

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
Molekulaarbioloogia õppetool

TRIINU SIIBAK

**Antibiootikumide klooramfenikool ja
erütromütsiin mõju ribosoomide
assambleerumisele eubakteris *Escherichia coli***

Magistritöö

Juhendajad:
Lauri Peil, M. Sc.
Jaanus Remme, Ph. D.

Tartu 2005

SISUKORD

Töös kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
Kirjanduse ülevaade	5
1. <i>rrn</i> operonide ehitus ja rRNA protsessimine	5
1.1. <i>rrn</i> operonide ehitus	5
1.2. Esmane rRNA protsessimine	6
1.3. 23S rRNA protsessimine	7
1.4. 16S rRNA protsessimine	8
2. Prokariootse ribosoomi assambleerumine	10
2.1. Assambleerumine <i>in vivo</i>	10
2.2. Assambleerumine <i>in vitro</i> ehk rekonstruktsioon	11
2.3. Assambleerumise initsiaatorvalgud	12
2.4. Varajased assambleerumise valgud	12
2.5. 50S subühiku hilised assambleerumise komponendid	13
3. Klooramfenikooli mõju ribosoomide assambleerumisele	15
3.1. Klooramfenikool	15
3.2. "Klooramfenikooli partiklid"	16
3.3. rRNA ja ribosoomi valkude süntees klooramfenikooli juuresolekul kasvavates rakkudes	17
4. 50S subühiku biogeneesi mõjutavad antibiootikumid	19
4.1. Erütromütsiini mõju 50S subühiku assambleerumisele <i>Escherichia coli</i> rakkudes	19
4.2. Makroliide mõju 50S subühiku assambleerumisele <i>Staphylococcus aureus</i> rakkudes	21
4.3. Makroliidide mõju 50S subühiku assambleerumisele <i>Haemophilus influenzae</i> rakkudes	22
4.4. 16 –liikmelise makroliidide, linkosamiidide ja streptogramiin B mõju 50S subühiku assambleerumisele <i>Staphylococcus aureus</i> rakkudes	23
4.5. Ketoliidide mõju 50S ja 30S subühiku assambleerumisele	25
Ekspereimntaalne osa	29
1. Töö eesmärk	29
2. Materjalid ja meetodid	30
2.1. Ribosoomide eraldamine	30
2.2. RNA eraldamine	30
2.3. Praimeri ekstensioon	31
2.4. RNA dot-blot	32
3. Tulemused	33
4. Arutelu	40
Kokkuvõte	43
Summary	44
Kasutatud kirjandus	45

Töös kasutatud lühendid

rrn - ribosomaalse RNA operon

ITS - internal transcribed spacer

RNaas – ribonukleas

r-valgud – ribosomaalsed valgud

S-valgud – väikese subühiku valgud

L-valgud – suure subühiku valgud

TP30 – 30S subühiku valgud

TP50 – 50S subühiku valgud

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat

EDTA - etüleen-diamiin-tetraatsetaat

DTT - ditiotreitool

PNPaas – polünukleotiidfosforülaas

dNTP - desoksünukleotiidtrifosfaat

HEPES – N-2-hüdrosüetüülpiperasiin-N'-2-etaansulfoonhape

GuSCN – guadiinium tiotsünaat

MOPS – 4 –morfoliinpropaansulfoonhape

Sissejuhatus

Ribosoomide biogenees on keeruline protsess, mis hõlmab eubakteris *Escherichia coli* puhul 54 valgu ja 3 rRNA koordineeritud sünteesi ja nende assambleerumist 50S ja 30S subühikuteks. Ribosoomide assambleerumine algab juba rRNA sünteesiga ning temperatuuril 37°C lõppeb mõne minutiga.

On näidatud, et klooramfenikooli juuresolekul kasvavates rakkudes moodustuvad ribosomaalsed vahepartiklid. Tõenäoliselt on sellisel juhul assambleerumine häiritud kaudselt, tänu klooramfenikooli peptidüültransferaasest reaktsiooni inhibeerivale mõjule.

10 aastat tagasi näidati, et erütromütsiin inhibeerib spetsiifiliselt ribosoomi 50S subühikute moodustumist seondudes assambleerumise intermediaadiga, peatades assambleerumise raja ning suunates peatatud prekursorid degradatsioonile (Chittum & Champney, 1995).

