m ⁶ ₂ A	1939	m ⁵ U (T)
1519	m ⁶ ₂ A	1962	m ⁵ C
		2030	m ⁶ A
		2069	m ⁷ G
		2251	Gm
		2445	m ² G
		2449	D
		2457	Ψ
		2498	Cm
		2503	m ² A
		2504	Ψ
		2552	Um
		2580	Ψ
		2604	Ψ
		2605	Ψ

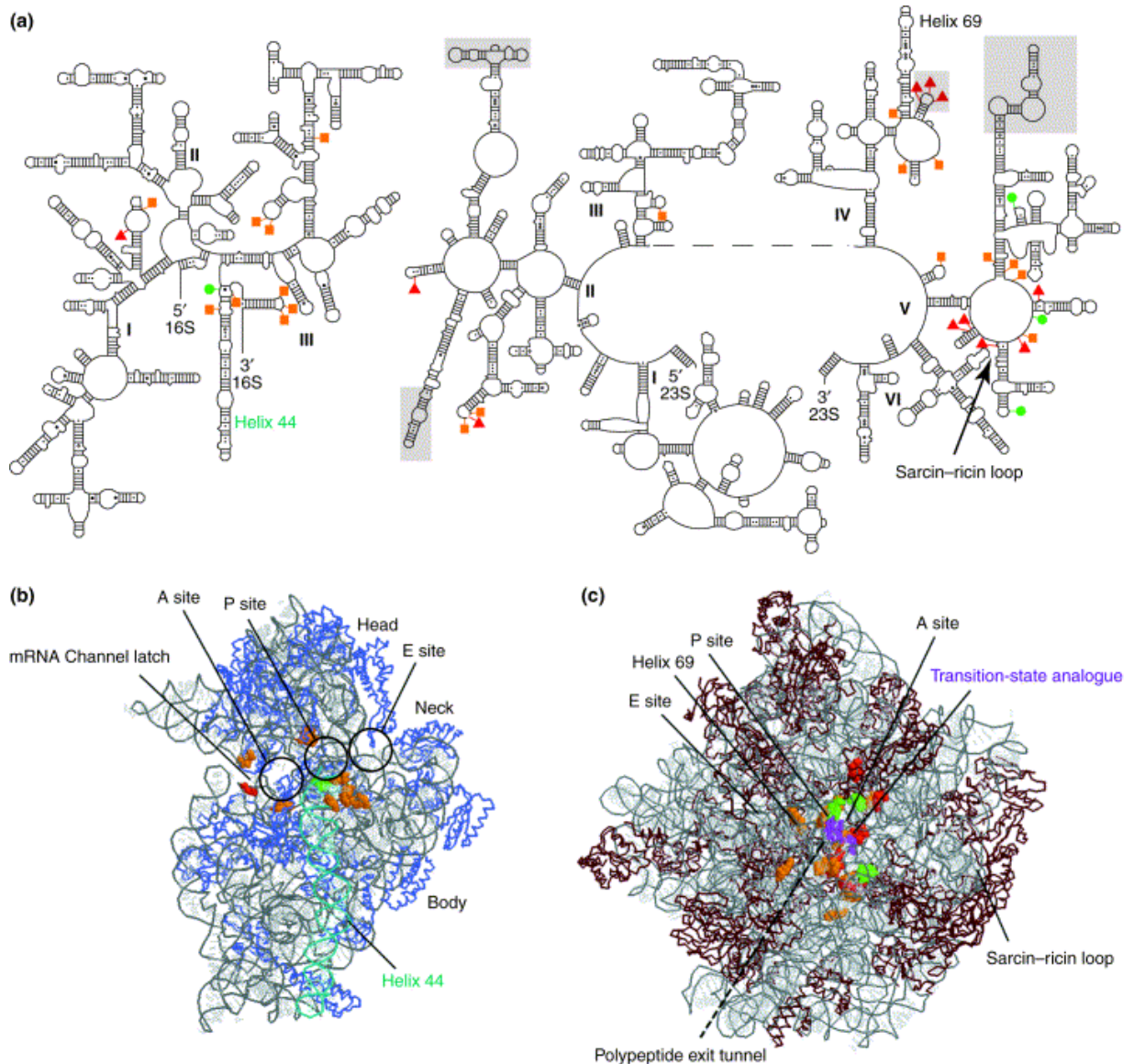
Pseudouridiinid (Y), *metüleeritud riboosi-2'-hüdrosüülid* (Nm), *metüleeritud lämmastikalused* (mN) ja *dihüdrouridiin* (D). (Kowalak et al., 1993, 1995; Bakin et al., 1993, 1994a; Branlant et al., 1981).

On märgatud, et paljud ribosoomi suure subühiku pseudouridiinid (Ψ) asuvad aktiivtsentrite läheduses (Nissen et al., 2000; Yusupov et al., 2001). Näiteks *H. marismortui* Ψ2492 paikneb ainult kuue aluse kaugusel positsioonist A2486 (*E. coli* positsioon A2451), mis vastutab peptiidsideme sünteesi eest (Nissen et al., 2000). Kõigis eukarüootides on positsioonis 2589 Ψ ja ta on kohe peale 2588, mis on seotud A-saidis oleva tRNA C75-ga (Ofegand et al., 2001).

A-saidi tRNA A76 on seotud pseudouridiiniga positsioonis 2620, või järgneb pseudouridinile eukarüootides ja ürgides ja on viie nukleotiidi kaugusel *E. coli* Ψ2580-st. 23S rRNA A2637 asub P- ja A-saidi tRNA-de CCA otste vahel, ja on vahetus läheduses kolme pseudouridiiniga positsioonides 2639, 2640, ja 2641 (Ofegand *et al.*, 2001). *H. marismortui* positsioon 2529, mis interakteerub A-saidi tRNA tagakülje alustega 74-76, on Ψ2527 ja Ψ2528 lähedal (Ofegand *et al.*, 2001). Kõrgemate eukarüootide Ψ2509 on 2505-2507 lähedal, mis omakorda interakteeruvad A-saidi tRNA alustega 50-53 (Ofegand *et al.*, 2001). *H. marismortui* Ψ2514 ja kõrgemate eukarüootide Ψ2520 on 2517-2519 lähedal, mis on kontaktis A-saidi tRNA alustega 64-65. (Ofengand *et al.*, 2001) 70S-tRNA kompleksis 69 heeliksi ling (sisaldab kolm psid Ψ1911, Ψ1915, Ψ1917) toetab A-saidi tRNA antikoodon õlga. P-saidi tRNA antikoodon õlg on seotud sama heeliksi keskpaigaga (Yusupov *et al.*, 2001).

Suure subühiku pseudouridiinid asuvad domeenides II, IV ja V. Need domeenid paiknevad või on funktsionaalselt seotud PTC keskusega (O'Connor and Dahlberg, 1995; Porse and Garrett, 1995).

Sulfolobus acidocaldarius'e 23S rRNA V domeenis on neli Ψ positsioonides 2479, 2535, 2550 ja 2594 (Massenet *et al.*, 1999). *E. coli* V domeenis on samuti leitud neli Ψ, kuid ainult üks nendest positsioonis 2457 kattub *Sulfolobus acidocaldarius*'e omaga positsioonis 2594 (Bakin and Ofengand, 1993). Antud positsiooni modifitseerimine on kõrgelt konserveerunud nii bakterites, ürgidel kui ka eukarüootidel (Massenet *et al.*, 1999). See Ψ on 89 stem-lingu struktuuris. Heeliks 89 omakorda asub peptidüültransferaaskeskuses ja arvatavasti osaleb ribosoomi subühikute interaktsioonides, dekodeerimis funktsioonis ja peptidüültransferaasis. Võib-olla see Ψ osaleb ühes nendest funktsioonidest (Massenet *et al.*, 1999).



Joonis 9. *Escherichia coli* rRNA modifikatsioonide jaotus ribosoomis. Värvidega on näidatud teada olevad modifikatsioonid. (a) Punaste kolmnurkadega on näidatud pseudouridiinid, rohelistes ringides 2'-O-metüleeritud nukleotiidid (Nm), oranzide ruutudega metüleeritud lämmastikalused (mN), (b) *T. thermophilus* väike subühik. (c) *H. marismortui* suur subühik. (Decatur and Fournier, 2002).

Modifitseeritud nukleotiidid asuvad enamasti ribosoomi keskel, subühikute vahelises ruumis, seal, kus RNA on valkudest vaba (Decatur and Fournier,

2002). *E. coli* PTC ja kasvava peptiidi tunneli ülemise otsa piirkonnas on 75% kõikidest suure subühiku modifikatsioonidest (Decatur and Fournier, 2002). Pärmides samas piirkonnas asub 50% modifikatsioonidest. Suure subühiku heeliks 69 sisaldab *E. coli*'s kolm modifikatsiooni, pärmis - viis. Ribosoomi välispinnal, subühikute vahelise ruumi perifeerias või valkudega kaetud aladel modifikatsioonid puuduvad. (Ban *et al.*, 2000; Schluezen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001).

3.11.2 RNA-d modifitseerivad ensüümid

E. coli rRNA ja tRNA modifitseerimise viivad läbi valk-ensüümid, mis on järjestus- või piirkonnaspetsiifilised. Eukarüootides aga sünteesitakse Ψ ja Nm modifikatsioonid snoRNPde poolt, mis jagatakse kahte perekonda. Üks nendest perekondadest vastutab enamuse Ψ -de sünteesi eest ja teine perekond metüleerib riboosi-2'-hüdoksüül rühma (Decatur and Fournier, 2002).

Escherichia coli pseudouridiinide süntaasid on aminohappelise järjestuse põhjal jagatud kolme superperekonda, nendest esimene jaguneb omakorda kolmeks perekonnaks (Tabel 4). Ribosoomi väikese subühiku ribosomaalses RNA-s paiknev ainus pseudouridiin, Ψ 516, on sünteesitud RsuA poolt (Wrzesinski *et al.*, 1995a; Conrad *et al.*, 1999). RluA sünteesib suure subühiku 23S rRNA's paiknevat Ψ 746 ning samuti Ψ 32 teatud tRNA'des (Wrzesinski *et al.*, 1995b; Raychaudhuri *et al.*, 1999), RluB ja RluE sünteesivad 23S rRNA's vastavalt Ψ 2605 ja Ψ 2457 (Del Campo *et al.*, 2001), RluC poolt on sünteesitud 23S rRNA Ψ 955, Ψ 2504 ja Ψ 2580 (Conrad *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998a), RluF sünteesib 23S rRNA Ψ 2604 (Kaya and Ofengand, 2003) ning RluD sünteesib kolme pseudouridiini 23S rRNA positsioonides 1911, 1915 ja 1917 (Huang *et al.*, 1998a; Raychaudhuri *et al.*, 1998). RluD poolt sünteesitud pseudouridiinid paiknevad väikses 23S rRNA *stem-loop* struktuuris (*helix-loop* 69). 23S rRNA Ψ 1915 ja Ψ 1917 asukoht on väga kõrgelt konserveerunud (Ofengand and Bakin, 1997), Ψ 1915 ja Ψ 1917 on leitud kõikdest siamaani uuritud organismidest: prokarüootides, ürgides, eukarüootides kaasa arvatud eukarüootide mitokondrid ja kloroplastid (Massenet *et al.*, 1999). *E. coli* 23S

rRNA Ψ 1915 on ka metüleeritud (Ofengand and Bakin, 1997). TruB vastutab pseudouridiini sünteesi eest positsioonis 55 tRNA T-lingus, ta sünteesib pseudouridiini kõikides tRNA-des välja arvatud initsiaator tRNA^{Met} (Ferre-D'Amare, 2003). TruD sünteesib tRNA^{Glu} Ψ 13 (Kaya and Ofengand, 2003).

