

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Aleksander Tali

CsrA valgu ja ribonukleaaside osast toksiini-antitoksiini mRNA-de lagundamisel

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Niilo Kaldalu

MSc Toomas Mets

TARTU 2014

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus	4
1 Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid	5
1.1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemide ülevaade.....	5
1.1.2 Toksiin-antitoksiin süsteemide ekspressiooni regulatsioon	6
1.2 RNA lagundamine bakterites.....	9
1.2.1 Ülevaade RNA lagundamisest <i>E. coli</i>	9
1.2.2 RNA-d lõikavad endonukleaasid.....	9
1.2.3 RNA-d lagnudavad eksonukleaasid	9
1.2.4 RNA stabiilsust määravad RNA struktuuri determinandid	10
1.2.5 RNA lagundamise regulatsioon.....	11
2 Eksperimentaalosa	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika	14
2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid.....	14
2.2.2 Söötmed.....	15
2.2.3 Lahused.....	16
2.2.4 Hübridisatsioonil kasutatavad oligonukleotiidid.....	17
2.2.5 Antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine	17
2.2.6 Dimetüül sulfoksiidi (DMSO) säilituskultuuride valmistamine.....	18
2.2.7 Kompetentsete rakkude valmistamine.....	18
2.2.8 Transformatsioon.....	18
2.2.9 RNA eraldamine	18
2.2.10 Denatureeriva geeli elektroforees ja kapilaar ülekanne (blot).....	19
2.2.11 RNA-DNA (Northern) hübridisatsioon ja antikeha detektsioon.....	20
2.3 Tulemused ja arutelu.....	20
2.3.1 BW25113 ja BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$ tüvede Amp ja Cam minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon	20
2.3.2 CsrA ei mõjuta <i>relBE</i> toksiin-antitoksiin süsteemi antitoksiini mRNA lagundamist.....	21
2.3.3 Üksikud RNAaside ei mõjuta <i>relBE</i> toksiin-antitoksiini süsteemi mRNA fragmentide lagundamist	23
Kokkuvõte	26
Effect of CsrA protein and ribonucleases on degradation of toxin-antitoxin mRNA in <i>E. coli</i>	27
Tänuõnad.....	28
Kirjanduse loetelu.....	29
Lihtlitsents	33

Kasutatud lühendid

Amp: **ampitsilliin** (*ampicillin*)
Cam: klooramfenikool (*chloramphenicol*)
CCD: *charge-coupled device*
DMSO: **dimetüül sulfoksiid**
EDTA: **etüleendiamiinotetraatsetaat** (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
IPTG: **isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid** (*isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside*)
Kan: **kanamütsiin** (*kanamycin*)
LB: **Lurian-Bertani sööde**
MAB: maleiinhape puhver (*maleic acid buffer*)
MOPS: **morfolinopropaansulfaathape** (*3-morpholinopropane-1-sulfonic acid*)
NaAc: naatriumatsetaat (sodium acetate)
PNPaas: polünukeotiidfosforülaas (*polynucleotide phosphorylase*)
RNAas: **ribonukleas**
SDS: naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)
SOB: *Super optimal broth*
SSC: naatriumkloriid-naatriumtsitrat (*saline-sodium citrate*)
TA: **toksiin-antitoksiin** (*toxin-antitoxin*)
TEN: **TRIS, EDTA, NaCl** puhver
Tet: **tetratsükliin** (*tetracycline*)
TRIS: **tris(hüdrosümetüül)aminometaan** (*tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

Sissejuhatus

Bakterid peavad ellujäämiseks hakkama saama pidevalt muutuv keskkonnas ning kohanema mitmete stressitingumustega. Negatiivset mõju elutegevusele avaldavad toitainete puudus, bakteriofaagid, antibiootikumid ja paljud teised muutuvad stiimulid. Pärssivate faktorite vastu võitlemiseks on prokarüootides välja kujunenud mitmeid regulatoorseid süsteeme, nende hulgas toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid. TA süsteem kodeerib stabiilset toksiini ja labiilset antitoksiini, mis moodustavad omavahel kompleksi. Antitoksiini lagunedes avaldab toksiin pidurdavat mõju raku elutegevusele ning võib põhjustada ka raku surma. Kontrollitud rakusurm on positiivse toimega kolooniale, kui surmataks rakk, mis on nakatunud faagiga. Samas toksiini inhibeeriv mõju kasvule ja paljunemisele vähendab metaboolset aktiivsust ning ei lase näiteks antibiootikumidel baktereid tappa. Selliseid baktereid, mis ei jagune ja on antibiootikumidele tundetud, kutsutakse persistoriteks. Arvatakse, et need tolerantsed bakterid põhjustavad kroonilisi haigusi. Selleks, et persistoreid ei tekiks peab antitoksiinide tase olema piisavalt suur, et toksiinid ei avaldaks inhibeerivat mõju. Seega, et töötada välja efektiivset ravi krooniliste haiguste vastu, on vaja mõista paremini TA süsteemide toimimist ja regulatsiooni.

TA geenid moodustavad ühise operoni ja nende mRNA tase on reguleeritud toksiini ja antitoksiini kontsentratsiooni poolt raku. Meie labori varasem töö (Kasari jt., 2013) näitab, et antitoksiini kontrollist vabanenud toksiinid põhjustavad iseenda mRNA ja teiste TA operonide mRNA transkriptsiooni aktiveerimist. Sealjuures lõikavad toksiinid mRNA katki, mille järel antitoksiini kodeeriv osa lagundatakse kiiresti, aga toksiini kodeeriv osa jääb alles. Ribonukleaasid (RNAasid) on valgud, mis lagundavad RNA-d ning arvatakse, et ka RNA-ga seonduv CsrA valk mõjutab mRNA lagundamist.

Selle töö eesmärk on uurida, kas CsrA ja erinevad ribonukleaasid vastutavad antitoksiini kodeerivate mRNA fragmentide lagundamise eest. Kirjanduse esimeses osas antakse ülevaade toksiin-antitoksiin süsteemidest ja nende ekspressiooni regulatsioonist. Teises osas seletatakse ribonukleaaside olemust ning kirjeldatakse RNA stabiilsust ja lagundamise regulatsiooni *Escherichia colis*. Eksperimentaalses osas uuritakse *relBE* mRNA ekspressiooni ja lagundamist erinevate deletsioonidega *E. coli* tüvedes kasutades RNA-DNA (Northern) hübriidatsiooni meetodit. Lisaks leitakse ampitsilliini ja klooramfenikooli minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon *E. coli* BW25113 ja *csrA* geeni deletsiooniga tüvedes.

Töö on koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudis, antibiootikumide laboris (Tenson).

Märksõnad: Toksiin, antitoksiin, RNA lagundamine, CsrA

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid

1.1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemide ülevaade

Bakterites on mitmeid geenipaare, mis kodeerivad väikest, umbes 100 aminohappejäägi pikkust toksiini valku ja sellega seonduvat antitoksiini. Need toksiini ja antitoksiini geenid on koos transkribeeritud ja transleeritud moodustades toksiin-antitoksiin (TA) operoni. TA süsteemid on laialdlaselt levinud bakterite ja arhede genoomides. Vabad antitoksiinid, mis ei ole seotud nendele vastavatele toksiinidele, muutuvad rakkudes väga ebastabiilseks võrreldes vabade toksiinidega. Et pidevalt pärssida toksiinide funktsiooni tuleb kasvavates ja paljunevates rakkudes pidevalt sünteesida nendega seonduvaid antitoksiine (Yamaguchi ja Inouye, 2009). Kui ebatavalisel kasvutingimustel aktiveeritakse bakterirakus proteaasid või TA süsteeme kodeeriv plasmiid läheb kaduma rakujagunemise käigus, siis antitoksiin on kiirelt degradeeritud ning ei saa enam pärssida toksiini. Seega muutuvad toksiinid aktiivseks ning inhibeerivad raku elutegevust.

Praegu on identifitseeritud arvatavalt kokku üle 10 000 erineva toksiini ja antitoksiini järjestuse (Leplae jt., 2011) ning nende laialdlane levik prokarüootides ja arhedes kasvatas oluliselt huvi TA süsteemide vastu. TA süsteemide ja nende aktiivsuse regulatsiooni tundmine on oluline stressisvastuse ja persistorite tekke mõistmisel ning omavad omakorda rakendusi biotehnoloogias.

Sõltuvalt antitoksiinide iseloomust on kirjeldatud viite erinevat TA süsteemide tüüpi. Tüüp I ja III süsteemides on antitoksiiniks RNA. Tüüp I antitoksiinid on antisenss RNA-d, mis seonduvad toksiini mRNA-dele. See viib translatsiooni initsiatsiooni pärssimisele ning RNA dupleksi lagundamisele. Tüüp III antitoksiinid sisaldavad kordusjärjestusi, mille tunnevad ära toksiinid ning seonduvad nendega põhjustades toksiinide mõju vaigistamise. Tüüp II, IV ja V antitoksiinid on valgud, mis vaigistavad, tasakaalustavad või inhibeerivad vastavate toksiinide aktiivsust sünteesi. Tüüp II antitoksiinid on väikesed ebastabiilsed valgud, mis koosnevad kahest domeenist: aminotermiinaalsest DNA-ga seonduvast domeenist ja karboksüültermiinaalsest regioonist, mis seondub toksiinidega. TA komplekside moodustumine inaktiveerib ja vaigistab toksiini. Need kompleksid on tihti ka TA operoni negatiivse autoregulatsiooni eest vastutajad (Overgaard jt., 2008). Tüüp IV antitoksiin tekitab toksiini sihtmärkide polümerisatsiooni, pidurdades nii toksiinide mõju. Tüüp V antitoksiin on

kirjeldatud endoribonukleaasina, mis degradeerib vastavat toksiini kodeerivat mRNA-d (Goeders ja Van Melder, 2014).