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse lühike ülevaade rRNA protsessimisest, ribosoomide assambleerumisest ning erinevate antibiootikumide mõjust ribosoomide biogeneesil.

Töö eksperimentaalses osas võrreldakse klooramfenikooli ja erütromütsiini mõju ribosoomide assambleerumisele ning näidatakse, et mõlemad antibiootikumid omavad mõju nii 30S kui ka 50S partiklite assambleerumisele.

Autori tänu kuulub kogu abivalmis laboriseltskonnale, eriti professor Jaanus Remmele ja Lauri Peilil juhendamise eest ning dr. Tanel Tensonile oluliste nõuannete eest.

Kirjanduse ülevaade

1. *rrn* operonide ehitus ja rRNA protsessimine

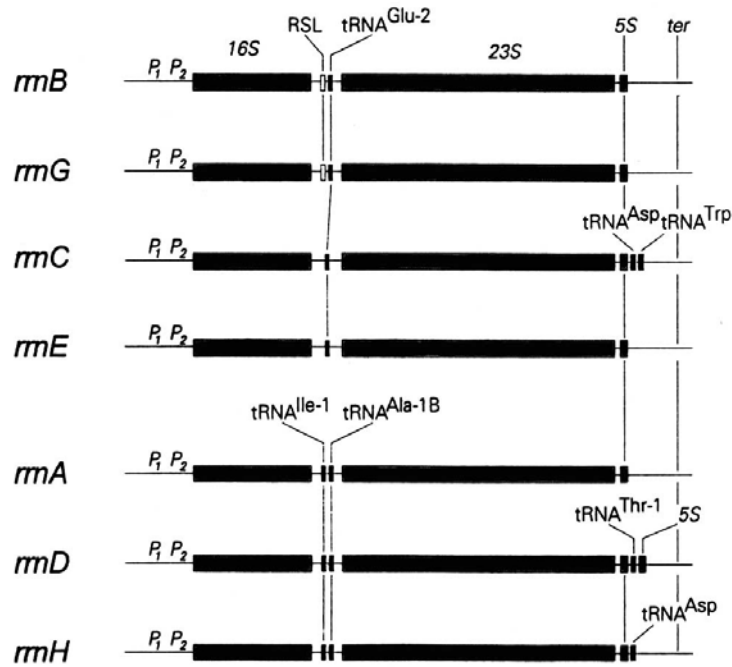
1.1. *rrn* operonide ehitus

Ribosomaalse RNA suure ja väikese subühiku geenid on organiseerunud 7 operoniks - *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* ja *rrnH* (Lindahl & Zengel, 1986). Operonidesse koondumine tagab rRNA sünteesi võrdses koguses ja ühtse kontrolli transkriptsiooni üle.

Kõikidel *rrn* operonidel on üldjoontes väga sarnane ehitus: [tandeemsed promootorid P1 ja P2] - [16S rRNA] - [vaheala] - [tRNA] - [vaheala] - [23S rRNA] - [5S rRNA] - [tandeemselt paiknevad terminaatorid T1 ja T2] (joonis 1). 16S rRNA ja 23S rRNA vahel võib sõltuvalt operonist asuda kas üks või kaks tRNA-d. Varieeruv on ka 5S rRNA ja tRNA geenide arv 23S rRNA järel (Lindahl & Zengel, 1986). Speisseralasiid nimetatakse järgnevalt: promootorite ja 16S rRNA vaheline piirkond on liiderregioon, 16S rRNA ja tRNA vahel asub ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*), tRNA ja 23S rRNA vahel ITS2 ning ITS3 seob 23S rRNA-d ja 5S rRNA-d.

Arvatakse, et 7 rRNA operoni olemasolu on hädavajalik rakkude kiireks kohanemiseks uute keskkonnatingimustega. Selle illustreerimiseks sobib Condoni ja kaastöötajate poolt läbi viidud eksperiment *E. coli* metsik-tüüpi rakkudega ning rakkudega, millel oli inaktiveeritud 1-4 *rrn* operoni (Condon et al., 1995).

Neid rakke kasvatati minimaalsöötmel logaritmilise kasvufaasi alguseni, lisati siis söötmesse toitaineid ja mõõdeti aega, mis kulus rakkudel uuesti logaritmilise kasvu saavutamiseks. Selgus, et mida rohkem *rrn* operone oli inaktiveeritud, seda rohkem aega kulus rakkudel ka uuesti logaritmilise faasi saavutamiseks (Condon et al., 1995).