Tabel 4. *E. coli* Ψ süntaaside jaotus perekondadesse nende aminohappelise järjestuse alusel.

Y süntaaside I superperekond		
RsuA perekond	RsuA	16S rRNA Ψ 516
	RluE	23S rRNA Ψ 2457
	RluB	23S rRNA Ψ 2605
	RluF	23S rRNA Ψ 2604
RluA perekond	RluA	23S rRNA Ψ 746, tRNA Ψ 32
	RluC	23S rRNA Ψ 955, Ψ 2504, Ψ 2580
	RluD	23S rRNA Ψ 1911, Ψ 1915, Ψ 1917
	TruC	tRNA Ψ 65
TruB perekond	TruB	tRNA Ψ 55
Y süntaaside II superperekond		
TruA perekond	TruA	tRNA Ψ 38, Ψ 39, Ψ 40
Y süntaaside III superperekond		
TruD perekond	TruD	tRNA ^{Glu} Ψ 13

(Conrad et al., 1999; Ofengand and Rudd, 2000; Kaya and Ofengand, 2003)

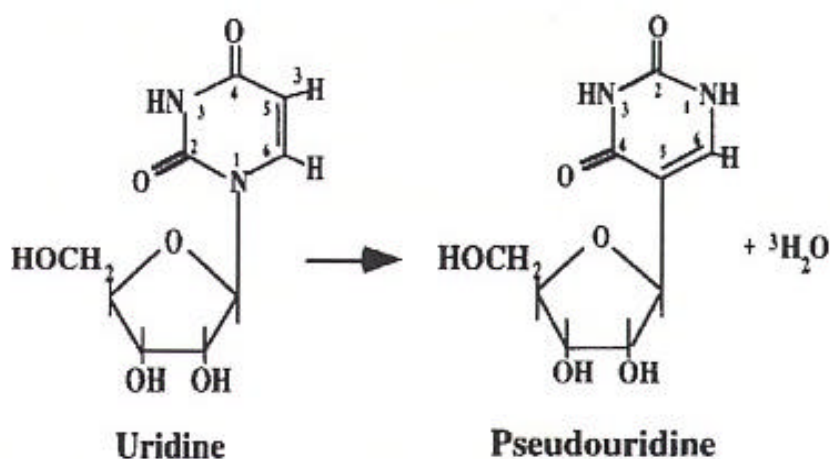
Kõikidele *Escherichia coli* pseudouridiini süntaasidele on iseloomulik asparagiinhappe sisaldumine konserveerunud järjestuse motiivis, mis tundub olevat ka ensüümi aktiivtsentriks. Siiaamaani on näidatud tolle asparagiinhappe vajalikkust ensüümi *in vivo* aktiivsuseks TruA (Huang et al., 1998b; Gu et al., 1999), RsuA (Conrad et al., 1999), RluA (Raychaudhuri et al., 1999) ja TruB (Gutgsell et al., 2000) puhul, ning *in vitro* tingimustes RluA ja TruB puhul (Ramamurthy et al., 1999).

Ψ tähtsuse uuringute käigus selgus, et ainuke ensüüm mille puudumisel *E. coli* rakkude kasv silmnähtavalt langes normaalsetes tingimustes oli RluD –

ensüüm mis sünteesib Ψ 1911, Ψ 1915 ja Ψ 1917 (Raychaudhuri *et al.*, 1998; Gutsell *et al.*, 2001).

3.11.3 Y süntees

Pseudouridiini keemiline struktuur oli selgeks tehtud 40 aastat tagasi (Cohn, 1960). Pseudouridiinsüntaasid katalüüsivad uridiini isomerisatsiooni pseudouridiiniks ainult siis kui uridiin on oligo- või polünukleotiidahela koosseisus. Ensüüm lõikab N-glükosüül sideme, pöörab uratsiilringi, olles sellega seotud, nii, et C-5 satub N-1 kohale, seejärel glükosüülside taastatakse. N-C sideme asemel tekib C-C side. Selles reaktsioonis ei toimu energia lisamist, ega osale kofaktorid, välja arvatud see, et eukarüoodid vajavad Zn (Ofengand and Fournier, 1998; Arluison *et al.*, 1998).



Joonis 10. Pseudouridiini süntees.

4 PRAKTILINE OSA

4.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida *Escherichia coli* 23S rRNA heeliks 69 rolli ribosoomis. Suuremat huvi pakkusid heeliks 69 lingu nukleotiidid positsioonides A1912, A1913, C1914, A1916, A1918 ja A1919. Uuriti kas nimetatud nukleotiidid omavad mõju ribosoomi subühikute assotsiatsioonile ja valgu sünteesile.

- ❖ Töö läbiviimiseks muteeriti vastavad nukleotiidid ja uuriti nende mõju rakkude kasvule.
- ❖ Mutatsioone sisaldavate subühikute lülitumist 70S ribosoomi ja polüsoomidesse uuriti sahharoosi gradiendis ultratsentrifugeerimisega ja 1067U markermutatsiooni sekveneerimisega.
- ❖ Mutantsete ribosoomide osalust valgusünteesis uuriti *in vitro* translatsiooni katse süsteemis.

4.2 Materjal ja meetodid

4.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutati *E. coli* tüve XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZ ?M15 Tn10 (tet^r)*)).

Kasutati plasmidi pBsB1067U, mis sisaldab BstEII-BamHI fragmenti *rrnB* operonist indutseeritava *tac* promootori taga. BstEII-BamHI fragment sisaldab tRNA^{Glu}, 23S rRNA ja 5S rRNA geene. 23S rRNA geenis on transversioon 1067 T? A. Antud transversioon tagab ribosoomide tiostreptooni resistentsuse *in vitro* translatsiooni katsetes. pBsB1067U plasmid sisaldab ka ampitsilliini resistentsusgeeni.

pREP4 on madala koopiarvuga plasmid, mis ekspresseerib *lacI* geeni poolt kodeeritud *lac* repressor valku, sisaldab ka kanamütsiini resistentsusgeeni (Farabaugh, 1978). pREP4 plasmid tagas pBsB1067U plasmidi *tac* promootori lisarepressiooni.

4.2.2 Mutagenees

Eesmärgiks oli viia 23S rRNA järjestusse punktmutatsioonid järgmistesse positsioonidesse (Tabel 5).

Tabel 5. 23S rRNA punktmutatsioonid.

23S rRNA positsioon	metsiktüüp	mutant
1912	A	G
1913	A	G
1914	C	A
1916	A	G
1918	A	G
1919	A	G

Mutatsioonide sisse viimiseks kasutati 1992 aastal Mikaeliani poolt kirjeldatud meetodit (Mikaelian, 1992). Iga mutandi puhul kasutati kolme universaalset praimerit ja üht spetsiifilist (Tabel 6).

Tabel 6. Mutageneesis kasutatud praimerite järjestused.

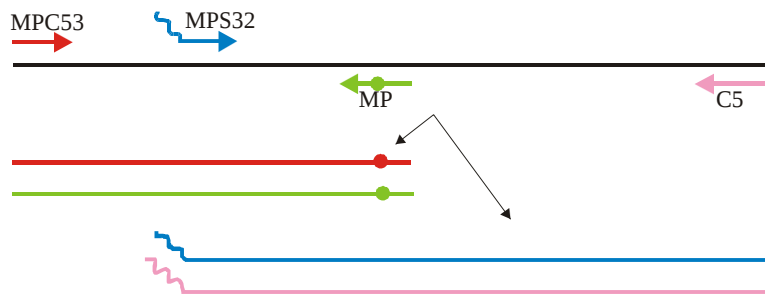
primer	primeri järjestus 5' → 3'
MPS32	TCTAACAGC GGAAGCTAGGCAAAATGGTGCC
MPC53	GACACACGGCGGGTGCTAACG
C5	TTTCAAGGTCGGCTCCATGC
1912	CCTTAGGACCGTTATAGT CAC GCCGCCGTTTACCG
1913	ACCTTAGGACCGTTATAG CTAC GCCGCCGTTTACCG
1914	CTACCTTAGGACCGTTATATTTACGCCGCCGTTTACCG
1916	CTACCTTAGGACCGTTA CAG TTACGCCGCCGTTTACC
1918	CTACCTTAGGACCG TCAT AGTTACGCCGCCGTTTACC
1919	CTACCTTAGGACCG CTAT AGTTACGCCGCCGTTTACC

Rasvases kirjas on näidatud punktmutatsioonid ja MPS32 praimerit "saba", mis ei ole homoloogne 23S rRNA järjestusega.

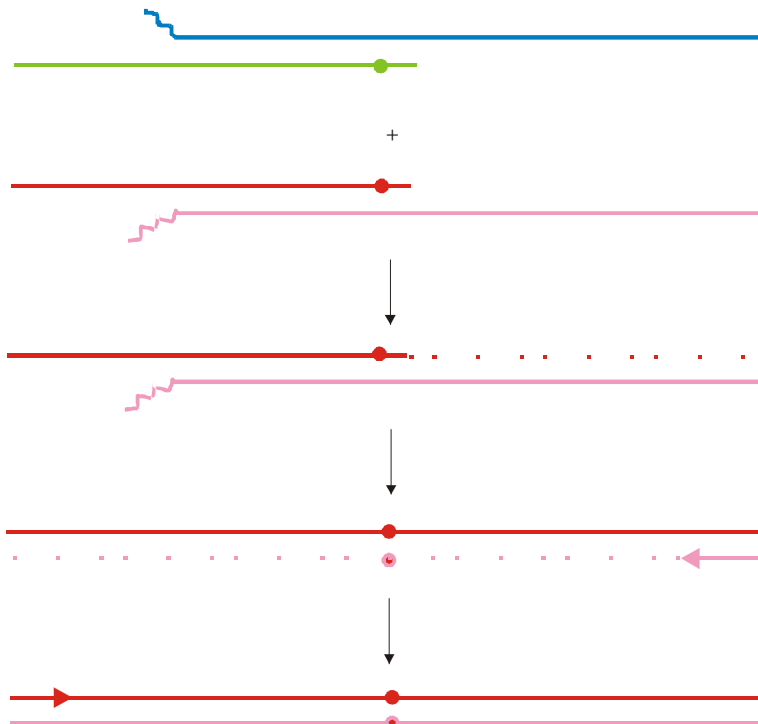
Meetod koosneb kahest järjestikust PCR reaktsioonist (Joonis 11). Esimene PCR viidi läbi kahe praimerite paariga MPC53/MP, ning MPS32/C5. Matriitsina kasutati plasmidi pBsB1067U 23S rRNA geeni järjestust. PCR-i produktid puhastati geelist.