Toksiinide märklaudadeks on mitmed raku elutegevuseks vajalikud protsessid. mRNA on üks tüüpilisemaid toksiinide sihtmärke ning seda lõikavad toksiinid, mida kutsutakse mRNA interferaasideks. mRNA interferaase on kahte tüüpi: ribosoomist sõltuvad, millel on vaja lagundamisprotsessi läbiviimiseks olla ribosoomidega kompleksis, ja ribosoomist sõltumatud, mis lõikavad mRNA-d ilma ribosoomide osaluseta. Ribosoom-sõltumatud interferaasid on järjestusspetsiifilised endoribonukleaasid, mis lõikavad mRNA-d kindlaksmääratud järjestustes (Yamaguchi ja Inouye, 2009). Märklaudadeks on veel näiteks DNA replikatsiooni blokeerimine inhibeerides DNA güraasi aktiivsust, raku kasvu peatamine toksiini seondumisel tsütoskeleti valkudele (Tan jt., 2011) ja ATP sünteesi inhibeerimine (Unson ja Wagner, 2008).

Toksiini inhibeeriv mõju raku elutegevusele on üheks persistorite tekke mehhanismiks (Maisonneuve jt., 2013; Maisonneuve jt. 2011). Persistorid on väike populatsioon aeglaselt kasvavaid ning antibiootilistele ravimitele tolerantseid rakke. Tolerantsus on tingitud sellest, et antibiootilised sihtmärgid rakus on inaktiveeritud, sest erinevad rakuprotsessid on piduratud. Arvatakse, et tänu tolerantsusele on need rakud mitmete krooniliste bakteriaalsete haiguste põhjustajad. (Fasani ja Savageau, 2013). Seega, pikemas perspektiivis on kasulik uurida, kuidas antitoksiinide lagundamist peatada, et võidelda pikalt kestvate bakteriaalsete haiguste vastu.

Nagu eelnevalt kirjeldatud on TA operon klassifitseeritud viide rühma (tüüp I-V) antitoksiini ja süsteemi olemuse alusel. Antud uurimustöö keskendub tüüp II süsteemidele.

1.1.2 Toksiin-antitoksiin süsteemide ekspressiooni regulatsioon

Kasvavas rakus on toksiinid neutraliseeritud tihedalt seotud antitoksiinidega. Vabad antitoksiinid lagundatakse proteaaside poolt palju kiiremini kui toksiine ja antitoksiinide tootmise peatumisel võtavad toksiinid sihikule raku eluks vajalikud funktsioonid. Toksiinide aktiveerimine põhjustab kasvu inhibitsiooni ja seiskumist, mis võib olla pöörduv aga mõnedel juhtudel pöördumatu ja viib raku surma.

Peale otsese valk-valk interaktsiooni, reguleerivad antitoksiinid toksiinide aktiivsust transkriptsiooni tasemel (Joonis 1). Antitoksiinid on DNA-ga seonduvad valgud ja repressivad neid kodeerivate TA operonide transkriptsiooni nii eraldiseisvalt kui ka veel efektiivsemalt kompleksis toksiiniga promootorile seondues. TA mRNA-de tasemed on

suurenenud persistoritega rikastatud rakupopulatsioonides, seetõttu seotakse TA süsteeme antibiootikumitolerantsusega (Keren jt., 2004). Persistorid on aeglase kasvuga või suikunud bakterid, mis ei paljune kasvu edendavates tingimustes ja ei ole tapetavad bakteritsiidsete antibiootikumidega (Lewis, 2010). Hiljutine uuring näitab, et 10 endoribonukleaase kodeeriva TA lookuse deletsioon vähendas persistorite taset 100-200 korda, aga üksikud TA süsteemide deletsioonid ei omanud mõngit mõju persistorite sagedusele *E. coli* (Maisonneuve jt., 2011).

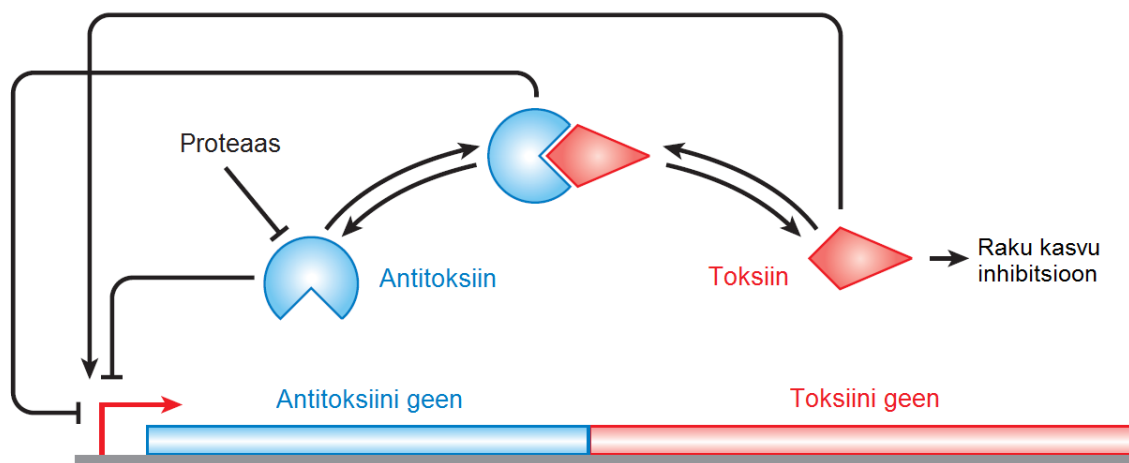
MazE-MazF TA süsteemi C-terminaalne domeen MazE-1 sisaldab kokku kuus negatiivselt laetud aminohappejääki, mis otseselt interakteeruvad MazF homodimeeriga (Kamada jt., 2003). Huvitav, et RelB C-terminaalne domeen, mis on vajalik RelE toksilisuse neutraliseerimiseks omab sarnast struktuuri nagu MazE C-terminaalne domeen, aga nende vastavad toksiinid RelE ja MazF, ei oma kõrget struktuurset homoloogiat (Kamada jt., 2003). Kuigi *E. coli* RelE toksiinidel on struktuurne homoloogia *Mycobacterium tuberculosis* RelE-ga, nende vastavad RelB valgud näitavad erinevaid struktuure C-terminaalsetes neutralisatsioonidomeenides. Seega isegi kui kaks erinevat bakterit omavad homoloogilisi toksine, neutraliseeritakse nende toksilisust erinevate mehhanismide poolt, sest nende antitoksiinid omavad erinevaid struktuure (Arbing jt., 2010).

MazF-i ekspressioon on indutseeritud mitmete stresside mõjul, nagu toitainete nälg, antibiootikumide lisamine, DNA kahjustused ja kuumus ning MazF põhjustab raku kasvu pidurdamise ning lõpuks ka programeeritud rakusuma. Bakteri *Myxococcus xanthus* MazF homoloogil on oluline roll viljakeha moodustamisel, mille ajal rakupopulatsioon peab 80% ulatuses surema (Nariya ja Inouye, 2008). Kuid obligatoorne rakusurm ei esine toitainete näljas *E. coli* rakkudel. Seetõttu rakusurm MazF üleproduktsioonil *E. coli*s võib toimuda ainult kunstlikel tingimustel. Looduslikel tingimustel kromosomaalne *mazF* geeni funktsioon võib reguleerida raku kasvu, põhjustades ajutist kasvuaresti (Suzuki jt., 2005).

Ribosoom-sõltuvate mRNA interferaasidest on üks kõige paremini kirjeldatud süsteeme RelE-RelB. RelE ühildub ribosoomi A saidiga, mis põhjustab mRNA lõikamise eelistatult teise ja kolmanda nukleotiidi vahelt terminatsiooni koodonis. See põhjustab translatsiooni elongatsiooni inhibitsiooni ja sellega valgusünteesi. RelE iseenesest ei oma endoribonukleaaset aktiivsust ning arvatakse, et see on ribosoomiga ühilduv faktor, mis stimuleerib ribosoomide endogeenset nukleaaaset aktiivsust. RelB antitoksiin liig edendab RelB:RelE (2:1) kompleksite moodustumist, mis seonduvad operaatorregioonidele ja represseerivad transkriptsiooni. RelE toksiooni liig edendab RelB:RelE (2:2) kompleksi moodustumist, mis ei ole võimeline seonduma DNA-ga. Uurimused näitavad, et RelE

üleekspressioon põhjustab märgatavat tõusu *relBE* mRNA tasemes (Overgaard jt., 2008). Seega TA süsteemide mRNA ekspressiooni tase sõltub toksiini ja antitoksiini vahekorras rakus ja seda nähtust kutsutakse tingimuslikuks koostööks (*conditional cooperativity*) (Joonis1) (Overgaard jt., 2008).

MazF ja MqsR toksiinide induktsioonil tõuseb *relBE* mRNA tase rakus ja vastupidi: RelE toksiini ekspressioon aktiveerib *mazEF* ja *mqsRA* operonide transkriptsiooni. Seega võivad inhibeerimata toksiinid aktiveerivda teiste TA operonide transkriptsiooni (Kasari jt., 2013). Sellist nähtust nimetatakse TA süsteemide vaheliseks transkriptsiooni ristaktivatsiooniks. Antud töö eksperimentaalses osas uuritakse MazF ja MqsR toksiinidega indutseeritud *relBE* transkripti taseme muutusi erinevate deletsioonidega tüvedes. MqsRA TA süsteemi eripära on see, et toksiini geen asub antitoksiini geeni järel, mitte vastupidi nagu tüüp II TA süsteemides üldjuhul on. Lisaks ristaktivatsioonile leiti, et TA süsteemide poolt toodetud transkripte lõikavad endonukleolüütiliselt teiste TA süsteemide toksiini valgud. MazF ja MqsR üleekspressioonil oli indutseeritud *relBE* mRNA lõigatud nendele toksiinidele spetsiifilistes saitides. Produktideks jäid alles enamasti toksiini kodeerivad osad, sest antitoksiini kodeerivad osad on tundlikumad degradatsioonile (Kasari jt., 2013).



Joonis 1. Tüüp II TA süsteemi regulatsioon (kohandatud Gerdes ja Maisonneuve, 2012 järgi). Punane nool on TA operoni promootor. Promootor on repressseeritud DNA-le seonduva antitoksiini ja toksiin-antitoksiin kompleksi poolt. Promootorit indutseerib vaba toksiin ning teeb seda eriti tõhusalt kui toksiini tase rakus on suurem kui antitoksiini tase. Proteaas lagundab vabu antitoksiine, kuna need on ebastabiilsed.