Joonis 1. Seitsme *E. coli* rrn operoni struktuur. P1 ja P2 on tandeemsed promootorid, 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA ja tRNA geenid on tähistatud kastidega, samuti sekundaarstruktuuri element RSL (*ribosomal spacer loop*) (Condon et al., 1995).

1.2. Esmane rRNA protsessimine

Prokarüootides transkribeeritakse rRNA pika 30S eellasmolekulina, mis sisaldab funktsionaalseid geeniprodukte – 16S, 23S ja 5S rRNA ning tRNA(d)- ja nendega külgnevaid lisajärjestusi.

E. colis on rRNA protsessimine kiire ja enamus rRNA-st on lõplikult protsessitud, vaid 1-2% rakkudes olevast rRNA-st esineb pika prekursonina (King & Schlessinger, 1983). Protsessimine on mitmeetapiline: primaarse protsessingu tulemuseks on vahepealsete prekursorrRNAde moodustumine pikast transkriptist, valmimise etapis toimub rRNA kühsete otste moodustumine prekursorist.

Metsiktüüpi rakkudes algab rRNA protsessimine enne kui transkriptsioon *rrn* operonilt on lõpetatud (King & Schlessinger, 1983). RNAasIII eraldab p16S rRNA, p23S rRNA, ptRNA ja p5S rRNA. RNAas III lõikab kaheahelalisi RNA struktuure, mis moodustuvad 16S ja 23S rRNA

geenidega külgnevate järjestuste tulemusena (Bram et al., 1980; Young & Steitz, 1978).

1.3. 23S rRNA protsessimine

23S rRNA valmimiseks on hädavajalik esmane 30S rRNA lõikamine RNAasIII poolt, selle ensüümi puudumisel 23S rRNA valmimine ebaõnnestub (King et al., 1984). RNAas III⁻ tüvedes esineb 23S rRNA prekursorite, mille 5'otsas on 20-97 lisanukleotiidi, heterogeenne populatsioon (King et al., 1984).

RNAas III lõikamise tagajärjel moodustuvad protsessingu intermediaadid, mille 3'otsas on 7 kuni 9 lisanukleotiidi ja 5'otsas on 3 või 7 lisanukleotiidi (Bram et al., 1980). Arvatakse, et 3'otsa lisanukleotiidid eemaldatakse eksonukleolüütiliselt (Sirdeshmukh & Schlessinger, 1985), kuid 5'otsa valmimine toimub tõenäoliselt endonukleolüütiliselt ja vajab valgusünteesile sarnaseid tingimusi (King et al., 1984; Srivastava & Schlessinger, 1988).

23S rRNA 3'otsa valmimise eest vastutab RNAasT (Li et al., 1999a), RNAasT puudumisel akumulieruvad *in vivo* 23S rRNA 3'prekursorid. Puhastatud RNAasT on võimeline täpselt ja efektiivselt lõpetama 23S rRNA valmimise protsessi ka *in vitro* (Li et al., 1999a). Kuna RNAasT⁻ tüves akumulieruvad 23S rRNA prekursorid on lühemad kui algused RNAas III lõikamise produktid, peavad 23S rRNA 3'otsa lühenemisel RNAasT⁻ tüves osalema teised eksoribonukleaasid (Li et al., 1999a). RNAasT lõikab efektiivsemalt ja täpsemalt ribosomaalsete partiklite koosseisus olevat rRNA-d (Li et al., 1999a). Seega on rRNA protsessimisel olulisteks faktoriteks rRNA õige konformatsioon ja/või interaktsioon ribosomaalsete valkudega.