Teine PCR-i reaktsioon viidi läbi välisprimeritega MPC53 ja C5. Templeidina kasutati esimese PCR reaktsiooniprodukte. Esimesest PCR-ist pärit produktide ahelate paarid ja üks uus hübriidne ahelate paar ei ole võimelised amplifitseeruma. Amplifitseeruda saab ainult üks võimalik ahelate paar, need ahelad, mis on MPC53 ja C5 praimerite pikendused (vaata joonist 11). Kuna MPS32 praimerit 3'-ots ei ole komplementaarne DNA fragmendiga, siis amplifitseerub ainult mutantne ahel.

PCR1



PCR 2



Joonis 11. Mutageneesi skeem. PCR1 toimub kahe erineva praimeriga: MPC53/MP ja MPS32/C5. MP praimer sisaldab punktmutatsiooni (näidatud punktiga). MPS32 praimer 3' ots ei oma komplementaarsust 23S rRNA geeniga. Esimese PCR-i produkte kasutati teise PCR-i matriitsina. Teises PCR reaktsioonis kasutati MPC53/C5 praimereid. Amplifitseerus ainuke võimalik hübriidpaar.

PCR-i reaktsioon viidi läbi 50µl-s kasutades 0,1-1µg DNA (pBsB1067U või PCR1 produkt), 0,1-1µM praimereid, 200µM dNTP, 2,5u Pwo DNA polümeraasi

(Roche), Pwo puhvrit. PCR kestis 22 tsüklit: 94°C 40sec, 54°C 40sec, 73°C 90sec. Produktid lahutati 1,2% agarosgeelis ja puhastati UltraCleantm15 DNA Purification Kit'iga (Mo Bio Laboratories, Inc). Geelist puhastatud produkt ja plasmid pBsB1067U lõigati ensüümidega Sal I ja Sac II (New England BioLabsTM Inc.) ning kloneeriti pBsB1067U vektorisse.

4.2.3 Kasvukõvera mõõtmine

E. coli tüvi XL-1 Blue rakkud, mis sisaldasid plasmide pBsB1067U ja pREP4, külvati LB tardsöötmele ja kasvatati 37°C juures. Ilmunud kolooniatega inokuleeriti 2ml 2xYT (16g/l tryptooni, 10g/l pärmide ekstrakti, 5g/l NaCl) vedelsöödet ja kasvatati üleöö 30°C juures. Üleöö kasvanud kultuurid lahjendati 750 korda ja kasvatati edasi 37°C juures suuremas mahus (30ml) 2xYT vedelsöötmes. Söötmetele lisati ampitsiliini 100µg/ml, kanamütsiini 50µg/ml ja tetratsükliini 10µg/ml. Igat kultuuri kasvatati kahes korduses, üks kahest proovist, tihedusel $A_{600} = 0,2$, indutseeriti 1mM IPTG-ga (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). Edaspidi mõõdeti iga poole tunni tagant rakkude tihedust lainepikkusel 600nm.

4.2.4 Ribosoomide eraldamine

E. coli XL1-Blue rakud transformeeriti plasmiididega pREP4 ja pBsB1067U, mis sisaldas 23S rRNA geenis mutatsioone positsioonides 1912, 1913, 1914, 1916, 1918 ja 1919. *E. coli* rakud külvati LB tardsöötmele ja kasvatati 37°C juures. Ilmunud kolooniatega inokuleeriti 2ml 2xYT (16g/l tryptooni, 10g/l pärmide ekstrakti, 5g/l NaCl) vedelsöödet ja kasvatati üleöö 30°C juures. Üleöö kasvanud kultuurid kasvatati edasi suures mahus 37°C juures 2xYT vedelsöötmes. Söötmetele lisati ampitsiliini 100µg/ml, kanamütsiini 50µg/ml ja tetratsükliini 10µg/ml. Peale teatud tiheduse saavutamist (A1912G, A1919G puhul $A_{600} = 0,6$ ja A1913G, C1914A, A1916G ja A1918G puhul $A_{600} = 0,3$) rakud indutseeriti 1mM IPTG. Kahe tunni pärast rakud koguti madalkiiruse tsentrifuugimise teel (Sorvall GS-3 rootor, 4.000rpm, 30min) ja suspendeeriti LP puhvris (16% sahharoos, 6mM MgCl₂, 60mM NH₄Cl, 60mM KCl, 50mM Tris-HCl

pH 8.0, 6mM β -merkaptopetanol). Peale lütsotsüümi (0,5mg/ml) ja Dnaasi (10u/ml) lisamist rakud lütsiti kasutades kolme külmutamis-sulatamistsükli, külmutades -70°C juures ja sulatades jäävee segul. Lüsaat tsentrifuugiti Heraeus lauafluugiga 13.000rpm, 12min, 4°C juures. Supernatant lahjendati kaks korda LLP puhvriga (12mM MgCl_2 , 60mM NH_4Cl , 60mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 6mM β -merkaptopetanol). Lahjendatud supernatant kanti 15%-40% suhkrugradiendile LLP puhvris ja tsentrifuugiti kiirusega 21 000 rpm, $\tau=2,7 \cdot 10^{11}$ Beckmani SW-28 rootoriga 4°C juures.

Gradiendid analüütsiti fotomeetriga UVICORD. Eraldi koguti *E. coli* ribosoomi polüsoomide, 70S, 50S ja 30S fraktsioonid. Polüsoomide fraktsioonidest ribosoomid sadestati üleöö kahekordse mahu etanooliga -20°C juures. 70S, 50S ja 30S fraktsioonid lahjendati kaks korda puhvriga LLP ja tsentrifuugiti subühikud põhja kiirusega 29 000 rpm, $\tau=8,0 \cdot 10^{11}$ Beckmani 50.2Ti rootoriga 4°C juures. Ribosoomide partiklid lahustati LLP puhvris.

4.2.5 rRNA eraldamine ribosoomidest

Ribosomaalse RNA eraldamine toimus sahharoosigradiendis puhastatud ribosoomide partiklitest. Ribosoomi subühikute valke denatureeriti PN lahusega (QIAgen). 200 μl -le (2 OD= A_{260} ühikud) ribosoomide fraktsioonile lisati 800 μl PN lahust ning valgud ekstraheeriti vorteksil 20min jooksul. Lisati 20 μl 50% SiO_2 suspensioon vees ning segati vorteksil veel 10min. Ränni tsentrifuugiti põhja 20 sek/6000rpm Heraeus laua fluugiga. Sadet pesti kaks korda 50% etanooliga. rRNA elueeriti rännilt veega inkubeerides 5min 37°C juures. Ränni eemaldati tsentrifugides 1min 13 000 rpm. Puhastatud rRNA säilitati -20°C juures.

4.2.6 *In vitro* valgusüntees

In vitro valgu sünteesiks kasutasime polüU translatsiooni meetodid varem kirjeldatud Saarma ja Remme poolt (1992).

Reaktsioonisegu A sisaldas LLP puhvris (12mM MgCl_2 , 60mM NH_4Cl , 60mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 6mM β -merkaptopetanol) 0,7 A_{260} ühikud sahharoosi gradiendis puhastatud 70S ribosoomide ja 0,02mg polü(U) matriitsi.

Reaktsioonisegu A lõppmahuga 50µl inkubeeriti koos tiostreptoniga (lõppkonsentratsioon 1,5µM) ja ilma 37°C juures 15min. Reaktsioon toimus neljas korduses, kaks nendest koos tiostreptoniga, kaks ilma. Tiostreptoni (Calbiochem) kasutati metsik-tüüpi ribosoomide inhibeerimiseks. A1067U transversioon tagas plasmidi pealt sünteesitud ribosoomidele tiostreptoni resistentsuse translatsiooni käigus.

Peale 15min inkubatsiooni segule A lisati segu B, mis sisaldas: LLP puhvris (12mM MgCl₂, 60mM NH₄Cl, 60mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 6mM β-merkaptotoetanool) 0,07mg tRNA-d, 1,5mM ATP-d, 0,5mM GTP, 5mM PEP (fosfoenoolpüruvaat), 0,01mM [¹⁴C]Phe, 1µM Phe, 2µM püruvaatkinaasi PK, 0,2µg PheRS, 0,3µg EF-Ts, 4µg EF-G, 4µg EF-Tu. Reaktsiooni segu (A+B) lõppmahuga 100 µl inkubeeriti 30min 37°C juures. PheRS, EF-Tu, EF-Ts ja EF-G ensüümid eraldati meie laboris Kai Virumäe ja Tamara Aid'i poolt.

Sünteesitud polü-Phe sadestati 5% TCA-ga (triklooräädikhappe) ja kuumutati 20min jooksul 95°C juures. Sade koguti GF/C filtrile (Whatman®), pesti 10 ml 5% TCA-ga ja 5 ml 70% etanooliga. Radioaktiivse süsiniku hulka fraktsioonides mõõdeti stsintsillatsiooniloenduriga (Wallac WinSpectral™, 1414 Liquid Scintillation counter), eelnevalt lisades fraktsioonidele vedelat stsintsillatsiooni kokteili (Perkin Elmer™).

4.2.7 “Primer extension” analüüs

Plasmiidse 23S rRNA suhtelist kogust mõõdeti praimer ekstensiooni meetodiga (Sigmund *et al.*, 1988). Markerina kasutati plasmiidse rRNA 1067 positsioonis olevat A? U transversiooni. 23S rRNA 1068-1086 regioniga komplementaarne praimer T3 (5'-GCT TTC TTT AAA TGA TGG CTG CTT-3') märgistati 5'-otsast γ-[³²P]-ATP-ga. Kineerimine T4 polünukleotiidkinaasiga toimus 37°C juures, ühe tunni jooksul. Järgnes kineeritud oligo QIAgeni puhastus.

Anniilingu reaktsioon sisaldas 0,5-1 pmol rRNA-d ja 0,5-1pmol kineeritud oligot hübridiseerimis puhvris (100mM KCl, 20mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl pH 7,6)

reaktsiooni lõppmaht oli 7,5µl. Reaktsioonisegu kuumutati 90°C juures 1min jooksul, ning lasti jahtuda kuni 45°C.

Aniilingu reaktsioonisegu jagati kaheks ja lisati A ja T ekstensioonisegule, lõppmahuga 10µl. Ekstensiooni reaktsioon toimus RT reaktsiooni puhvris (50mM TRIS-HCl pH 8,5, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 30mM KCl) ja sisaldas lisaks aniilingu reaktsiooni produktile ka AMV pöördtranskriptaasi (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, Seikagaku America) ja nukleotiide. A segu sisaldas nukleotiide ddA, dC, dG, dT. T segu sisaldas nukleotiide ddT, dA, dC, dG. Iga nukleotiidi lõppkonsentratsioon reaktsioonisegus oli 50µM. Segu inkubeeriti 42°C juures 30min jooksul. Seejärel peatati ekstensioonireaktsioon RT Stop lahusega (1 osa 0,3M NaOAc ja 3 osa Et-OH) lisamisega. Produktid sadestati üleöö -20°C juures ja tsentrifuugiti põhja laua biofuugiga 13.000rpm, 12min, 4°C juures. Sade lahustati formamiid-stop lahuses (0,3% bromofenoolsinine; 0,3% ksüleentsüanool; 10mM EDTA, pH 7,5; 97,5% formamiid). Proove denatureeriti enne geelile kandmist 3min 95°C juures.