1.2 RNA lagundamine bakterites

1.2.1 Ülevaade RNA lagundamisest *E. colis*

RNA lagundamine on rakutsükli füsioloogiline protsess, mis reguleerib RNA-st sõltuvaid mehhanisme. Ribonukleaasid on ensüümid, mis lagundavad fosfodiester sidet RNA ahelas. Ribonukleaase saab aktiivsuse järgi jaotada kahte kategooriasse: eksoribonukleaasid ja endoribonukleaasid. Eksonukleaasid lagundavad RNA ahelat ühe nukleotiidi kaupa 3'-5' suunas ja ka 5'-3' suunas ning endonukleaasid lagundavad RNA-d ahela sees lõigates ahela kaheks fragmendiks. *E. colis* on rohkem kui 20 erinevat RNAasi. RNAasid vahendavad RNA töötlemist, lagundamist ja kvaliteedikontrolli (Arraiano jt., 2010). Selle töö eksperimentaalses osas uuritakse enamjaolt eksoribonukleaase (Tabel 1).

RNA lagundamisel lõhutakse fosfodiester side kas hüdroolüüsi või fosforolüüsi teel. Kõik teadaolevad fosforolüüsi ribonukleaasid on 3'-5' eksoribonukleaaside perekonnast. Hüdroolüütiliste ribonukleaaside (nt RNAas II ja RNAas R) produktid on mononukleotiidid (NMP) ja fosforolüütilistel (nt PNPaas) ribonukleasidel on produktideks nukleosiid difosfaadid (NDP) (Deutcher ja Reuven, 1991).

1.2.2 RNA-d lõikavad endonukleaasid

Endoribonukleaasid lagundavad RNA ahelat fosfodiester sideme hüdroolüüsiga, nii et jääb alles kaks RNA fragmenti. Endoribonukleaasi aktiivsus on sarnane DNA restriksiooni ensüümi aktiivsusele, kuid erineb selle poolest, et endoribonukleaas ei ole tingimata järjestusspetsiifiline. Tüüpilised üksikahelalist ja kaksikahelalist RNA-d lõikavad endoribonukleaasid *E. colis* on vastavalt RNAas E ja RNAas III. Järjestusspetsiifilised ensüümid on näiteks RegB endoribonukleaas, mis on kodeeritud bakteriofaag T4 poolt ja eelistab GAGG järjestusi mRNA translatsiooni initsiatsiooni regioonis. Järjestusspetsiifilised endoribonukleaasid on ka mõnede toksiin-antitoksiin süsteemide toksiinid, näiteks MazF ja MqsR (Carpousis jt., 2009). *E. coli* endoribonukleaasid on RNAas E, RNAas III ja selle töö eksperimentaalses osas uuritav RNAas HI ja RNAas I (Tabel 1).

1.2.3 RNA-d lagundavad eksonukleaasid

Eukarüootide, prokarüootide ja arhede eksonukleaasid sisaldavad homoloogilisi piirkondi. Enamik eksoribonukleaase (nt RNAas II ja RNAas R) käituvad hüdroolüütiliselt moodustades NMP-sid ja teised degradeerivad RNA-d fosforolüütilise mehhanismiga produtseerides NDP-sid (PNPaas). Kuigi endonukleasidel on omvahel sarnasusi võivad isegi lähedased

homoloogid käituda erinevalt samal substraadil. Näiteks RNAas R eelistab lagundada rRNA-d ning RNAas II eelistab lagundada pol aden leeritud RNA-d (Cheng ja Deutscher, 2002). Eksoribonukleaasid erinevad üksteisest ka RNA seondumisviisi ning võime poolest lagundada sekundaarstruktuure moodustavat RNA-d.

Seondumiseks ja lagundamisprotsesside tõhusaks läbiviimiseks eelistavad eksoribonukleaasid lineaarseid  hksikahelalisi regioone RNA 3' otsas. Paljudel RNA-del esinevad sekundaarstruktuurid 3' otstes ning need elemendid pärsivad degradatsiooni. RNA pol aden latsioon (adeniinirikka fragmendi 3' otsa lisamine) võimaldab eksoribonukleaasidel paremini seonduda 3' otsaga (Condon, 2007). Kuid adeniinirikka lineaarse fragmendi lisamine ei eemalda juuksen elstruktuure, mille juures võivad RNAasid siiski pidama j ada (Joonis 2). *E. coli*s 5'-3' aktiivsusega eksonukleaase ei eksisteeri.

Põhilised ja ka selles t os uuritavad eksoribonukleaasid *E. coli*s on RNAas II, PNPaas ja RNAas R, RNAas T, RNAas BN, RNAas PH (Tabel 1).

1.2.4 RNA stabiilsust m aravad RNA struktuuri determinandid

Tsistroniks nimetatakse pol peptiidahela sünteesiks vajalikku kodeerivat järjestust koos regulatoorse järjestusega. Bakterite mRNA võib olla kas monotsistronne või pol tsistronne. See tähendab, et üks mRNA molekul kodeerib kas ühte valku, või mitut valku. mRNA-l on 5' trifosfaat ots, mis on pärit transkriptsiooni algatavast nukleotiidist. *E. coli* mRNA-l ei ole eukarüootide 5' met ul guanosiin (cap) modifikatsiooni. Nagu eukarüootide cap nii ka trifosfaadiga ots bakteril pakub mingil m aral kaitset mRNA degradatsiooni eest. Juuksen elstruktuuride olemasolu RNA otstes kaitseb mRNA-d degradatsiooni eest (Celesnik jt., 2007). Eriti oluline on juuksenõela struktuur mRNA 3' otsas (Joonis 2).

E. coli mRNA üks tähtsamaid omadusi on translatsiooni toimumine samaaegselt transkriptsiooniga. See tähendab seda, et ribosoomid alustavad mRNA transleerimist juba siis, kui seda sünteesitakse. Nii moodustatakse ka pol ribosoom, mis kujutavad endast ühe sünteesitava mRNA-ga seotud ribosoomide ahelat. mRNA aktiivselt transkribeeritav 3' ots on ühendunud RNA polümeraasi katal utilise piirkonnaga siis kui 5' otsa transleeritakse pol peptiidiks. mRNA 3' otsad on *E. coli*s eksonukleaase degradatsiooni sihtmärgid. Seni, kuni toimub transkriptsioon, on mRNA 3' ots lagundamise eest kaitstud ja üldiselt kaitsevad mRNA-d ka transleerivad ribosoomid. mRNA 3' ots on kaitstud 3'-5' eksonukleaaside eest sekundaarstruktuuriga (joonis 2), mis on enamasti Rho-sõltumatu transkriptsiooni terminaator (Condon, 2007).

1.2.5 RNA lagundamise regulatsioon

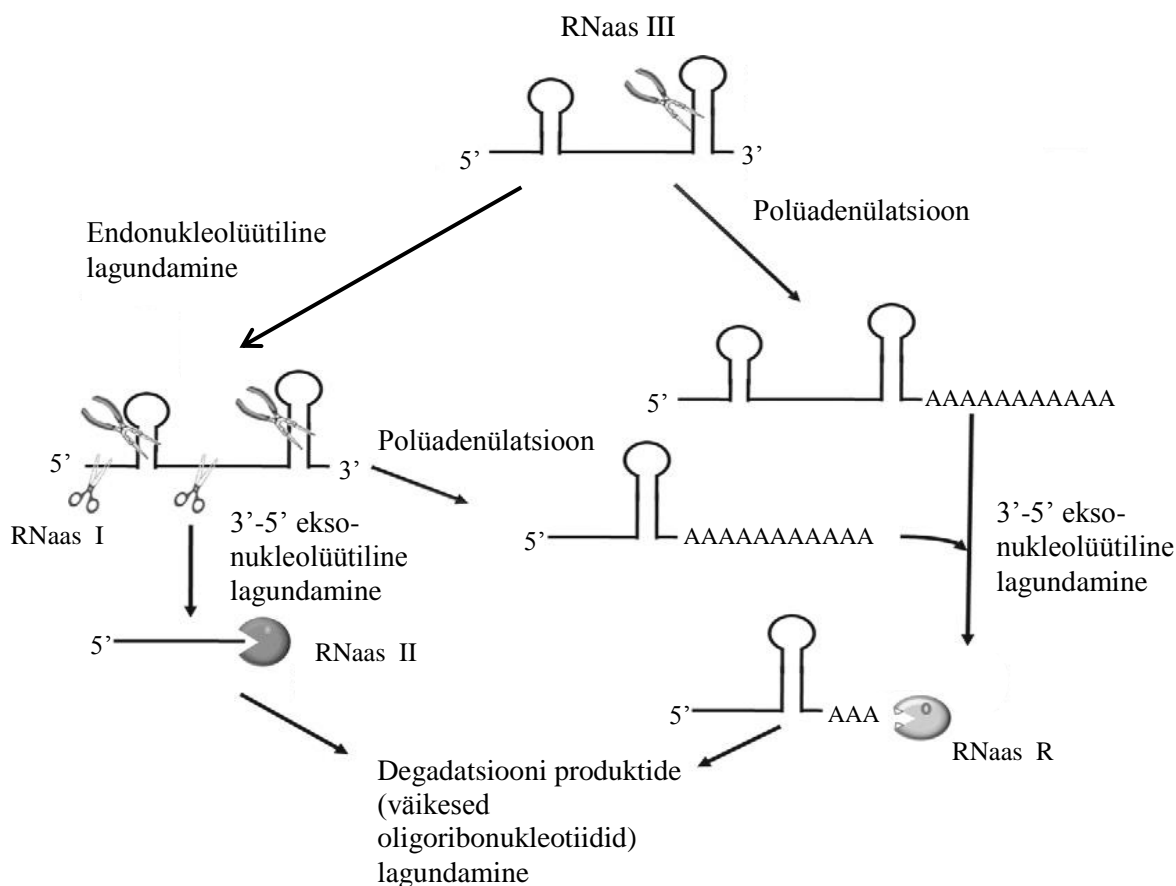
RNA degradatsiooni kiirusel on tähtis roll RNA tasemete moodustamises. Stabiilsemad RNA-d on mittekodeerivad rRNA ja tRNA. Posttranskriptsiooniline regulatsioon RNA tasemel aitab kaasa diferentsiaalsele geeniekspressioonile (Régnier ja Hajnsdorf, 2009). Bakteriaalsed rakud ei sisalda kindla spetsiifikaga süsteeme iga RNA klassi lagundamiseks. RNAasid on olulised nii RNA töötlemise ja sünteesi radades, seega sama komplekt ensüüme peab toime tulema paljude erinevate substraatidega (Deutscher, 2006). Näiteks RNAas II, mRNA-d degradeeriv eksoribonukleas, on võimeline võtma osa tRNA lagundamises (Li jt., 2002). RNA lagundamise süsteem ja seega RNA degradatsiooni rajad on dünaamilised ja võivad muutuda vastusena erinevatele keskkonnastiimulitele.