23S rRNA 5'otsa valmimise eest vastutavat ensüümi pole veel identifitseeritud, kuid on lokaliseeritud RNAas III lõikamissaidid 3 ja 7 nukleotiidi 23S rRNA 5'otsast ülesvoolu (Sirdeshmukh & Schlessinger, 1985; Liiv & Remme, 1998). Kui töödelda RNAas III⁻ tüvest eraldatud 70S ribosome ja 50S subühikuid RNAas III-ga, siis on suurem osa 23S rRNA-st lõigatud positsioonist -3. Ribosoomidest või subühikutest fenooliga eraldatud ning

samuti ka *in vitro* sünteesitud rRNA puhul toimub lõikamine RNAas III-ga positsioonis –7 (Allas et al., 2003). Tõenäoliselt juhib lõikamist positsioonis –3 RNAas III seondumine ribosoomile pärast seda kui 50S subühikud on juba assambleerunud (Allas et al., 2003). RNAas III seondub nii 70S ribosoomidele, kui ka 50S ja 30S partiklitele, kuid tema afiinsus 70S ribosoomide suhtes on suurem (Allas et al., 2003).

1.4. 16S rRNA protsessimine

30S prekursor molekuli lõikamisel RNAas III poolt moodustub 16S rRNA prekursor suurusega 17S, mille 5' otsas on 115 lisanukleotiidi ja 3' otsas on 33 lisanukleotiidi (Young & Steitz, 1978).

16S rRNA 5'otsa 115 lisanukleotiidi eemaldamisel osalevad RNAas E ja RNAas G (varem oli nimetuseks CafA) ühiselt (Li et al., 1999b). Kuna kumbki ensüüm ei tööta efektiivselt teise puudumisel, on välja pakutud 5'otsa valmimise kahe etapiline järjestikuline mudel (Li et al., 1999b). Esmalt lõikab RNAasE 17S rRNA 5'otsa genereerides produkti, millel on 66 lisanukleotiidi. Järgmises kiires reaktsioonis lõikab RNAasG lühenenud molekuli 5'otsast, mille tulemuseks on küps 16S rRNA 5'ots (Li et al., 1999b). RNAasG puudumisel akumulereerub produkt, millel 5'otsas on 66 lisanukleotiidi (Li et al., 1999b). Tingimustes, kus RNAasE lõikamist ei toimu, lõikab RNAasG ikkagi 17S rRNA 5'otsa, kuid reaktsioon on palju ebaefektiivsem ja 16S rRNA valmimine on jälgitav vaid madalal tasemel (Li et al., 1999b). RNAasG puudumisel on RNAasE võimeline genereerima mõned molekulid küpse 5'otsaga, kuid jällegi on reaktsioon aeglane ja lisaks moodustuvad sellel juhul ka mittekorrektset protsessitud 16S rRNAid, mille 5'otsas on 4 või 5 lisanukleotiidi (Li et al., 1999b).

16S rRNA 3'otsa valmimine sõltub mingil määral 5'otsa protsessingu efektiivsusest (Li et al., 1999b). Kui 16S rRNA küpse 5'otsa moodustumine on aeglustatud või täielikult blokeeritud, on küpse 3'otsa moodustumise tase alanenud (Li et al., 1999b). Kuna 16S rRNA küpse 3'otsast ja +33 3'otsast vahepealse pikkusega intermediaate pole täheldatud isegi kui 3'otsa

protsessimine on aeglustatud, siis tõenäoliselt viib 3'otsa valmimist läbi senitundmatu endonukleas (Li et al., 1999b).

2. Prokarüootse ribosoomi assambleerumine

2.1. Assambleerumine *in vivo*

Bakteri kuivmassist moodustavad 30% ribosoomid (Tissieres et al., 1959 - nagu viidatud Nierhaus, 1991), lisaks kasutatakse 40% rakkude poolt produtseeritud energiast ribosoomide biogeneesis (Nierhaus, 1991).

E.coli ribosoomide moodustumine hõlmab kolme ribosoomaalse RNA ja 54 valgu koordineeritud sünteesi, rRNA-de protsessimist ja modifitseerimist (algab juba transkriptsiooni käigus ja lõpetatakse ribosoomides) ning rRNA ja valkude assambleerumist funktsionaalseteks subühikuteks. Ribosoomide assambleerumine *in vitro* on iseseisev, see tähendab et põhimõtteliselt on kogu assambleerumiseks vajalik informatsioon peidus r-valkudes ja rRNAs.

30S subühiku assambleerumisel *in vivo* esineb kaks eellaspartiklit: p_{130} ja p_{230} (Lindahl, 1975). p_{130} partiklites on rRNAle seondunud ligikaudu pooled S-valkudest ning antud partikli sedimentatsiooni koefitsent on 21S (Nierhaus et al, 1973). Funktsionaalselt inaktiivne p_{230} sisaldab kogu S-valkude komplekti, erinedes 30S subühikust vaid lõplikult protsessimata 16S rRNA (sisaldab pikemaid 5' ja 3' otsi) poolest.