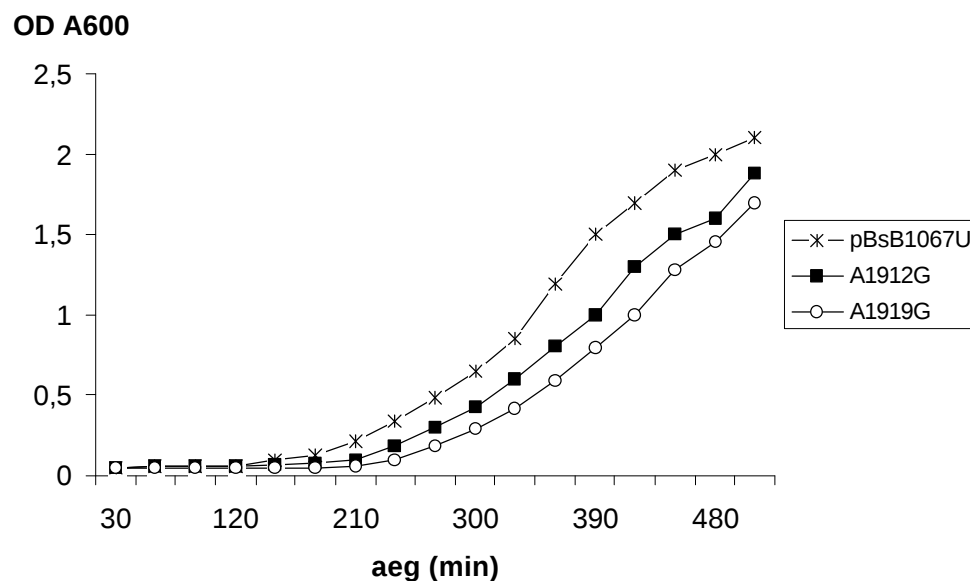
Reaktsiooni produktid lahutati 12% urea-polüakrüülamiidgeelis (12% polüakrüülamiid, 8M urea, 1xTBE puhver). Geel kanti filterpaberile ja kuivatati vaakumkuivatis. Tulemusi analüüsiti kasutades PhosphorImager'i ja ImageQuant tarkvara (Molecular Dynamics).

sellele, et mutatsiooni sisaldav geen on repressseeritud, saavad rakud kasvada ka siis, kui mutatsiooni ekspressioon on letaalne. Teiseks geeni ekspressiooni on võimalik reguleerida indutseerimisega. Antud ekspressioonisüsteemis pBsB1067U plasmidi pealt sünteesitud ribosoomid moodustasid 30-40% rakkude aktiivsetest ribosoomidest (Liiv *et al.*, 1998).

4.3.2 Mutatsioonide mõju raku kasvule

Kirjanduse andmetest on teada, et 23S rRNA heeliks 69 asub ribosoomi aktiivtsentri vahetus läheduses ja osaleb tõenäoliselt nii 70S ribosoomi moodustumises (subühikutevahelised sillad) kui ka valgusünteesi protsessis (vt kirjanduse ülevaade).

23S rRNA mutatsioonide mõju hindamiseks analüüsiti esmalt nende mõju rakkude kasvule. A1912G ja A1919G mutantidel ilmnes kasvuefekt isegi repressseeritud *tac* promootoriga (Joonis 13). Eelnevalt on leitud, et repressseeritud *tac* promootori puhul moodustavad pBsB1067U plasmidi pealt sünteesitud 23S rRNA-ga ribosoomid 3-5% totaalsest ribosoomide hulgast. Kuna antud mutantidel oli efekt detekteeritav juba enne indutseerimist, võib oletada et mutatsioonid 23S rRNA positsioonides 1912 ja 1919 mõjutavad oluliselt ribosoomide funktsioneerimist.



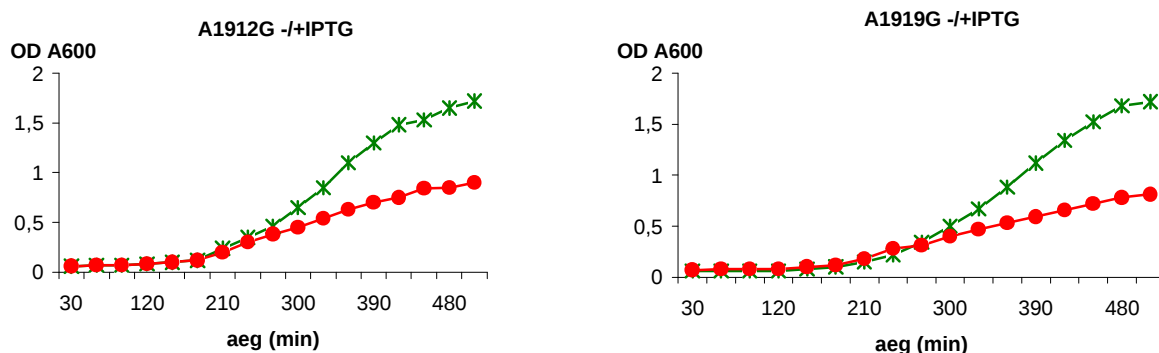
Joonis 13. pBsB1067U, A1912G ja A1919G mutantide indutseerimata rakkude kasvukõverad.

Selleks, et tagada promootori tugevam repressioon viidi rakkudesse lisarepressorit ekspresseeriv plasmiid pREP4, mis kodeerib LacI repressor valku. Repressori hulga suurenemine rakus võiks eeldatavasti vähendada antud mutantide ekspressiooni enne indutseerimist, mida antud juhul ka eksperimentaalselt tõestati. Edaspidistes katsetes kasutati topeltrepresseeritud kultuure. Rakke kasvatati rikkas 2xYT söötmes 37°C juures ning indutseeriti varases eksponentsiaalses kasvufaasis ($OD_{A600}=0,2$) 1mM IPTG-ga (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Rakkude tihedust mõõdeti iga poole tunni tagant lainepikkusel 600nm.

Suuremat kasvuefekti omasid 23S rRNA A1912G ja A1919G positsioonides olevad transitsioonid (Joonis 14). Võrreldes pBsB1067U rakkude kasvukõveraga (Joonis 15), A1912G ja A1919G mutantsete rakkude kasv peale indutseerimist IPTG-ga peatus.

E. coli A1912G ja A1919G mõlema positsiooni adeniniid on 1911 positsioonis oleva pseudouridiini vahetus läheduses. A1912 järgneb pseudouridiinile 1911 positsioonis ja A1919 moodustab pseudouridiiniga

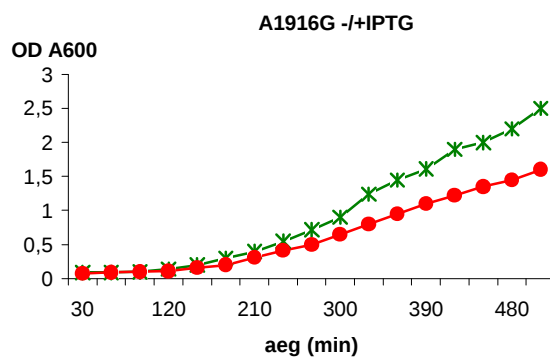
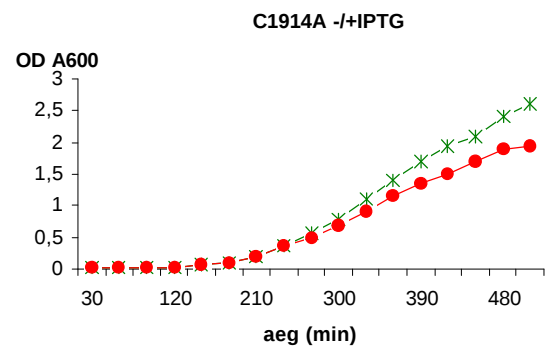
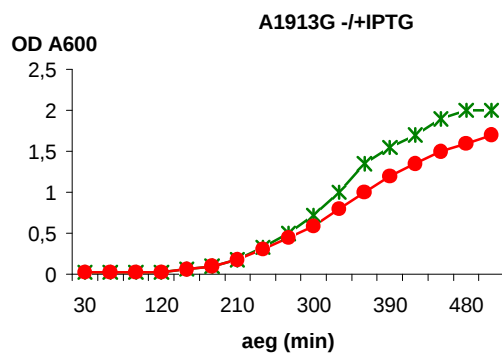
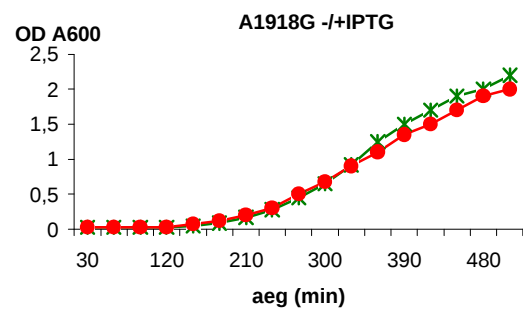
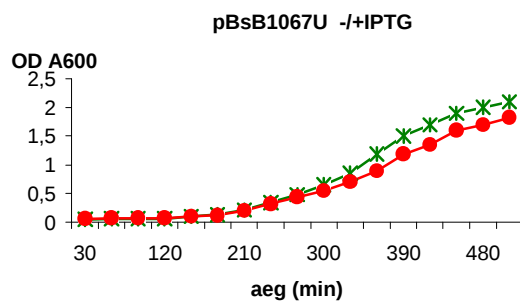
positsioonis 1911 Watson-Crik paari. Võimalik, et mutatsioonid positsioonides A1912G ja A1919G muudavad 23S rRNA heeliks 69 konformatsiooni, mis omakorda takistab ribosoomi funktsioneerimist.



Joonis 14. A1912G ja A1919G mutantide kasvukõverad. Kultuurid indutseeriti tihedusel $A_{600}=0,2$. Ringiga on näidatud indutseeritud kultuur, ristiga - indutseerimata.

E. coli 23S rRNA A1913, C1914 ja A1918 osalevad B2a silla moodustamises 16S rRNA heeliks 44-ga (Yusupov *et al.*, 2001). Mõned sillad, nagu juba varem oli kirjeldatud, muutuvad ribosoomi konformatsiooni muutumise käigus, või kaovad üldse (Gao *et al.*, 2003). B2a sild jääb aga muutumatuks (Gao *et al.*, 2003).

Mutatsioonid positsioonides A1913G ja C1914A omasid väikest efekti rakkude kasvule (Joonis 15). O'Connor oma katsetega näitas samuti C1914A transversiooni väikest efekti rakkude kasvule (O'Connor and Dahlberg, 1995). C1914U transitsioon, aga aeglustas rakkude kasvu 1,5 korda (O'Connor and Dahlberg, 1995). O'Connor märkis samuti, et 23S rRNA C1914A ja C1914U mutatsioonidega 50S lülitatakse ribosoomidesse võrdse tasemel (O'Connor and Dahlberg, 1995). Heeliks 69 lingi transitsioon positsioonis A1918G ei oma detekteeritavat kasvufenotüüpi (Joonis 15). Saadud tulemuste põhjal võib oletada, et A1913 ja C1914 omavad tähtsat rolli silla moodustumises, või peale silla moodustumist osalevad nimetatud positsioonid ka teistes interaktsioonides, näiteks interakteeruvad tRNA-ga (Yusupov *et al.*, 2001).