RNA järjestus võib otseselt mõjutada enda sünteesi ja degradatsiooni. RNA molekulides on stabiliseerivad elemendid, näiteks juuksenõelstruktuurid (eriti G/C rikastes segmentides), mis võivad endast kujutada takistust ribonukleolüütilisele aktiivsusele peatades eksoribonukleaside edasiliikumise (Spickler ja Mackie, 2000). Mõned nukleotiidide järjestused teevad mRNA palju tundlikumaks ribonukleasidele. Polüadenülatsioon (adeniinirikaste segmentide lisamine 3' otsale) tavaliselt võimendab eksonukleolüütilist aktiivsust (joonis 2). Endonukleolüütiliste lagundamiste tulemusena modustavad uued 3' otsaga fragmendid, mis on kiirelt lagundatavad eksonukleaside poolt. RNAas II saab degradeerida ainult ühksikahelalist RNA-d ja on täielikult inhibeeritud sekundaarstruktuuri poolt. PNPaas ja RNAas R võivad lõhkuda sekundaarstruktuuri, eeldusel et 3' ots on polüadenüleeritud (Condon, 2007). Võimalik, et läheb vaja mitut ringi polüadenülatsiooni ning eksonukleolüütilist degradatsiooni enne kui sekundaarstruktuurid täielikult lagundatakse. Nagu eelnevalt mainitud, toimub transkriptsioon translatsiooniga samal ajal ja ribosoomid võivad blokeerida nukleolüütilist aktiivsust ja stabiliseerida RNA-d. Enneaegne translatsiooni peatamine põhjustab üldjuhul ka samaaegse mRNA degradatsiooni, kus RNAas R omab põhilist rolli (Richards jt., 2006).

RNA-ga seonduvad valgud võivad ka mõjutada transkripti stabiilsust. Näiteks RNA-ga seonduv tsaperoon (*chaperon*) Hfq kaitseb RNA-d nii endo- kui ka eksonukleaside eest (Folichon jt., 2003). Selles uurimustöös käistleme CsrA valku, mis on posttranskriptsiooniline regulaator. 61 aminohappe pikkune CsrA valk on kodeeritud *csrA* geeni poolt. CsrA seonduv mRNA-ga ning reguleerib mRNA stabiilsust ja translatsiooni. Enamasti toimub negatiivne regulatsioon ning sellest sõltuvalt ka mRNA-de lagundamine. CsrA negatiivse regulatsiooni alla kuuluvad biofilmi moodustamise, glükogeneesi ja glükoneogeneesi rajad. Positiivset

reguleerib glükolüüsi, atsetaadi metabolismi radu ning liikuvust, patogeneesi, virulentsust ja oksüdatiivse stressi vastust. Negatiivse regulatsiooni ajal seondub CsrA spetsiifilistele regioonidele, mis asuvad mRNA 5' otsas ja kattuvad Shine-Dalgamo järjestusega. Seandumine põhjustab translatsiooni initsiatsiooni inhibitsiooni ja mRNA lagundamise (Baker jt., 2007).

Arvatakse, et prokarüootides on RNA lagundamiste algatajad on enamjaolt endonukleaasid (Carpousis jt., 2009). Eksoribonukleaasid viivad tavaliselt degradatsiooniprotsessi lõpuni ja lagundavad lõpuni katki lõigatud mRNA fragmendid, seepärast on harva näha RNA lagundamise produkte. Kuid mõned eksoribonukleaasid võivad lagundada ka täispikka RNA-d (Andrade jt., 2006).



Joonis 2. Põhilised RNA lagundamise rajad *E. coli*s (kohandatud Andrade jt., 2009 järgi). RNA transkriptidel võivad esineda sekundaarstruktuurid nii 5' kui ka 3' otsas. Sekundaarstruktuurist jagu saamiseks lisatakse 3' otsale adeniinirohke fragment (polüadenülatsioon), mis võimaldab 3'-5' eksonukleasil (RNase R) lõigata RNA-d koos sekundaarstruktuuriga. Eksisteerivad ka dsRNA-d lagundavad ensüümid (RNase III), mis on

võimelised lagundama sekundaarstruktuurides tekkinud kaksikahelalist RNA-d. Endonukleolüütiline ensüüm (RNAas I) lagundab RNA ahelat keskelt, moodustades ahela, millel ei ole 3' otsas sekundaarstruktuuri. Juuksenõelstruktuurita RNA lagundatakse 3'-5' eksonukleaaside (RNAas II) poolt ära. Lõpuks lagundatakse eksonukleaaside (oligoribonukleaasid) poolt kõik allesjäänud väikesed oligoribonukleotiidid mononukleotiidideks.

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

1. Määrata, kas CsrA valk osaleb antitoksiini RelB kodeerivate mRNA lõikeproduktide lagundamisel.

2. Määrata, kas uuritavad ribonukleasid vastutavad antitoksiini RelB kodeerivate mRNA lõikeproduktide lagundamise eest.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja mutantsete tüvede iseloomustus

Tüvi	Genotüüp	Ensüüm	Resistent sus	Viide
BW25113	<i>lacIq</i> <i>rrnB3_lacZ4787</i> <i>hsdR514Δ(araBAD)</i> <i>567Δ(rhaBAD)568</i> <i>rph-1</i>	-	-	(Haldimann ja Wanner, 2001)
BW25113 <i>ΔrtcB</i>	<i>ΔrtcB</i>	RNA ligaas	Kan	(Baba jt., 2006)
BW25113 <i>Δrbn</i>	<i>Δrbn</i>	RNAas BN 3'-5'eksonukleas	Kan	(Baba jt., 2006)
BW25113 <i>Δrph</i>	<i>Δrph</i>	RNAas PH 3'-5'eksonukleas	Kan	(Baba jt., 2006)
BW25113 <i>Δpnp</i>	<i>Δpnp</i>	PNPaas 3'-5'eksonukleas	Kan	(Baba jt., 2006)
BW25113 <i>ΔrnhA</i>	<i>ΔrnhA</i>	RNAas HI endonukleas	Kan	(Baba jt., 2006)
BW25113 <i>Δrnt</i>	<i>Δrnt</i>	RNAas T 3'-5'eksonukleas	Kan	(Baba jt., 2006)
MG1655 T11R ⁻	<i>Δrna Δrnb Δrnr</i>	RNAas I Endoribonukleas RNAas II, RNAas R 3'-5'eksonukleas	Tet, Kan, Cam	(Basturea jt., 2011)
BW25113 <i>ΔglgCAP ΔcsrA</i>	<i>ΔglgCAP ΔcsrA</i>	-	Kan	(Niilo Kaldalu, avaldamata)

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Genotüüp	Ekspressseeritav valk	Toksiin/antitoksiin	Viide
pSC228	pA1/O4/O3:: <i>chpAI</i>	MazE	Antitoksiin	(Pedersen jt., 2002)
pSC3326	pBAD33:: <i>chpAK</i>	MazF	Toksiin	(Pedersen jt., 2002)
pATOX-ygiT	pOU82:: <i>mqsA</i>	MqsA	Antitoksiin	(Kasari jt., 2010)
pBAD-MqsR	pBAD33:: <i>mqsR</i>	MqsR	Toksiin	(Kasari jt., 2010)

2.2.2 Söötmed

Super Optimal Broth (SOB) sööde, Difco™ SOB Medium

Koostisega 20 g trüptooni; 5 g pärmiekstrakti; 0,5 g NaCl; 2,4 g MgSO₄; 186 mg KCl ühe liitri kohta. (Hanahan, 1983). Kompetentsete rakkude valmistamisel lisati SOB söötmesse 0,2% glükoosi (SOC sööde). Plasmiidide pSC3326 ja pBAD-MqsR tranformeerimiseks bakteritesse, mis sisaldasid vastavalt, pSC228 ja pATOX-ygiT plasmide, lisati SOC söötmele ampitsilliini 15 µg/ml tüve BW25113 *ΔglgCAP ΔcsrA* puhul ja 30 µg/ml kõigi teiste bakteritüvede puhul.

Lurian-Bertani (LB) sööde, Difco™ LB Broth, Lennox

Koostisega 10g trüptooni, 5g pärmiekstrakti ja 5g NaCl ühe liitri söötme kohta.

LB agar, Difco™ LB Agar, Lennox

Sama koostisega nagu LB sööde ning lisatud on veel 1,5% agarit.

BW25113 *ΔglgCAP ΔcsrA* tüve antitoksiini ja toksiini plasmiidiga tranformeeritud rakkude kavatamisel sisaldasid nii LB agar kui ka LB vedelsööde 15 µg/ml ampitsilliini ja 15 µg/ml klooramfenikooli. Üleöökultuure kasvatades lisati söötmele 1 mmol IPTG-d, mis indutseerib antitoksiini geeni ekspressiooni ja 0,2% glükoosi, mis inhibeerib ParaBAD promootorit. Kõigi teiste tüvede plasmiididega tranformeeritud rakkude kasvatamisel oli ampitsilliini kontsentratsioon 30 µg/ml ja klooramfenikooli 25 µg/ml. IPTG ja glükoosi kogused olid samad. BW25113 *ΔglgCAP ΔcsrA* tüve agregeerumise vältimiseks vedelsöötmes kasvatamisel lisati 0,01% SDS-i.