50S subühiku *in vivo* assambleerumisel esineb kolm eellaspartiklit: p_{150} , p_{250} ja p_{350} , sedimentatsiooni koefitsentidega vastavalt 34S, 43S ja lähis-50S (Lindahl, 1975). Viimane prekursor sisaldab kõiki L-valke ja on metüleerivates tingimustes aktiivseks 50S subühikuks konverteeritav.

Kõige rohkem on rakus leitud p_{350} ja p_{230} eellaspartikleid, 70% totaalsest p23S rRNAst ja 80% p16S rRNAst asub nendes partiklites (Lindahl, 1975). Seega kulub enamuse ribosoomi assambleerumiseks vajaminevast ajast etapis, kus eellaspartiklid on saavutanud oma lõpliku sedimentatsiooni koefitsendi (Lindahl, 1975).

Tõenäoliselt esineb ribosoomide assambleerumisrajas lisaks eelpool nimetatutele väikeses koguses palju erinevaid lühiealisi intermediaate, kuna nii paljude valkude samaaegne seondumine rRNAle tundub ebatõenäoline (Lindahl, 1975).

2.2 Assambleerumine *in vitro* ehk rekonstruktsioon

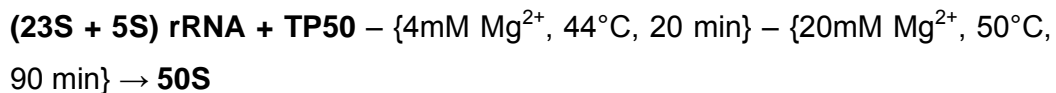
Tänu rekonstruktsiooni meetodile on saadud palju olulist informatsiooni ribosoomide assambleerumise kohta. Rekonstruktsioonil on võimalik puhastatud ribosoomaalsetest komponentidest saada funktsionaalseid ribosoomide. *In vivo* biogeneesis aitavad kõrget aktivatsioonienergiat ületada mitteribosomaalsed faktorid kuid *in vitro* rekonstruktsioon vajab selleks kõrget temperatuuri ja kõrget soolakontsentratsiooni. 1968. aastal rekonstrueerisid P. Traub ja M. Nomura esimestena ribosoomi 30S subühiku, 50S subühiku rekonstrueerisid 1974. aastal K. H. Nierhaus ja F. Dohme.

30S subühiku rekonstruktsioon on üheastmeline reaktsioon üle eellaspartikli RI (Traub & Nomura, 1968). Reaktsiooniskeem on järgmine:



16S rRNA ja TP30 inkubeerimine 0°C juures viib RI₃₀ partikli tekkeni. See partikkel peab läbi tegema konformatsioonilise muutuse RI₃₀*-ks ja selleks inkubeeritakse reaktsiooni segu 20 minutit 40°C juures (Traub & Nomura 1969). Seejärel saavad RI₃₀*-le 0°C juures seonduda ülejäänud S-valgud. RI₃₀ partikli valguline koostis on väga sarnane p₁30S-ga.

50S subühiku rekonstruktsioonil on 3 intermediaati: RI₅₀(1), RI₅₀*(1) ja RI₅₀(2) (Nierhaus & Dohme, 1974; Dohme & Nierhaus, 1976). Reaktsiooniskeem on kaheetapiline:



RI₅₀(1) ja RI₅₀*(1) sisaldavad samu komponente, kuid nende liikuvus sahharoosigradiendis on erinev. Hilise assambleerumisetapi valkude seondumiseks ja RI₅₀(2) moodustumiseks peab toimuma konformatsiooni muutus (Dohme & Nierhaus, 1976).

2.3. Assambleerumise initsiaatorvalgud

Vastavalt rollile ribosoomi rekonstruktsioonil on ribosoomi assambleerumise valgud jagatud kolme suurde rühma: assambleerumise initsiaatorvalgud, varased assambleerumise valgud ja hilised assambleerumise valgud.