Joonis 15. pBsB1067U, A1918G, A1913G, C1914A ja A1916G mutantide kasvukõverad. Tihedusel $A_{600}=0,2$ rakud indutseeriti 1mM IPTG-ga. Indutseeritud rakkude kasvukõver on näidatud ringiga, indutseerimata – ristiga.

Transitsioon 23S rRNA positsioonis A1916G aeglustas rakkude kasvu (Joonis 15), kuid mitte nii palju kui A1912G ja A1919G. A1916G asub kahe pseudouridiini vahel Ψ1915 ja Ψ1917. Varasemast on teada, et A1916 deletsioon ja kahe A insertioon A1916 ja Ψ1917 vahel tõstavad +1 ja –1 raaminihke taset ja aeglustavad rakkude kasvu (O'Connor and Dahlberg, 1995). A1916 deletsioon aeglustab rakkude kasvu kaks korda ja kahe adeniini insertioon - viis korda (O'Connor and Dahlberg, 1995). Meie katsete andmete põhjal võib väita, et ka A1916G tõstab oluliselt +1 ja –1 raaminihke taset (A. Liivi avaldamata andmed). Seega võime me oletada, et positsioon 1916 osaleb otseselt translatsioonitäpsuse määramisel ning kasvudefekt on tingitud eelkõige ribosoomi vigadesageduse suurenemisest.

Üks võimalik põhjus miks rakude kasv aeglustub või peatub (näiteks A1912G ja A1919G mutantide puhul) on see, et aktiivsentris asuva heeliks 69 mutatsioonid häirivad valgusünteesi, muutes antud heeliksi ruumilist struktuuri. Mutatsioonid võivad põhjustada ka translatsiooni vigade suurenemist nagu oli näidatud A1916 deletsiooni puhul (O'Connor and Dahlberg, 1995; A. Liiv avaldamata andmed). 23S rRNA heeliks 69 interakteerub ka A- ja P-saidis olevate tRNA-dega (Yusupov *et al.*, 2001). Heeliks 69 mutatsioonid võivad kahjustada rRNA-tRNA interaktsioone ja selle tagajärjel ka translatsiooni initsiatsiooni või elongatsiooni. Rakkude kasv võib aeglustuda ka siis, kui heeliks 69 mutatsioonid mõjutavad 50S partiklite võimet assotsieruda 30S partiklitega, sest heeliks 69 interakteerub 16S rRNA-ga moodustades subühikutevahlise silla B2a (Yusupov *et al.*, 2001). Et uurida täpsemalt 23S rRNA heeliks 69 mutatsioonide mõju analüüsiti mutantse 23S rRNA lülitumist ribosoomi 50S subühikusse, 70S ribosoomi ja polüsoomidesse.

4.3.3 Mutantsete 50S subühikute assambleerumine ribosoomidesse

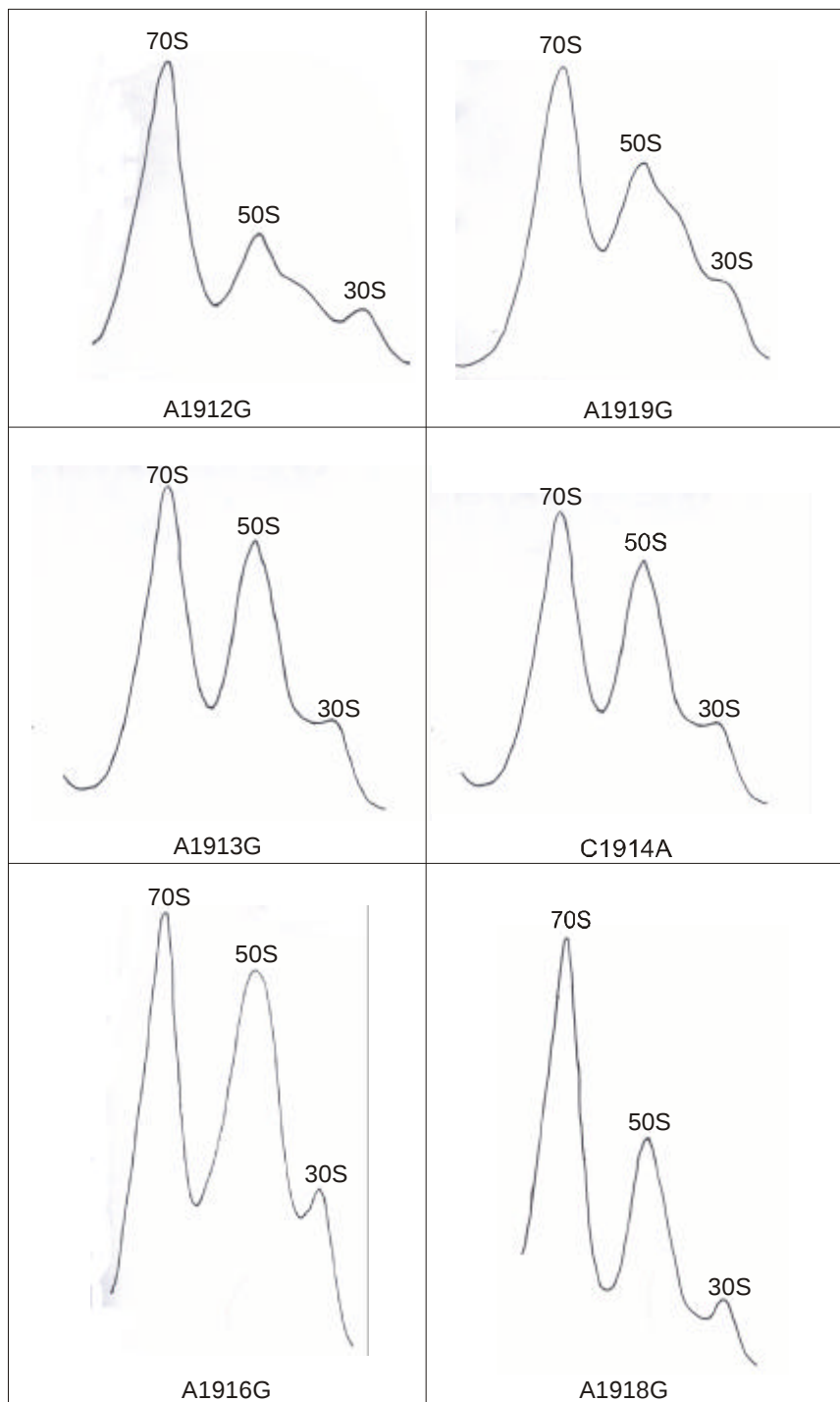
Uuriti kas mutatsiooni sisaldavat 23S rRNA-d lülitatakse 50S subühikusse ja inkorporeeritakse 70S ribosoomidesse. Teiseks huvitas meid kas heeliks 69 mutatsioonid mõjutavad lisaks ka 50S partiklite biogeneesi. Selleks eraldati 50S

ja 30S ribosoomi partikleid, 70S ribosoomi ja polüsoome ultratsentrifugeerides rakulüsaate 15-40% sahharoosi gradiendis. Kromosomaalse ja plasmiidse rRNA suhet määrati sekveneerides rRNA-d praimer ekstensiooni meetodi abil (Sigmund *et al.*, 1988). A1067U punktmutatsiooni kasutati markerina, et eristada mutantseid ribosoomi. Selle meetodi abil on võimalik analüüsida nii mutantse 23S rRNA lülitumist ribosoomidesse kui ka võimalike assambleerumise vaheproduktide akumulatsiooni.

Katse näitas, et A1912G ja A1919G mutantide sahharoosi gradiendis (Joonis 16) esines 50S piigil üks lisa piik, mis viitab sellele, et A1912G ja A1919G transitsioonide puhul 50S partiklite kokkupakkimine on problemaatiline. Lisa piik asus 50S ja 30S fraktsioonide vahel. Lisa partiklite suurus on umbes 40S.

40S partiklid võivad olla näiteks 50S subühiku kokkupakkimise vaheproduktid, või 50S kokkupakkimise vea tagajärjel tekkinud lõppproduktid, mis degradeeritakse. Kui 40S on 50S subühiku biogeneesi vaheprodukt, siis ta lõppkokkuvõttes pakitakse kokku ja ta võib osaleda 70S ribosoomide assotsiatsioonis. Kui 40S on 50S kokkupakkimise vea tagajärjel tekkinud lõppproduktid, siis vigast 40S ei pakkita 50S partiklits ja ei lülitata 70S ribosoomidesse, vaid degradeeritatakse. Sellel juhul 70S fraktsiooni ribosoomid koosnevad kromosoomi pealt sünteesitud metsik tüüpi 50S partiklitest.

A1912G mutatsiooni sisaldav 50S subühik osaleb 70S ribosoomide assambleerumises (Tabel 7). A1912G transitsiooni sisaldavaid 50S subühikuid lülitatakse 70S ribosoomidesse efektiivsemalt kui pBsB1067U 50S. Praimer ekstensiooni katse näitas, et üle poole raku 70S ribosoomidest sisaldasid A1912G transitsiooniga 23S rRNA-d, seda on tunduvalt rohkem kui pBsB1067U oma. Samas polüsoomides A1912G transitsiooniga rRNA osakaal oli kuni neli korda väiksem kui pBsB1067U oma.



Joonis 16. Mutantsete ribosoomide analüüs 10-25% sahharoosi gradiendis. Sedimentatsiooni suund paremalt vasakule. Tsentrifugiti kiirusega 21 000 rpm, $t = 2,7 \cdot 10^{11}$

A1919G mutandi osakaal 50S partiklites on 67%, mis on tunduvalt rohkem kui pBsB1067U. Samas ainult üks kolmandik 70S ribosoomidest sisaldab A1919G transitsiooniga 23S rRNA-d. Seega 23S rRNA mutatsiooni A1919G sisaldavat 50S ei lülitata 70S ribosoomidesse nii hästi kui pBsB1067U või näiteks A1912G. A1919G transitsiooniga 23S rRNA osakaal polüsoomides oli kuni viis korda väiksem kui pBsB1067U oma. Kuna 50S partiklites A1919G mutatsiooni 23S rRNA osakaal on suurem kui pBsB1067U oma ja 70S ribosoomides väiksem, võib järeldada, et A1919G transversioon mõjutab initsiatsiooni algetappe.

Tabel 7. Mutatsiooni sisaldava rRNA osa polü-ribosoomides.

mutant	Plasmiidse rRNA % ribosoomides				
	tetrasoomid	trisoomid	disoomid	70S	50S
A1912G	10	16	30	57	72
A1913G		45	45	43	57
A1916G	8	8	8	14	67
A1919G	8	10	14	32	67
pBsB1067U	46	46	43	46	55

Plasmiidi pealt sünteesitud 50S partiklite protsent polüsoomides määrati praimer ekstensiooni meetodiga (Sigmund et al., 1988)

A1918G mutandi ribosoomaalsete partiklite jaotus sahharoosi gradiendis (Joonis 16) sarnanes pBsB1067U omaga.