2.2.3 Lahused

Maleiinhappe (MAB) puhver (pH 7,5):

0,1 M Maleiinhape

0,15 M NaCl

Blokeerimislahus:

1% (w/v) blokeerimispreparaati (Roche) lahustatud MAB-is

Morfoliinpropaansulfaathappe (MOPS) puhver (pH 7,0):

20 mM morfolinopropaansulfaat hape

5 mM naatriumatsetaat (CH_3COONa , NaAc)

2 mM EDTA

Naatriumkloriidi-naatriumtsitraadi (Saline-sodium citrate, SSC) puhver (pH 7,0):

150 mM NaCl

15 mM naatriumtsitraat

Pesu puhver I:

2x SSC

0,1% SDS

Pesu puhver II:

0,1x SSC

0,1% SDS

Hübridisatsioonipuhver:

7% SDS (w/v)

50% deioniseeritud formamiid

5x SSC

0,1% N-laurülsakrosiin

2% blokeerimislahus

50 mM NaPO_4 (pH 7.0)

Detektsioonipuhver CDP star reaktsioonile (pH 9,5):

1 M TRIS

2 M NaCl

Strip lahus (Stripping solution):

5 mM EDTA (pH 8.0)

0,1% SDS

Formaldehüüd geeli laadimispuhver:

50 (v/v) glütserool

10 mM EDTA (pH 8.0)

0,25% (w/v) broomfenool sinine

0,25% (w/v) ksüleen tsüanool FF

TEN (TRIS, EDTA, NaCl puhver)

100mM TRIS (pH 7,5)

10 mM EDTA

1 M NaCl

RF1 (pH 5,8)

0,1 M RbCl

0,079 M MnCl₂

0,014 M CaCl₂

0,03 M kaaliumatsetaat (CH₃COOK)

15% glütserool

RF2 (pH 6,8)

0,01 M RbCl

0,1 M CaCl₂

0,1 M MOPS

15% glütserool

2.2.4 Hübridisatsioonil kasutatavad oligonukleotiidid

relE TG TTCACGTACCGTCGAGCCCAGCTTTCGCCATTCCTTTAGTGCC

relB GAACGCGCTTTAAGTTCATCGTCAATACGCAGGTTAATGCTACCC

2.2.5 Antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine

37°C loksutile pandi kasvama üleökultuur 3 ml LB söötmesse koos 0,01% SDS-iga. Üleökultuuri lahjendati 10 korda värskesse LB söötmesse, millele oli lisatud 0,01% SDS-i ning inkubeeriti üks tund 37°C loksutil. LB söötmele lisati ampitsilliini kontsentratsiooniga 20 µg/ml ja klooramfenikooli 25 µg/ml. Mikrotiiterplaadil tehti antibiootikumiga söötmetest 2-kordsete lahjenduste rida kasutades lahjendamiseks LB söödet. Mikrotiiterplaadi iga kann

sisaldas 100 µl antibiootikumiga söötme lahjendust. Seejärel võeti bakterikultuur loksutilt, lahjendati veel 2000 korda ja lisati igasse mikrotiiterplaadi kannu 100 µl. Inkubeeriti 20 h 37°C kapis ning mõõdeti optiline tihedus 600 nm juures mikrotiiterplaadi lugejaga.

2.2.6 Dimetüül sulfoksiidi (DMSO) säilituskultuuride valmistamine

Bakterikultuurid kasvatati OD₆₀₀ 0,3-ni ning lisati rakkudele 8% dimetüül sulfoksiidi. Külmutati vedelas lämmastikus 200 µl portsjonites ning säilitati -80°C külmkapis.

2.2.7 Kompetentsete rakkude valmistamine

Kompetentide ettevalmistamiseks kasvatati rakud LB agari plaadil, mis sisaldas antibiootikume ning inkubeeriti üleöö 37°C loksutil. 1000x lahjendus üleöö kultuurist inokuleeriti 40 ml SOC söötmesse ning inkubeeriti 37°C loksutil. Kui OD₆₀₀ oli 0,5 juures siis jahutati kultuurid jääl 15-20 minutit. Rakud sadestati tsentrifuugides Sigma 4K15C rootoril 11150 2500g 10 minutit 4°C juures ning eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 20 ml RF1-s, inkubeeriti jääl 15 min ja tsentrifuugiti. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 1 ml RF2-s ning inkubeeriti jääl 15 min. Kompetentsed rakud külmutati portsjonite kaupa vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C külmkapis.

2.2.8 Transformatsioon

Kompetentsed rakud sulatati ning lisati plasmiid. Segati õrnalt ja inkubeeriti jääl 30 minutit. Seejärel tekitati kuumašokk inkubeerides tuube 1,5 min 42°C juures. Tuubid asetati jääle ning lisati 1 ml toatemperatuuril olevat LB söödet. Inkubeeriti 37°C juures tund aega ning pärast seda rakud plaaditi selektiivsele tardsöötmele.

2.2.9 RNA eraldamine

Transformeeritud bakteritüvest kasvatati üleöö kultuur, lahjendati 1000 korda ja kasvatati 200 ml LB söötmes OD₆₀₀ 0,2 juurde. Lisati 1 mM L-arabinoosi (indutseerib toksiini geeni ekspressiooni) ning võeti proovid uuritavates ajapunktides. Bakterite sadestamiseks tsentrifuugiti Sigma 4K15C rootoril 11150 2 minutit 8000g 4°C juures. Eemaldati supernatant, külmutati rakud vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C külmkapis.

600 µl fenooli koos 1% SDS lahusega pandi 1,5 ml tuubi ja kuumutati 67°C juurde. Külmutatud rakud resuspendeeriti 600 µl jääkülmas TEN lahuses ning lisati inkubaatoril olevatesse fenool+SDS lahusega tuubidesse. Segati ning inkubeeriti 67°C juures 5 minutit, iga minuti järel segades. Pärast seda tsentrifuugiti 4°C ja 15700g juures 10 minutit. Kõik järgnevad tsentrifuugimised toimuvad 4°C juures. 500 µl vesifaasi eemaldati 1,5 ml tuubi ja asetati jääle. Kõiki järgnevaid protseduure sooritati jääl. Lisati tuubile 600 µl 1:1

fenool:kloroformi lahust ning segati tugevalt. Seejärel tseentrifuugiti 15700g juures 10 min ning eemaldati 450 µl vesifaasi uude 1,5 ml tuubi. Lisati 500 µl kloroformi ja segati tugevalt ning tseentrifuugiti 15700g juures 1 minut. Eemaldati 350 µl vesifaasi uude 1,5 ml tuubi ning lisati 40 µl 3 M NaAc. Segati tugevalt ning lisati 480 µl jääkülma isopropanooli. Segati uuesti ning sadestati RNA-d 30 minutit -20°C külmkapis. Tseentrifuugiti 40 minutit 15700 g juures ning eemaldati võimalikult palju isopropanooli. Lisati 700 µl 75% jääkülma etanooli ja tseentrifuugiti 5 minutit 15700g juures. Eemaldati võimalikult palju etanooli ja jäeti tuubid lahtiselt kuivama ruumitemperatuuril 10 minutit. RNA lahustati 40 µl Milli-Q vees, pipeteeriti uude tuubi ning hoiustati -80°C külmkappi.

2.2.10 Denatureeriva geeli elektroforees ja kapilaar ülekanne (blot)

Geeli valmistamiseks sulatati 2,25g agarooši 127ml Milli-Q vees ning lisati 15 ml 10x MOPS-i ja 8,1 ml formaldehüüdi. Iga RNA proovi jaoks segati kokku 15 µl formamiidi, 5,4 formaldehüüdi, 3 µl 10x MOPSi, 1,6 µl Milli-Q vett ja 5 µl RNA-d kontsentratsioonil 2 µg/µl. Kogu proovide valmistamise protsess toimus jääs. Tehti kaks RNA markerite lahust, igaks lahuseks kasutati 10 µl formamidi, 3,6 µl formaldehüüdi, 2 µl 10x MOPSi ja 0,9 µl Milli-Q vett. Lõpuks lisati ühte 3,5 µl ThermoScientific RiboRuler LOW Range Ladderi ja teise RiboRuler HIGH Range Ladder markeri. Proovid ja markerid denatureeriti 55°C juures 10 minutit ning asetati jääle. RNA proovile lisati 3,3 µl ja markerile 2,2 µl 10x formaldehüüd laadimispuhvit. Markerid lisati geelile pärast proove, jättes kaks vahepealset rada tühjaks. Geeli jooksutati 1 tund 60V väiksemate mRNA-de paremaks eraldamiseks ning pärast seda jooksutati 3 tundi 85V. Geeli elektroforees sooritati BioRad süsteemis ning kasutati 1x MOPS puhvit. Pärast elektroforeesi lõigati skalpelliga välja RNA markerite rajad ning värviti 1 tund loksutil 50 ml 10 kordse SYBR Gold värvi lahjendusega Milli-Q vees. Värvitud markerid detekteeriti UV transilluminaatoriga 254 nm lainepikkuse valguse juures UVIPRO pildistusmasinas.

Kapilaarbloti valmistamise jaoks niisutati Roche toodetud Nylon N+ membraani ning 2 lehte 3mm filterpaberit Milli-Q vees ja pärast 10x SSC-s. Geel loputati Milli-Q vees 15 minutit ning pärast 2 korda 5 minutit 10x SSC-s. Pandi kokku kapilaarblot ning teostati ülekannet üleöö 10x SSC-s. Membraan asetati kilesse kahe immutatud (10x SSC) 3mm filterpaberi lehe vahele 4°C külmkappi. Meetod on kohandatud Villu Kasari uurimustöödest (Kasari jt., 2010; Kasari jt., 2013).

2.2.11 RNA-DNA (Northern) hübridisatsioon ja antikeha detektsioon

Soojendati 20 ml hübridisatsioonipuhvrit 65°C juurde ning lisati hübridisatsioonitorusse 42°C ahju. Nailonmembraan viidi hübridisatsioonitorusse ning prehübridiseeriti 42°C juures 1,5 tundi. Lisati 50 pmol 5'-otsas fluorestseiniiga märgitud DNA oligionukleotiid hübridisatsioonipuhvrise torus ning hübridiseeriti üleöö.

Membraani pesuks soojendati pesupuhver II 48°C juurde vesivannis. Järgnevaid protseduure viidi läbi roostevabast terasest anumast, mis on valguse eest kaitstud. Membraanile loputati pesupuhver 1-ga 2 korda 5 minutit toatemperatuuril loksutil. Seejärel loputati pesupuhver 2-ga 2 korda 15 minutit 48°C juures loksutil. Loputati membraani MAB-is lahustatud Tween 20 (0,3% v/v) lahusega (MAB+Tween) umbes 30 sekundit, et saada lahti SDS-ist.

Pärast pesu lisati membraanile 50 ml 10x lahjendusega blokeerimislahust (Blocking solution) ning inkubeeriti 1,5 tundi toatemperatuuril loksutil. Lisati 3,5 µl fluorestseini vastase antikeha ja aluselise fosfataasi konjugaati blokeerimislahusesse ning inkubeeriti 30 minutit. Membraan loputati 100 ml MAB+Tween lahuses ning seejärel pesti 250 ml sama lahusega 2 korda 15 min. Membraan niisutati 2 korda 50 ml detektsioonipuhvriga 3 minuti jooksul. Membraan niisutati kiles 1,5 ml CDP-Star lahusega ja inkubeeriti pimedas 5 minutit. Pärast seda asetati membraan uude kilesse ning sisestati röntgenfilmi kasseti pimedasse. Kemoluminesens detekteeriti CCD kaameraga keskmisel tundlikusel (medium sensitivity) 15 minutit ja röntgenfilmil 10 minutit.

Membraanide säilitamiseks puhastati need keeva strip lahusega 2 korral 10 minutit loksutil. Puhastatud membraanid asetati kilesse kahe 3 mm filterpaberi vahele, mis on immutatud 10x SSC lahusega, ning hoiustatud 4°C külmkapis. Meetod on kohandatud Villu Kasari uurimustöödest (Kasari jt., 2010; Kasari jt., 2013).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 BW25113 ja BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$ tüvede Amp ja Cam minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

Uurimistöös kasutatud plasmiididel on resistentsusgeenid, mis on vajalikud plasmide sisaldavate kolooniate selektsiooniks ja plasmiidide stabiilselt tüves säilitamiseks. Antitoksiini plasmidi stabiliseerib ampitsilliin ja toksiini plasmidi klooramfenikool ning nende antibiootikumidega selekteeritakse pärast transformatsiooni rakud, mis sisaldavad vajalikku plasmidi. Püüdes transformeerida plasmide pSC228 ja pATOX-ygiT tüvesse BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$, ei õnnestunud vaatamata korduvatele katsetele saada ühtegi

kolooniat. See viis mõttele, et see tüvi võib olla antibiootikumide suhtes tundlikum kui teised *E. coli* laboritüved ja selektsiooniks on vaja kasutada tavaliselt madalamaid antibiootikumide kontsentratsioone. Et seda oletust testida, määrati ampitsilliini ja klooramfenikooli minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid *csrA* deletsiooniga ja BW25113 tüvedel. Minimaalseks inhibeerivaks kontsentratsiooniks oli $\Delta csrA$ tüvel ampitsilliini suhtes 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ja klooramfenikooli suhtes 3,125 $\mu\text{g/ml}$ ning BW25113 metsiktüüpi tüves vastavalt 5 $\mu\text{g/ml}$ ja 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Tulemused näitavad, et *csrA* geeni deletsioon muudab *E. coli* tundlikumaks ampitsilliini ja klooramfenikooli suhtes. Lähtuvalt katsetulemusest vähendati ampitsilliini ja klooramfenikooli kontsentratsiooni söötmes kaks korda. See tegi BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$ transformatsiooni ja kasvatamise võimalikuks.

2.3.2 CsrA ei mõjuta *relBE* toksiin-antitoksiin süsteemi antitoksiini mRNA lagundamist

Katse eesmärgiks oli uurida muutusi *relBE* transkripti RNA ekspresioonitasemes ja stabiilsete lõikeproduktide rakku kogunemises. BW25113 tüve ja *csrA* deletsiooniga tüve (Tabel 1) vahel. $\Delta csrA$ tüvi oli konstrueeritud samas laboris (Kaldalu, avaldamata). *glgCAP* oli deleteeritud selleks, et saada eemaldada *csrA* geen (Timmermans ja Van Melderen, 2009). Kuna vabal toksiinil on inhibeeriv mõju raku elutegevusele, siis esimesena transformeeriti rakkudesse antitoksiini plasmiid. Kompetentsed rakud olid eelnevalt valmistatud. BW25113 ja $\Delta csrA$ tüve kompetentsetesse rakkudesse transformeeriti antitoksiini plasmidi pSC228 ja pATOX-ygiT (Tabel 2). Kui antitoksiini plasmiidid eelnevalt rakus pole, ei õnnestu toksiini plasmidi transformeerida.

Toksiini plasmidi sisestamiseks on vaja valmistada uued antitoksiini plasmiididega kompetentsed rakud. Kompetentide üleöö kasvatamisel lisati LB agarile 0,2% glükoosi ja 1mmol IPTG-d. Glükoos inhibeerib soovimatut transkriptsiooni toksiini ekspressiooni kontrollivat ParaBAD promootorit ning IPTG indutseerib antitoksiini geeni ekspressiooni. Esimesel katsel kompetentsete rakkude kasvatamisel leiti, et antud tüvedel on pikad lag faasid ning selleks, et tööga valmis jõuda tehti teises katses 1000 kordse lahjenduse asemel 100 kordse lahjendus üleöö kultuurist. pATOX-ygiT-ga transformeeritud tüvele sisestati pBAD-MqsR ning pSC228-ga sisestati pSC3326 plasmiidid. Transformatsiooni inkubeerimise etapis lisati 0,2% glükoosi LB söötmele, et inhibeerida ParaBAD promootori lekkimist.

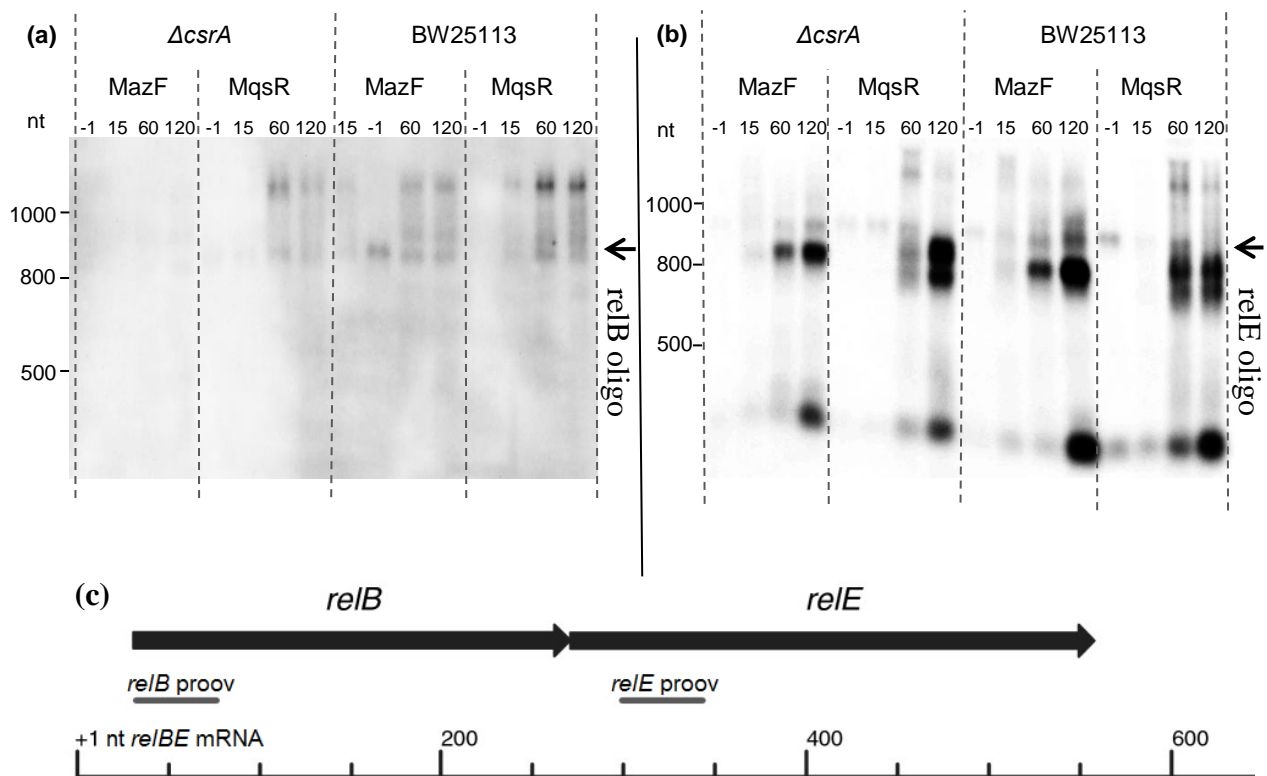
Mõlema plasmiidiga transformeeritud kultuurid kasvatati DMSO säilituskultuurist üleöö 13h, tehti sellest 1000x lahjendus ja kasvatati tiheduseni 0,2 ja indutseeriti toksiin lisades 1 mM L-arabinoosi. Täheledatai, et plasmide sisaldaval BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$ tüvel on pikk lag-faas,

sest kultuuri kasv tiheduseni 0,2 võttis aega 4h. Proovid võeti ning RNA eraldati ajapunktides -1 (enne arabinoosi lisamist), 15, 60 ja 120 min. Eraldatud RNA kontsentratsioonid mõõdeti spektrofotomeetril ning lahjendati kontsentratsioonile 2 µg/µl.

Geelile kanti 10 µg igas ajapunktis eraldatud RNA-d, samuti metsiktüüpi tüvest BW25113 samades katsetingimustes eraldatud RNA-d, mis oli eraldatud Toomas Metsa poolt. Peale elektroforeesi kanti RNA filtrile.

relBE transkripti detekteeriti RNA-DNA hübridisatsioonil. Kuna TA operonide mRNA-de kontsentratsioon rakus on madal kasutati suurema tundlikuse saavutamiseks proovina fluorestseiiniga märgitud oligonukleotiidi ja fluorestseiini vastast antikeha – aluselise fosfataasi kojugaati. See võimaldas proovi hübridisatsiooni tuvastada nn. võimendatud kemoluminestsentsi (ECL) meetodil. Filtrit hübridiseeriti *relE* oligonukleotiidiga kahel korral ning pildistati (Joonis 3b) ja *relB* oligonukleotiidiga koguni kolmel korral, aga *relB* proovi hübridisatsioonisignaali jäi liiga nõrgaks. Põhjuseks arvati olevalt *relB* oligonukleotiidi nõrka seondumist. Seetõttu tehti korduskatse uue geeliga muutes katsetingimusi. Membraani pesu ajal sooritati loputamine pesupuhver 2-ga 48°C asemel temperatuuril 42°C ning lisati 4 µl antikeha tundlikumaks detektsiooniks. DNA-RNA hübridisatsiooni tulemus *relB* oligonukleotiidiga on kujutatud **joonisel 3a**.