A1913G transitsioon ei oma detekteeritavat mõju 70S ribosoomide assotsiatsioonile. A1913G mutatsiooni sisaldavaid 50S partikleid lülitati ribosoomidesse võrdselt pBsB1067U omadega (Tabel 7). C1914A ja A1918G mutantide kohta andmed puuduvad. On teada, et C1914A ja A1918G mutandid on võimelised ekspresseerima del7 tüves, kus puuduvad kromosomaalsed rRNA operonid ja kõik ribosoomid, mis rakus esinevad, on sünteesitud plasmiidi

pealt. Antud mutantidel puudub selles ekspressiooni süsteemis kasvufenotüüp võrreldes metsiktüüpi *rrnB* operoniga (A. Liivi avaldamata andmed).

A1916G mutandi gradiendi pilt näitab, et 50S ja 30S partiklite lülitumine 70S ribosoomidesse võib olla häiritud, sest nende fraktsioonide piigid graafikul on kõrgemad kui pBsB1067U omad. Primer ekstensiooni katse tõestab, et A1916G mutatsiooni sisaldava 50S osa 70S ribosoomides on 3-4 korda väiksem kui pBsB1067U ja võrdub 14% totaalsest ribosoomide massist. A1916G transitsiooniga 50S partiklite osa polüsoomides on tunduvalt väiksem kui pBsB1067U – vaid 8%. Ribosoomi assambleerumine võib olla takistatud näiteks selle pärast, et A1916G ei ole võimeline korrektselt ja kiirelt moodustama interaktsioone 30S subühikuga mida ta peaks tegema vastavalt varasematele andmetele (Noller, 1991). Noller näitas, et *E. coli* 23S rRNA A1916 on kaitstud keemiliste modifikatsioonide eest 30S poolt. Tänu sellele on häiritud ribosoomi 50S ja 30S subühikute assotsiatsioon. Tagajärg on rakkude aeglane kasv.

A1916G transitsioon võib kutsuda esile ka ümbritsevate nukleotiidide konformatsioonide muutust. Tuletame meelde, et A1916G on kahe pseudouridiini vahel. Üks nendest - Ψ 1917, tundub olevat tähtis ribosoomile, sest Ψ 1917C transitsiooniga 50S partiklid esinevad polüsoomides kaks korda harvem kui pBsB1067U. (Liiv, avaldamata andmed). Võimalik, et A1916 või selle kõrval olev Ψ 1917 osalevad interaktsioonides tRNA-ga või initsiatsiooni faktoritega.

4.3.4 *In vitro* translatsioon

Et selgitada välja mutatsioonide mõju valgusünteesile polüU pealt sünteesiti polüPhe. *In vitro* translatsiooni katseid tehti tiostreptooni juuresolekul ja ilma selleta. Kuna kasutatavas vektoris pBsB1067U positsioonis 1067 oli transversioon T→A, mis tagab mutantsete ribosoomidele tiostreptooni resistentsuse *in vitro* translatsiooni katsetes, siis kasutati seda transversiooni mutantsete ribosoomide selekteerimiseks ja kromosomaalsete ribosoomide inaktiveerimiseks. Iga mutandiga viidi läbi 3 kuni 5 sõltumatut katseseeriat. Varasemas töös Ψ1911, Ψ1915, Ψ1917 mutantidega selgus, et 50S partiklite fraktsioonis on palju inaktiivseid subühikuid, seepärast oma katsetes kasutasime 70S fraktsioonist puhastatud ribosoome. Selleks ultratsentrifugeeriti rakkude ekstrakte 15–40% suhkrugradiendis ja konsentreeriti ribosoomi partikleid teise ultratsentrifugeerimise teel.

Tulemustest selgub (Tabel 8), A1918G positsioonis transitsiooni sisaldav 50S osaleb translatsioonis võrdselt pBsB1067U 50S-ga ja moodustab 30% transleerivatest raku ribosoomidest.

C1914A mutatsiooniga 50S partikleid sisaldab väiksem arv aktiivseid ribosoome – 28%. Veel vähem on funktsionaalseid A1913G mutatsiooniga ribosoome – 21%. O'Connor'i ja meie tulemustest selgub et A1913G, C1914A ja C1914U mutatsiooniga 50S partiklit lülitatakse 70S ribosoomidesse võrdselt (O'Connor and Dahlberg, 1995). A1913G transitsiooniga 50S partiklid on võimelised assotsieeruma ribosoomideks võrdselt pBsB1067U 50S partiklitega, kuid valgusünteesis A1913G transitsiooniga ribosoomid on vähem efektiivsed. Tulemus viitab sellele, et A1913G mutatsioon mõjutab translatsiooni elongatsiooni. Samas C1914A ja A1918G mutatsiooniga aktiivseid ribosoome on peaaegu sama palju kui pBsB1067U ribosoome. Kõik kolm positsiooni osalevad B2a silla moodustumises (Yusupov *et al.*, 2001). Tundub, et A1913 tähtsus translatsioonis on suurem kui C1914 ja A1918. Peale selle, et 23S rRNA A1913 interakteerub 16S rRNA heeliks 44, ta interakteerub ka A-saidis oleva tRNA D-

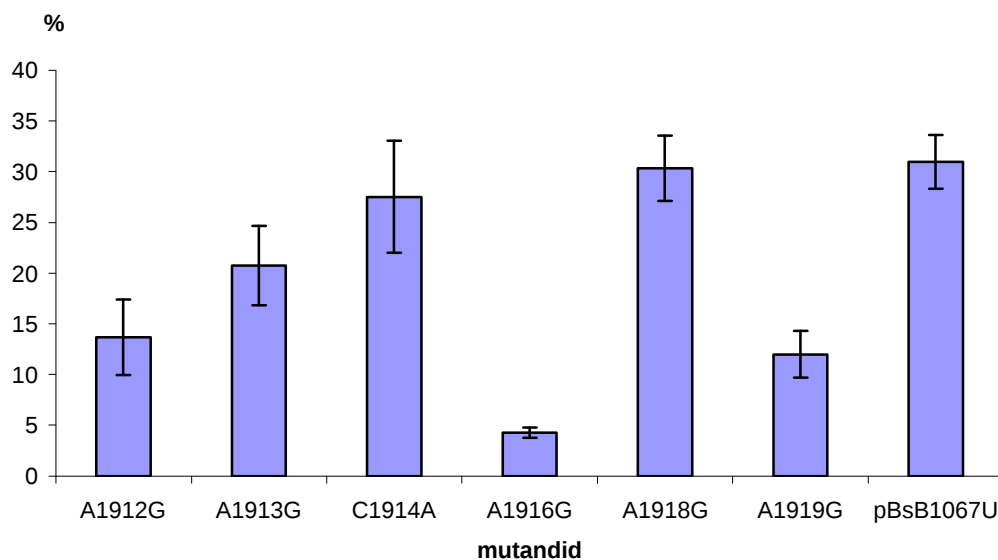
õlaga (Yusupov *et al.*, 2001). Võimalik, et A1913 vastutab mingil määral tRNA valiku või sidumise eest.

Valle 2003 aastal leidis, et sel hetkel kui tRNA kolmikkompleksis EF-Tu ja GTP-ga saabub A-saiti, siis tRNA antikoodon õlg on paindunud antikoodon ja D õla ühendus kohas. tRNA-s tekib keerd ja ta näib välja nagu oleks ta küljele kaldunud (Valle *et al.*, 2003). Arvatakse, et see kallak on tingitud sellest, et tRNA nukleotiid positsioonis 26, mis on antikoodon ja D õla vahel, pole paardunud ja interakteerub nukleotiididega 44 ja 45 tRNA muutuvast lingust (Roberts *et al.*, 1974).

23S rRNA heeliks 69 interakteerub A-saidis oleva kolmikkompleksi tRNA hinge piirkonnaga. Interaktsioonis osalevad C1914 koos naabernukleotiididega ja tRNA D õla nukleotiidid 24-25. Valle sõnul kui EF-Tu:GDP lahkuvad ribosoomilt, siis tRNA keerd kaob ja tRNA “ajab ennast sirgu”. Sel hetkel 23S rRNA heeliks 69 interaktsioon tRNA-ga muutub. Arvatakse, et tRNA:23S rRNA interaktsioon võib-olla tähtis nii õige tRNA konformatsiooni saavutamiseks, kui ka õige koodoni äratundmiseks (Valle *et al.*, 2003). Seega võivad mutatsioonid antud piirkonnas mõjutada dekodeerimisprotsessi. O’Conner leidis, et mutatsioonid 23S rRNA positsioonides 1914 ja 1916 halvendavad ribosoomi selektiivsust ja suurendavad –1 ja +1 raaminihket, ribosoom läheb kõikidest stop koodonitest üle (O’Connor and Dahlberg, 1995).

Eelmisest katsest selgub, et A1916G mutatsiooniga 50S subühikuid lülitakse ribosoomidesse väga harva. *In vitro* translatsiooni katse näitab samuti, et A1916G mutatsiooni sisaldavat ribosoomid osalevad valgusünteesis kaheksa korda harvem kui pBsB1067U ribosoomid ja moodustavad vaid 4% aktiivsete ribosoomide massist (Tabel 8). A1916G mutandil esineb kasvudefekt. Nagu juba varem oli mainitud, põhjustab A1916G transitsioon +1 ja –1 raaminihet (A. Liivi avaldamata andmed).

Tabel 8. *In vitro* translatsiooni katse tulemused.



mutant	tiostreptooni resistentsus (%)	standardhälve
A1912G	14	±3,7
A1913G	21	±3,9
C1914A	28	±5,5
A1916G	4	±0,5
A1918G	30	±3,2
A1919G	12	±2,3
pBsB1067U	31	±2,6

Graafikul on näidatud kui suur protsent translatsioonis osalevatest ribosoomidest omavad tiostreptooni resistentsust (ehk sisaldavad mutatsiooni 1067U), protsent arvutati *in vitro* katse tulemuste põhjal. Tabelis on katse tulemused ära toodud arvuliselt.

A1912G ja A1919G mutantid osalevad translatsioonis 2-3 korda harvem kui pBsB1067U ribosoomid, ja moodustavad vastavalt 14% ja 12% aktiivsetest ribosoomidest (Tabel 8). Kuna A1912 ja A1919 asuvad heeliks 69

lingu alumises osas ja mõlemad on seotud 1911 positsiooni pseudouridiiniga, võib oletada, et nad vastutavad heeliks 69 lingu konformatsiooni eest. Näiteks kui A1919 ei oleks paardunud Ψ 1911, siis h69 ling võiks ennast "vabamaks" lasta ja selle diameeter oleks suurem. Või näiteks, heeliks 69 ling ise ei asu ruumiliselt ühel tasapinnal, vaid lingu ots pöörab ennast tagasi heeliksi poole. Kui lingu alumises osas tekivad mutatsioonid ja konformatsioon muutub, siis võib see pöördekoht või suund muutuda, või üldse kaduda. Samas, kui ling muudab oma konformatsiooni, siis lingu nukleotiidid muudavad oma ruumilist asukohta ja võib-olla muutuvad võimetuks õigesti interakteeruma 16S rRNA-ga ja tRNA-ga. Nagu eelmised katsed näitasid, häirivad A1912G ja A1919G transitsioonid 50S subühiku kokkupakkimist ja assambleerumist 30S subühikuga.