Saadud tulemuste põhjal (Joonis 3) on näha, et nii BW25113 tüves kui ka *csrA* deletsiooniga tüves on *relBE* transkripti tasemed ja lõikeproduktide muster sarnased. Seega võib eeldada, et CsrA puudumine ei ole oluline *relBE* toksiin-antitoksiin süsteemi mRNA lagundamisel. Toksiini mRNA eksonukleaasid lagundamise eest võib kaitsta seda 3' sekundaarstruktuur. Nagu muud endonukleaasid lõikavad ka toksiinid mRNA kaheks osaks. 3'-poolne lõikeprodukt saab endale algse transkripti 3' otsa, milles võime eeldada kaitsva juuksenõela struktuuri olemasolu. 5'-poolse lõikeprodukti 3' otsas selline kaitsev struktuur eeldatavasti puudub ja ta lagundatakse kiiremini eksonukleaaside poolt. Antitoksiini kodeerib tavaliselt operoni esimene geen (5' osa) ja toksiini teine geen (mRNA 3' osa). Kuna antitoksiini kodeeriva mRNA fragmendi 3' otsas ei ole juuksenõelstruktuuri, siis see lagundatakse eksoribonukleaaside poolt ära.



Joonis 3. *relBE* transkriptsiooni analüüs BW25113 ja BW25113 $\Delta glgCAP \Delta csrA$ tüvedes toksiinide indutseerimisel. Toksiinid MazF ja MqsR indutseeriti L-arabinoosiga ning RNA eraldati erinevatel ajapunktidel – -1 (enne indutseerimist), 15, 60 ja 120 min. Hübridiseeriti *relB* (a) ja *relE* (b) oligonukeotiididega. Noolega (\leftarrow) on näidatud täispika *relBE* transkripti positsioon. Lühemad RNA molekulid, mis hübridiseeruvad ainult *relE* prooviga on selle lõikeproduktid. *reBE* mRNA suurus on üle 800 nt. Ekspresseritud toksiinidega bakterid sisaldasid järgnevaid plasmide: MazF – pSC228 ja pSC3326; MqsR – pATOX-ygiT ja pBAD-MqsR. Joonisel (c) on näidatud oligoproovide seondumiskohad.

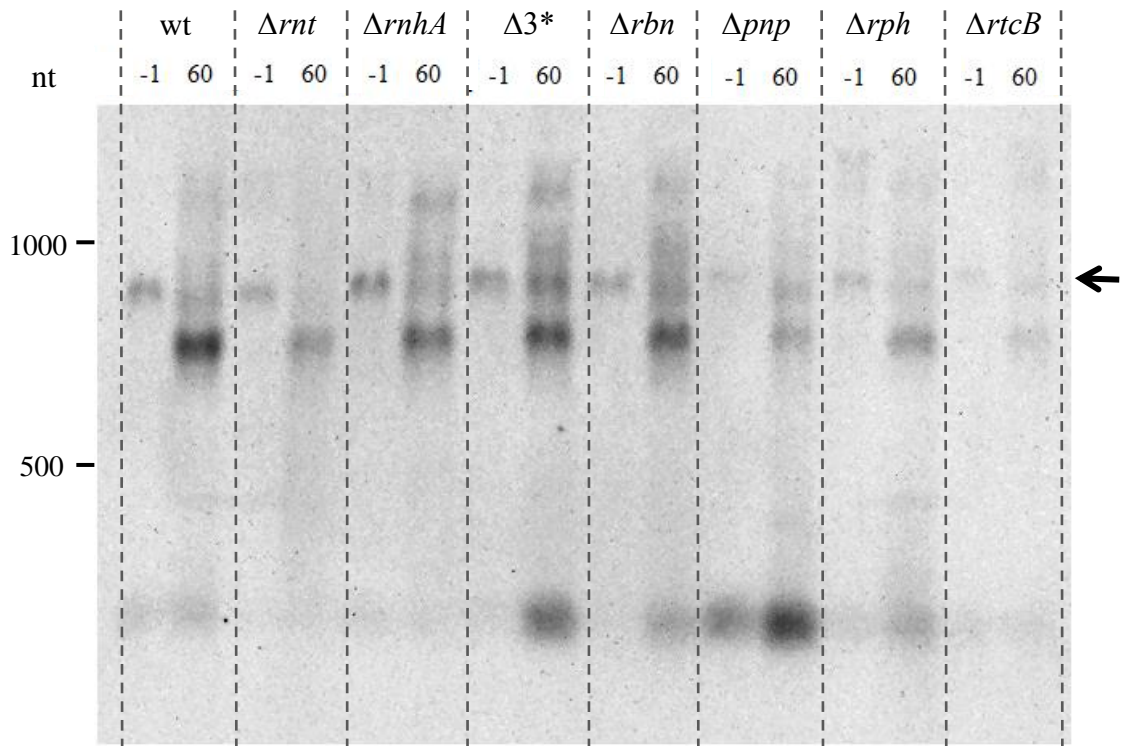
2.3.3 Üksikud RNAaside ei mõjuta *relBE* toksiin-antitoksiini süsteemi mRNA fragmentide lagundamist

Kuna CsrA ei olnud oluline *relBE* transkripti lagundamisel, otsustati uurida erinevate ribonukleaaside osa *relBE* mRNA lagundamisel. Katses kasutati, RNAas II, RNAas R, RNAas I, RNAas BN, RNAas PH, PNPaas, RNAas HI ja RNAas T (Tabel 1) kodeerivate geenide deletsioonidega tüvesid. MG1655 TIIIR⁻ tüvi sisaldas kolme RNAasi deletsiooni (Basturea jt., 2011). Katsesse võeti ka RNA ligaasi kodeeriva *rtcB* deletsiooniga tüvi, kuna on teada, et RtcB valk modifitseerib MazF toksiini lõikamise järel tekivaid RNA otsi (Tanaka ja Shuman, 2011). Transformeeriti pSC228 ja pSC3326 (Tabel 2) plasmiidid. Antitoksiini plasmidi

selekteerimiseks kasutati 30 µg/ml ampitsilliini ning toksiini plasmidi selekteerimiseks 25 µg/ml klooramfenikooli. Võrreldes *csrA* deletsiooniga tüve kompetentsete rakkude valmistamisel hakkasid rakud kiiremini kasvama ning kasutati SOC söötme asemel LB söödet. RNA eraldati ajapunktides -1 (enne induktsiooni) ja 60 min.

Hübriidsatsioonil *relE* oligonukleotiidiga saadud RNA detektsiooni tulemused on kujutatud **joonisel 4**. Neljal korral *relB* oligonukleotiidiga hübridiseerides ei suudetud detekteerida RNA-d. Prooviti ka pesupuhver 2-ga nailonmembraani pesta 42°C juures, aga tulemusi ei olnud. Arvati, et seda põhjustas antud oligo halb seondumine mRNA-ga ning *relB* nõrgemat detektsiooni võrreldes *relE*-ga on täheldatud ka varasematel katsetel laboris (Kasari 2013; Villu Kasari ja Toomas Mets, isiklikud tähelepanekud). *relE* oligoprooviga hübridiseerimise tulemused olid sarnased nagu kontrollil. Seega ei leitud spetsiifilisi ribonukleaase, mis lõikavad ainult *RelBE* TA süsteemi antitoksiini mRNA-d. Tüve BW25113 RNAaside deletsiooniga mutantide puhul kasutati üleekspresseeritavaks toksiiniks *MazF*-i ning saadud tulemuste põhjal ei olnud vaja korrata katset mõne muu toksiini ekspresseerimisega, sest eeldati, et mRNA stabiilsus ei sõltu oluliselt sellest, millist toksiini on TA transkriptsiooni ristaktivatsiooniks kasutatud.

Põhilise järeldusena leiti, et *CsrA* valgu ja uuritavate ribonukleaaside osa *relBE* mRNA *RelB* antitoksiini kodeerivate fregmentide lagundamisel ei ole otsustav.



Joonis 4. *relBE* transkriptsiooni analüüs MazF toksiini indutseerimisel BW25113 (wt) ja MG1655 tüvede erinevates deletsiooni-mutantides. Toksiini indutseerimisel oli RNA oli eraldatud erinevatel ajapunktidel – -1 (enne indutseerimist) ja 60 min. Hübridiseeritud *relE* oligonukeotiidiga. Noolega (←) on näidatud uuritava *relBE* transkripti positsioon. BW näitab BW25113 tüve radu. Uuritud tüvede deleteeritud ribonukleaasid on järgmised: Δrnt – RNAas T; $\Delta rnhA$ – RNAas HI; $\Delta 3^*$ – RNAas I, RNAas II, RNAas R; Δrbn – RNAas BN; Δpnp – PNPaas; Δrph – RNAas PH; $\Delta rtcB$ – RNA ligaas RtcB.

Kokkuvõte

CsrA on valk, mis seondub mRNA 5' otsaga ja põhjustab mRNA lagundamise. TA operonide ristaktivatsiooni korral oli nähtud, et toksiidid lõikavad TA mRNA katki ja antitoksiini kodeeriv osa lagundatakse, samas kui toksiiini kodeeriv fragment jääb alles ja kuhjub rakkudesse. Et kontrollida, kas CsrA on oluline antitoksiini kodeerivate mRNA fragmentide lagundamisel eemaldati CsrA valku kodeeriv geen ja uuriti deletsiooni mõju *relBE* mRNA lõikeproduktide lagundamisele. DNA-RNA hübridisatsiooni näitas, et mRNA tasemed ja lõikeproduktide muster BW25113 kontrolltüves ja BW25113 Δ *glgCAP* Δ *csrA* tüves olid sarnased. Toksiinid MazF ja MqsR indutseerivad *relBE* promootori aktivatsiooni ja samas lõikavad *relBE* mRNA katki, mille järel RelB-d kodeeriv osa lagundatakse ja RelE-d kodeeriv osa koguneb rakkudesse. Seega püstitatud hüpotees, et CsrA valk on oluline RelBE toksiiin-antitoksiini süsteemi antitoksiini mRNA-de lagundamisel, ei ole tõene.

Käesolevas töös uuriti veel üheksa erineva ribonukleaasi (RNAas T, RNAas HI, RNAas I, RNAas II, RNAas R, RNAas BN, PNPaas, RNAas PH ja ligaas RtcB) mõju *relBE* antitoksiini mRNA lagundamisel. Uuritava *relBE* TA süsteemi transkriptsioon indutseeriti MazF toksiiini poolt. Saadud hübridiseerimise tulemused relE oligoprooviga näitavad, et kõigi üheksa erineval ribonukleaasi tüve mutantidel on detekteeritud RNA kogused ja lõikeproduktid sarnased BW25113 tüvega. Seega uuritud ribonukleaasid võivad osaleda antitoksiini mRNA lagundamisel, aga antud juhul ei ole nende osakaal RelB antitoksiini transleeriva mRNA degradeerimisel oluline.

Millised ensüümid ja süsteemid on tähtsad antitoksiini mRNA lagundamisel ei ole selge. Eeldame, et antitoksiini-toksiini mRNA 3' otsas on juuksenõelstruktuur, mis ei lase *E. coli* põhilistel eksoribonukleasidel transkripti lõigata ilma abita (polüadenülatatsioon, abistavate ribosoomidega seondumine). RNA-d lõikavad toksiidid, nagu ka muud endoribonukleasid lõikavad transkripti keskelt katki, tekitades 3' otsa, millel ei ole sekundaarstruktuuri ning sellist mRNA-d saavad eksonukleasid efektiivselt degradeerida.

See võiks olla põhjuseks, miks toksiiini kodeerivad mRNA fragmendid jäävad alles ja antitoksiini kodeerivad lõikeproduktid lagundatakse, juhul kui toksiin on operoni teine geen. Seletamatuks jääb, miks toksiiini kodeerivad lõikeproduktid on stabiilsemad ka siis, kui toksiin on operoni esimene geen, näiteks *mqsRA* operonis.

Effect of CsrA protein and ribonucleases on degradation of toxin-antitoxin mRNA in *E. coli*

Aleksander Tali

Summary

Toxin-Antitoxin (TA) systems are abundant in all bacteria. These systems code for a toxin that inhibits cell growth and an antitoxin that regulates toxin activity by forming a tight complex with it. The antitoxin is less stable than the toxin and it has to be produced continuously to prevent the toxin to inhibit cell growth. The inhibition of cell growth leads to cell death or formation of persisters, which are non-reproductive bacteria tolerant to antibiotics and other stress conditions. The persisters are believed to be one of the causes of recurrent diseases. In this study, we tried to determine if CsrA protein and various ribonucleases are important for degradation of antitoxin mRNA.

The expression of TA operon is regulated by toxin:antitoxin ratio. Uninhibited toxins can activate transcription of other TA operons (Kasari jt., 2013). Overexpression of MazF and MqsR toxins induce the translation of *relBE* operon. At the same time, toxins cut the toxin-antitoxin mRNA followed by degradation of the antitoxin-encoding part and massive pile-up of the toxin-encoding fragments. Since antitoxin is usually the first gene of the operon, it was suggested that degradation of the antitoxin mRNA was caused by CsrA protein, which binds close to the ribosome binding site. BW25113 (wild-type) and BW25113 Δ *glgCAP* Δ *csrA* strains were transformed with plasmids for MazF and MqsR expression. The RNA from the cells overexpressing MazF and MqsR toxins was hybridized with *relE* and *relB* oligoprobes. The results of RNA hybridization show that the quantity of the transcripts and the pattern of the RNA fragmentation products are very similar in both wild-type and Δ *csrA* strains. Therefore, the CsrA does not play important role in degradation of *relB* antitoxin mRNA.

Next, the effects of nine ribonucleases (RNAse T, RNAse HI, RNAse I, RNAse II, RNAse R, RNAse BN, PNPase, RNAse PH, ligase RtcB) were analyzed. The results were obtained by overexpression of MazF toxin. The mRNA was hybridized with *relE* oligoprobe. Results showed that there was no significant differences in quantities and degradation patterns of *relBE* transcript compared to BW25113. Therefore, it was concluded that none of the examined ribonucleases seems to be substantial in degradation of the antitoxin part of mRNA.

It is not known, if CsrA protein and the ribonucleases used in this study are causing degradation of antitoxin-coding fragments of the TA mRNA, but it was found that they are not important factors for degrading *relB* antitoxin encoding mRNA cleavage products. It is suggested that the 3' ends of mRNA transcript of *relBE* have secondary structures, which repress the exonucleolytic activity. The endonucleolytic toxins cleave mRNA in front of the stem-loop structure and create a unprotected 3' end that is a good substrate for exonucleolytic activity.

Tänuõnad

Täna oma abivalmis ja vastutulelike juhendajaid Niilo Kaldalut, Toomas Metsa ja Villu Kasarit. Peale selle täna laborikaaslaste meeldiva töökeskkonna loomise ja abi eest.

Kirjanduse loetelu

Andrade, J. M., Cairrão, F. and Arriano, C. M. (2006). RNase R affects gene expression in stationary phase: Regulation of *ompA*. *Mol Microbiol* 2006;60:219–28

Andrade, J. M., Pobre, V., Silva, I. J., Domingues, S. and Arraiano, C. M. (2009). The Role of 3'-5' Exoribonucleases in RNA Degradation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 85: 188-218

Arbing, M. A., Handelman, S. K., Kuzin, A. P., Verdon, G., Wang, C., Su, M., Rothenbacher, F. P., Abashidze, M., Liu, M., Hurley, J. M., Xiao, R., Acton, T., Inouye, M., Montelione, G. T., Woychik, N. A. and Hunt, J. F. (2010). Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure*. 2010 Aug 11;18(8):996-1010

Arraiano, C. M., Andrade, J. M., Domingues, S., Guinote, I. B., Malecki, M., Matos, R. G., Moreira, R. N., Pobre, V., Reis, F. P., Saramago, M., Silva, I. J. and Viegas S. C. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* 34 (2010) 883–923

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A. Masaru Tomita, M Barry L Wanner, B. L. and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2006;2:2006.0008

Baker, C. S., Eory, L. A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T. and Babitzke, P. (2007). CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol* 189:5472–5481

Basturea, G. N., Zundel, M. A. and Deutscher, M. P., (2011). Degradation of ribosomal RNA during starvation: Comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA* (2011), 17:338–345

Carpousis, A. J., Luisi, B. F., and McDowall, K. J., (2009). Endonucleolytic Initiation of mRNA Decay in *Escherichia coli*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 85:92-117

Celesnik, H., Deana, A., Belasco, J. G. (2007). Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 50 pyrophosphate removal. *Mol Cell* 2007; 27:79–90

- Cheng, Z. F. and Deutscher, M. P. (2002).** Purification and characterization of the Escherichia coli exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J Biol Chem* 2002; 277:21624–9
- Condon, C. (2007).** Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2007, 10:271–278
- Deutscher, M. P. (2006).** Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* 2006;34:659–66
- Deutscher, M. P. and Reuven, N. B. (1991).** Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Apr 15;88(8):3277-80
- Fasani, R. A. and Savageau, M. A. (2013).** Molecular mechanisms of multiple toxin–antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):E2528-37
- Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Régnier, P. and Hajnsdorf, E. (2003).** The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* 2003;31:7302–10
- Gerdes, K. and Maisonneuve, E. (2012).** Bacterial Persistence and Toxin-Antitoxin Loci. *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. 66:103–23
- Goeders, N. and Van Melderen, L. (2014).** Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins* 2014, 6, 304-324
- Haldimann, A. and B. L. Wanner (2001).** Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* 183(21): 6384-6393
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557-80
- Kamada, K., Hanaoka, F., and Burley S. K. (2003).** Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* 11:875–84
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T. and Kaldalu, N. (2010).** The Escherichia coli mqsR and ygiT genes encode a new toxin-antitoxin pair. *J Bacteriol.* 2010 Jun;192(11):2908-19

- Kasari, V., Mets, T., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2013).** Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* 2013, 13:45
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. and Lewis, K. (2004).** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004 Dec;186(24):8172-80
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., Van Melderen, L. (2011).** Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(13):5513-25
- Lewis, K. (2010).** Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357-72.
- Li, Z., Reimers, S., Pandit, S. and Deutscher M. P. (2002).** RNA quality control: Degradation of defective transfer RNA. *EMBO J* 2002;21:1132–8
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. and Gerdes, K. (2013).** (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154, 1140–1150
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G. and Gerdes, K. (2011).** Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 9, 2011; 108(32): 13206–13211
- Nariya, H. and Inouye, M. (2008).** MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 132, 55–66
- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G. and Gerdes, K. (2008).** Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* 2008, 69, 841–857
- Pedersen, K., Christensen, S. K. and Gerdes, K.(2002).** Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* 2002, 45(2):501-510
- Régnier, P. and Hajnsdorf, E. (2009).** Poly(A)-Assisted RNA Decay and Modulators of RNA Stability. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 85:137-169
- Richards, J., Mehta, P. and Karzai, A. W. (2006).** RNase R degrades nonstop mRNAs selectively in an SmpBtmRNA-dependent manner. *Mol Microbiol* 2006;62:1700–12.

- Spickler, C. and Mackie, A. (2000).** Action of RNases II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J Bacteriol* 2000;182:2422–7
- Suzuki, M., Zhang, J., Liu, M., Woychik, N. A. and Inouye, M. (2005).** Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol. Cell* 18, 253–261
- Tan, Q., Awano, N. and Inouye, M. (2011).** YeeV is an Escherichia coli toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbiol.* 79:109–18
- Tanaka, N. and Shuman, S. (2011).** RtcB is the RNA ligase component of an Escherichia coli RNA repair operon. *Journal of Biological Chemistry* 01/2011; 286(10):7727-31.
- Timmermans, J. and Van Melderen, L. (2009).** Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2009 Mar;191(5):1722-4
- Unoson, C. and Wagner, E. G. (2008).** A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 70:258–70
- Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2009).** mRNAinterferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxinantitoxin systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85:467–500

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Aleksander Tali

(sünnikuupäev: 13.02.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose CsrA valgu ja ribonukleasid osast toksiini-antitoksiini mRNA-de lagundamisel, mille juhendajad on Niilo Kaldalu ja Toomas Mets,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 23.05.2014