5 KOKKUVÕTTE

Käesolevas töös uuriti ribosoomi 23S rRNA heeliks 69 lingu 1912, 1913, 1914, 1916, 1918, 1919 positsioonide mõju ribosoomi biogeneesile ja translatsioonile. Probleemi lahendamiseks kasutati 23S rRNA heeliks 69 mutante: A1912G, A1913G, C1914A, A1916G, A1918G, A1919G.

B2a ribosoomi subühikute vahelises sillas osalevate A1913G, C1914A ja A1918G nukleotiidide mutatsioonid omasid minimaalset efekti. A1913G ja C1914A mutantide kasvukiirus oli mõnevõrra madalam, kui A1918G ja pBsB1067U oma. *In vitro* translatsiooni katse tulemuste põhjal moodustasid A1913G mutatsiooniga ribosoomid 21% aktiivsetest ribosoomidest. C1914A ja A1918G mutatsiooniga ribosoomide aktiivsus võrdus pBsB1067U omaga, C1914A ja A1918G mutatsiooniga ribosoomid moodustasid umbes 30% aktiivsetest ribosoomidest.

Heeliks 69 lingu alumises osas olevate A1912G, A1919G positsioonide muteerimine peatas rakkude kasvu. A1912G ja A1919G mutatsiooni sisaldavate aktiivsete ribosoomide hulk, *in vitro* translatsiooni katses, oli kaks kolm korda väiksem võrreldes pBsB1067U-ga. A1912G ja A1919G transitsiooniga mutantide puhul täheldati ka 40S vaheproduktide akkumulatsiooni. A1912G transitsiooniga 50S partiklite ribosoomidesse lülitumise sagedus oli märkimisväärselt kõrge - 57%, kuid disoomides mutantsete ribosoomide arv vähenes kahekordselt, mis võib olla põhjustatud translatsiooni elongatsiooni häiretest. A1919G mutatsiooniga 50S partikleid sisaldas 32% ribosoomidest, disoomides A1919G mutantide osa vähenes kaks korda, mis viitab sellele, et A1919G transitsioon mõjutab kas initsiatsiooni viimaseid etappe või elongatsiooni.

Kahe pseudouridiini vahel olev A1916G transitsioon aeglustas märgatavalt rakkude kasvu. 14% ribosoomidest sisaldasid A1916G mutatsiooni, polüsoomides mutantsete ribosoomide protsent vähenes kaks korda. Aktiivsetest ribosoomidest A1916G mutatsiooniga ribosoomid moodustasid ainult 4%. A1916G mutandi puhul on ilmselt häiritud nii ribosoomi assotsieerumine kui ka valgusüntees.

Tõenäoliselt mõjutavad mutatsioonid heeliks 69 võimet moodustada interaktsioone tRNA-ga ja väikese subühiku heeliks 44.

6 SUMMARY

In the present work I have analyzed the role of 23S rRNA helix-loop 69 in the biogenesis and function of the ribosome. I have made in the loop of helix 69 following mutations: A1912G, A1913G, C1914A, A1916G, A1918G and A1919G.

Mutations A1913G, C1914A and A1918G in positions forming the bridge B2a between the ribosomal subunits had little or no effect on bacterial growth rate. A1913G and C1914A mutants had a little prolonged doubling times compared to A1918G and pBsB1067U. C1914A and A1918G were as active as the pBsB1067U – 30% of active ribosomes had mutation in position C1914A or A1918G. A1913G transition was represented in 21% of functional ribosomes.

Mutations in positions A1912G and A1919G which form the base of helix 69 loop, stop the cell cycle. Active ribosomes with A1912G or A1919G mutations were represented two to three times more rarely compared to pBsB1067U. The sucrose gradient profiles of mutant ribosomes showed that mutations A1912G and A1919G lead to an extra peak in the gradients sedimenting at approximately 40S. The frequency of A1912G mutant 50S subunits incorporating into the 70S ribosome was 57%, but in case of disomes, this occurrence was two times lower, which may be the result of the elongation defect. The A1919G mutant was incorporated into 32% of ribosomes, in disomes this percent was two times lower. A1919G may have an effect in the elongation of translation or in the last step of initiation.

A1916G mutant had significantly prolonged doubling time. A1916G was presented only in 14% of 70S ribosomes, polysomes contained A1916G mutation in 50S two times less. Only 4% of active ribosomes contained A1916G mutation in 23S rRNA. It seems that in case of A1916G mutant ribosome association and translation were affected.

Mutation in helix 69 probably affects the ability of helix 69 to interact with tRNA and helix 44 of ribosomal small subunit.

7 KASUTATUD KIRJANDUS

1. **Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Frank, J. (1998)** Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 26;95(11):6134-8.
2. **Arluison, V., Hountondji, C., Robert, B., Grosjean, H. (1998)** Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry*. May 19;37(20):7268-76.
3. **Bakin, A. and Ofengand, J. (1993)** Four newly located pseudouridylate residues in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA are all at the peptidyltransferase center: analysis by the application of a new sequencing technique. *Biochemistry*, 32, 9754-9762.
4. **Bakin, A., Kowalak, J.A., McCloskey, J.A. and Ofengand, J. (1994a)** The single pseudouridine residue in *Escherichia coli* 16S RNA is located at position 516. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3681-3684.
5. **Bakin, A., Lane, B.G., and Ofengand, J. (1994b)** Clustering of pseudouridine residues around the peptidyltransferase center of yeast cyto-plasmic and mitochondrial ribosomes. *Biochemistry* 33, 13475-13483.
6. **Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000)** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. Aug 11;289(5481):905-20.
7. **Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J. (1997)** Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278(5346):2123-6.
8. **Beckmann, R., Spahn, C.M.T., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., Blobel G. (2001)** Architecture of the Protein-Conducting Channel Associated with the Translating 80S Ribosome. *Cell*, Vol. 107, 361-372.

9. **Bouadloun, F., Donner, D., Kurland, C.G. (1983).** Codon-specific missense errors in vivo. *EMBO J.* 2(8):1351-6.
10. **Branlant, C., Krol, A., Machatt, M. ., Pouyet, J., Ebel, J.P., Edwards, K. and Kossel, H. (1981)** Primary and secondary structures of *Escherichia coli* MRE 600 23S ribosomal RNA. Comparison with models of secondary structure for maize chloroplast 23S rRNA and for large portions of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 9, 4303-4324.
11. **Brimacombe R. (1995)** The structure of ribosomal RNA: a three-dimensional jigsaw puzzle. *Eur J Biochem.* Jun 1;230(2):365-83.
12. **Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Carter, A.P., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V. (2002)** Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J Mol Biol.* Feb 22;316(3):725-68.
13. **Brosius J., Dull T. J., Noller H. F., (1980).** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 201.
14. **Carter, A.P., Clemons, W.M. Jr, Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsch, T., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V. (2001)** Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science.* Jan 19;291(5503):498-501.
15. **Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., and Noller, H.F. (1999)** X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285, 2095–2104.
16. **Chao F.-C., Schachman H.K. (1956).** The isolation and characterization of a macromolecular ribonucleoprotein from yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.61, 220-230.
17. **Chui, H. M.-P., Desaulniers, J.-P., Scaringe, S. A., Chow, C. S. (2002-I).** Synthesis of helix 69 of *Escherichia coli* 23S rRNA containing its natural modified nucleosides, m(3)Psi and Psi. *J. Org. Chem.* 67, 8847-8854.
18. **Chui, H. M.-P., Meroueh, M., Scaringe, S. A., Chow, C. S. (2002-II).** Synthesis of a 3-methyluridine phosphoramidite to investigate the role of methylation in a ribosomal RNA hairpin. *Bioorg.Med.Chem.* 10, 325-332.

19. **Claude A. (1940).** Particulate components of normal and tumor cells. *Science*, v.91, 77-78.
20. **Cohn, W.E. (1960)** Pseudouridine, a carbon-carbon linked ribonucleoside in ribonucleic acids: Isolation, structure, and chemical characteristics. *J. Biol. Chem.* 235:1488-1498.
21. **Conrad, J., Niu, L., Rudd, K., and Ofengand, J. (1999)** 16S ribosomal RNA pseudouridine synthase RsuA of *Escherichia coli*: Deletion, mutation of the conserved Asp102 residue, and sequence comparison among all other pseudouridine synthases. *RNA* 5, 751-763.
22. **Conrad, J., Sun, D., Englund, N., and Ofengand, J. (1998)** The *rluC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudourine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23S ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* 273, 18562-18566.
23. **Decatur, W.A. and Founier, M.J. (2002)** rRNA modifications and ribosome function. *TRENDS in Biochem. Scien.* July Vol.27 No.7 344-351.
24. **Del Campo, M., Kaya, Y., Ofengand, J. (2001)** Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA*. Nov;7(11):1603-15.
25. **Dube, P., Wieske, M., Stark, H., Schatz, M., Stahl, J., Zemlin, F., Lutsch, G., van Heel, M. (1998).** The 80S rat liver ribosome at 25 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *Structure*; 6(3):389-99.
26. **Farabaugh, P.J. (1978)** Sequence of the *lacI* gene. *Nature*. Aug 24;274(5673):765-9.
27. **Ferre-D'Amare, A.R. (2003)** RNA-modifying enzymes. *Current Opinion in Str. Biol.* 13:49-55.
28. **Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000).** A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 318–322.
29. **Frank, J., and Agrawal, R.K. (2001).** Ratchet-like movements between the two ribosomal subunits: their implications in elongation factor recognition and tRNA translocation. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. (Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 67–75.

30. **Frank, J., Verschoor, A., Li, Y., Zhu, J., Lata, R.K., Radermacher, M., Penczek, P., Grassucci, R., Agrawal, R.K., and Srivastava, S. (1995a).** A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochem. Cell Biol.* 73, 757–765.
31. **Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Spahn, C.M.T., Grassucci, R.A., Svergun, D.I., Frank, J., and Penczek, P. (2000).** Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* 100, 537–549.
32. **Gabashvili, I.S., Gregory, S.T., Valle, M., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M.C., Dahlberg, A.E., Frank, J. (2001).** The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol Cell.*; 8(1):181-8.
33. **Gavrilova, L.P., Kostiashekina, O.E., Koteliansky, V.E., Rutkevitch, N.M., Spirin, A.S. (1976)** Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol.* Mar 15;101(4):537-52.
34. **Gnirke, A., Nierhaus, K.H. (1986)** tRNA binding sites on the subunits of *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem.* Nov 5;261(31):14506-14.
35. **Green, R. and Noller, H.F. (1997)** Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 679-716.
36. **Gu, X., Liu, Y., Santi, D.V. (1999)** The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 14270-14275.
37. **Gutell, R.R. (1996).** In Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis, (Zimmermann, R.A. and Dahlberg, A.E., Eds.). pp. 111-128. *CRC Press, Boca Raton*.
38. **Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Raychaudhuri, S., Ofengand, J. (2001)** A Second function for pseudouridine synthases: a point mutation of RluD unable to form pseudouridines 1911, 1915 and 1917 in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA restores normal growth to an RluD-minus strain. *RNA.* Jul;7(7):990-8.

39. **Gutgsell, N.S., Englund, N., Niu, L., Kaya, Y., Lane, B.G., Ofengand, J. (2000)** Deletion of *Escherichia coli* pseudouridine gene *truB* blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA *in vivo*, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells. *RNA* **6**, 1870-1881.
40. **Harms, J., Schlutzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., Yonath, A. (2001).** High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*. 107(5):679-88.
41. **Hirsh, D. (1971)** Tryptophan transfer RNA as the UGA suppressor. *J. Mol. Biol.* **58**, 439–458
42. **Huang, L., Ku, J., Pookanjanatavip, M., Gu, X., Wang, D., Greene, P.J., and Santi, D. V. (1998a)** Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry* **37**, 15951-15957
43. **Huang, L., Pookanjanatavip, M., Gu, X., Santi, D.V. (1998b)** A conserved aspartate of tRNA pseudouridine synthase is essential for activity and a probable nucleophilic catalyst. *Biochemistry* **37**, 344-351.
44. **Kaya, Y. and Ofengand, J. (2003)** A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *RNA* **9**:711-721.
45. **Kowalak, J.A., Bruenger, E. and McCloskey, J.A. (1995)** Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17758-17764.
46. **Kowalak, J.A., Bruenger, E., Hashizume, T., Peltier, J.M., Ofengand, J., McCloskey, J.A. (1996)** Structural characterization of U^{*}-1915 in domain IV from *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA as 3-methylpseudouridine. *Nucleic Acids Res.* Feb 15;24(4):688-93.
47. **Kowalak, J.A., Pomerantz, S.C., Crain, P.F., and McCloskey, J.A. (1993)** A novel method for the determination of post-transcriptional modification in RNA by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4577-4585.

48. **Liiv, A., Remme, J. (1998)** Base-pairing of 23 S rRNA ends is essential for ribosomal large subunit assembly. *J Mol Biol.* Feb 27;276(3):537-45.
49. **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2001).** Molecular cell biology. Fourt edition. p.335.
50. **Lovett, P.S., Rogers, E.J. (1996)** Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol. Rew.* 60, 366-385.
51. **Maden, B. E. (1990).** The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 39, 241-303.
52. **Mankin, A.S., and Garrett, R.A. (1991).** Chloramphenicol resistance mutations in the single 23S rRNA gene of the archaeon *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 173, 3559–3563. 633–636.
53. **Massenet, S., Ansmant, I., Motorin, Y., Branlant, C. (1999)** The first determination of pseudouridine residues in 23S ribosomal RNA from hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* Nov 26;462(1-2):94-100.
54. **Meroueh, M., Grohar, P.J., Qiu, J., SantaLucia, J.Jr., Scaringe, S.A., Chow, C.S. (2000).** Unique structural and stabilizing roles for the individual pseudouridine residues in the 1920 region of *Escherichia coli* 23S rRNA *Nucleic Acids Res.* 28, 2075-2085.
55. **Mikaelian, I., Sergeant, A. (1992)** A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic Acids Res.* Jan 25;20(2):376
56. **Milligan, R.A., Unwin, P.N.T. (1986).** Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature*; 319(6055): 693-5.
57. **Moazed, D., Noller, H.F. (1989).** Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 57(4):585-97.
58. **Morris,D.R., Geballe, A.P. (2000)** Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8635-8642.
59. **Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. (2000).** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* Aug 11;289(5481):920-30.

60. **Noller, H.F. (1991)** Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem.*;60:191-227.
61. **Noller, H.F., Hoffarth, V., Zimniak, L. (1992)** Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*. Jun 5;256(5062):1416-9.
62. **O'Connor, M., Dahlberg, A.E. (1995)** The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *J Mol Biol*. Dec 15;254(5):838-47.
63. **Ofengand, J. and Bakin, A. (1997).** Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eucaryotes, procaryotes, archaebacteria, mitochondria and chloroplasts. *J.Mol.Biol.* 266, 246-268.
64. **Ofengand, J. Fournier, M. (1998)** The pseudouridine residues of rRNA: Number, location, biosynthesis, and function. *Modification and editing of RNA*. Washington, DC: ASM Press. pp 229-253.
65. **Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L., Kaya, Y. (2001)** Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 66:147-59.
66. **Ofengand, J., Rudd, K. (2000)** The bacterial, archaeal and organellar ribosomal RNA pseudouridines and methylated nucleosides and their enzymes. *In The ribosome: Structure, function, antibiotics, and cellular interactions* (eds. R.A. Garrett et al.), pp.175-189.ASM Press, Washington, DC.
67. **Palade, G.E. (1955).** A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.1, 59-68.
68. **Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M. (1999)** Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J*. Jul 1;18(13):3800-7.
69. **Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V. (2000)** Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol*. Feb;7(2):104-7.

70. **Peil, L. (2001)** Pseudouridiini süntaasi RluD osalus *E. coli* ribosoomide moodustumisel. Magistritöö.
71. **Petermann M.L., Hamilton M.G. (1957).** The purification and properties of cytoplasmic ribonucleoprotein from rat liver. *J. Biol. Chem.*, v.224, 725-736
72. **Porse, B.T., Garrett, R.A. (1995)** Mapping important nucleotides in the peptidyl transferase centre of 23 S rRNA using a random mutagenesis approach. *J Mol Biol.* May 26;249(1):1-10.
73. **Powers, T., Noller, H.F. (1990)** Dominant lethal mutations in a conserved loop in 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;87(3):1042-6.
74. **Ramakrishnan, M., Moore, P.B. (2001)** Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol.* Apr;11(2):144-54.
75. **Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B.G., and Ofengand, J. (1998)** A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* 4, 1407-1417.
76. **Raychaudhuri, S., Niu, Linghao, Conrad, J., Lane, B.G., and Ofengand, J. (1999)** Functional effect of deletion and mutation of *Escherichia coli* ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *J. Biol. Chem.* 274, 18880-18886.
77. **Roberts R.B. (1958).** Ed. Microsomal Particles and protein Synthesis, 1st Symp. of the Biophysical Society, at the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., February 5, 6 and 8, 1958. London-new york-Paris-Los Angeles: Pergamon Press.
78. **Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F., Klug, A. (1974)** Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **250**, 546–551
79. **Rodnina, M.V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., Wintermeyer, W. (1996)** Initial binding of the elongation factor Tu.GTP.aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J Biol Chem.* Jan 12;271(2):646-52.

80. **Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2001)** Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu Rev Biochem.* 70:415-35.
81. **Saarma, U., Remme, J. (1992)** Novel mutants of 23S RNA: characterization of functional properties. *Nucleic Acids Res.* Jun 25;20(12):3147-52.
82. **Schilling-Bartetzko, S., Bartetzko, A., Nierhaus, K.H. (1992)** Kinetic and thermodynamic parameters for tRNA binding to the ribosome and for the translocation reaction. *J Biol Chem.* Mar 5;267(7):4703-12.
83. **Schlunzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., Yonath, A. (2000)** Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell.* Sep 1;102(5):615-23.
84. **Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. (2001)** Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* Oct 25;413(6858):814-21.
85. **Sigmund, C.D., Ettayebi, M., Borden, A., Morgan, E.A. (1988).** Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 164, 673-690.
86. **Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jorgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., Frank, J. (2004)** Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* Mar 10;23(5):1008-1019. Epub 2004 Feb 19.
87. **Spahn, C.M.T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001).** Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107, 373 – 386.
88. **Spillmann, S., Dohme, F. and Nierhaus, K.H. (1977).** Assembly *in vitro* of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the

first heat-dependent conformational change. *J Mol Biol.* Sep 25;115(3):513-23.

89. **Stark, H., Mueller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., van Heel, M. (1995).** The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure*;3(8):815-21.
90. **Stark, H., Orlova, E.V., Rinke-Appel, J., Junke, N., Mueller, F., Rodnina, M., Wintermeyer, W., Brimacombe, R., van Heel, M. (1997)** Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy. *Cell.* Jan 10;88(1):19-28
91. **Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., van Heel, M., Wintermeyer, W. (2000)** Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell.* Feb 4;100(3):301-9.
92. **Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., Zemlin, F., Wintermeyer, W., van Heel, M. (2002)** Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat Struct Biol.* Nov;9(11):849-54.
93. **Stöffler-Meilecke, M., Stöffler, G. (1990)** in *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*, W. E. Hill et al., Eds. (American Society for Microbiology, Washington, DC), pp. 123-133; M. O. Oakes, A. Scheinman, T. Atha, G. Shankweiler, J. A. Lake, in *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*, W. E. Hill et al., Eds. (American Society for Microbiology, Washington, DC), pp. 180-193.
94. **Tenson, T., Ehrenberg, M. (2002)** Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel *Cell*, Vol. 108, 591-594.
95. **Tenson, T., Mankin, A.S. (2001)** Short peptides conferring resistance to macrolide antibiotics. *Peptides* 22, 1661-1668
96. **Tissieres A., Watson J.D. (1958).** Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. *Nature*, v.182, 778-780.
97. **Ts'ao P.O.P., Bonner J., Vinograd J. (1956).** Microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.2, 451-465.

98. Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M., Frank, J. (2003) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol.* Nov;10(11):899-906.
99. Vorstenbosch, E., Pape, T., Rodnina, M.V., Kraal, B., Wintermeyer, W. (1996) The G222D mutation in elongation factor Tu inhibits the codon-induced conformational changes leading to GTPase activation on the ribosome. *EMBO J.* Dec 2;15(23):6766-74.
100. Weber, A.L., Orgel, L.E. (1979). The formation of dipeptides from amino acids and the 2` (3`)-glycyl ester of an adenylate. *J.Mol.Evol.* 13, 185-192.
101. White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., et al., (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286, 1571–1577.
102. 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. *Current Protein and Peptide Science* 3, 1-53.
103. Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2003) The Ribosome through the Looking Glass. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3464-3486.
104. Wimberly, B.T., Brodersen, D.E, Clemons, W.M.Jr, Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonnrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* Sep 21;407(6802):327-39.
105. Wrzesinski, J., Bakin, A., Nurse, K., Lane, B., and Ofengand, J. (1995a) Purification, cloning and properties of the 16S RNA Ψ 516 synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 8904-8913.
106. Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B. G., and Ofengand, J. (1995b) A dual-specificity pseudouridine synthase: purification and cloning of a synthase from *Escherichia coli* which is specific for both Ψ 746 in 23S RNA and for Ψ 32 in tRNA^{Phe}. *RNA* 1, 437-448.

107. **Yusupov, M.M., Garber, M.B., Vasiliev, V.D., Spirin, A.S. (1991)**
Thermus thermophilus ribosomes for crystallographic studies. *Biochimie*. Jul-Aug;73(7-8):887-97.
108. **Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001)** Crystal structure of the ribosome at 5.5 resolution. *Science* 292, 883–896.