In vitro andmetele põhinedes on assambleerumise initsiaatorvalgud defineeritud kui ribosomaalsed valgud, mis suudavad individuaalselt siduda rRNA-d ja on olulised aktiivse ribosoomi subühiku formeerumiseks (Nowothy & Nierhaus, 1982). Peaaegu 2/3 ribosoomi valkudest on rRNA-d siduvad, kuid *E.coli* ribosoomi suurelt subühikult leiti ainult kaks assambleerumise initsiaatorvalku (L3 ja L24) ja väikselt subühikult samuti kaks (S4 ja S7) (Nierhaus, 1991). Kaks on optimaalne arv initsiaatorvalkude jaoks, tingimustes, kus vaba rRNA on suures ülehulgas ja oleks ainult üks initsiaatorvalk, võtaksid kõik r-valgud osa aktiivsete partiklite moodustamisest ja ei jätkuks vabu valke reguleerivate ülesannete täitmiseks (Nierhaus, 1991). Kui initsiaatorvalke oleks liiga palju, tekiks palju poolikuid partikleid, mis ei ole suutelised lõpuni valmima, kuna puudub assambleerumiseks piisav kogus ribosomaalseid valke (Nierhaus 1991).

Suurema subühiku puhul on näidatud, et madalatel temperatuuridel võib valgu L24 puudumisel valk L20 võtta üle valgu L24 assambleerumise initsiaatorvalgurolli kusjuures L3 jääb endiselt teiseks initsiaatorvalguks (Franceschi and Nierhaus, 1988). Kui ainult L3 on efektiivne initsiaatorvalk (L24 puudumisel, temperatuuril 44°C), väheneb aktiivsete 50S subühikute valmimine 10 protsendile (Franceschi and Nierhaus, 1988).

2.4. Varajased assambleerumise valgud

Rekonstruktsiooni intermediaatide $RI_{50}^*(1)$ ja RI_{30}^* formeerumise eest vastutavad varajased assambleerumise valgud.

Puhastatud komponentidega rekonstruktsioonianalüüsil leiti, et valgud L4, L13, L20, L22 ja L24 on vajalikud ja piisavad $RI_{50}^*(1)$ moodustumiseks (Spillmann et al., 1977). Initsiaatorvalk L3 omab stimuleerivat rolli, samas

kui teised valgud ja 5S rRNA ei ole vajalikud. Nende valkude sidumissaidid asuvad 23S rRNA 5'otsa läheduses (Nierhaus, 1991) ja nad on võimelised seostuma enne antud molekuli sünteesi lõpetamist.

Ribosoomi 50S subühiku valgud assambleeruvad üksteise järel rRNAga juba rRNA sünteesi ajal - see nähtus andis aluse assambleerumise gradiendi (*assembly gradient*) hüpoteesile: rRNA sünteesi progress dikteerib assambleerumise progressi (Nierhaus, 1991). Pakkimine *in vivo* algab juba suhteliselt lühikese rRNA-ga, kuid *in vitro* rekonstruktsioonis on valmis sünteesitud 23S rRNA-le koheselt kättesaadavad kõik 23 L-valku. See võib olla ka põhjuseks, miks 50S subühiku assambleerumine *in vitro* nõuab 1,5 tunnist inkubeerimist 50° C juures, aga *in vivo* toimub ribosoomi biogenees mõne minutiga 37°C juures (Nierhaus, 1991).

RI₃₀st RI₃₀*ks transformatsiooni eest vastutavad valgud on S4, S7, S8 ja S19 (Held & Nomura, 1973). Assambleerumise gradienti pole 30S subühiku puhul täheldatud (Nierhaus, 1991).

2.5. 50S subühiku hilised assambleerumise komponendid

Kitsamas mõistes on hilised assambleerumise komponendid 50S subühiku komponendid, mis mängivad otsustavat rolli assambleerumise hilises protsessis, vaatamata sellele kas nende lisamine on oluline struktuuri stabiliseerimisele ja/või osalevad nad otseselt ribosoomi funktsioonides.

Leitud on ainult kaks hilist assambleerumise valku - L15 ja L16 (Franceschi & Nierhaus, 1990). Kumbki valk eraldi kiirendab assambleerumist 2 - 4 korda, kuid lisaks käituvad need valgud sünergistlikult, suurendades assambleerumise kiirust 20 korda (Nierhaus, 1991).

Siaa gruppi kuulub ka 5S rRNA. On näidatud, et 5S rRNA seondub r-valkudega L18 ning L5 veel enne ribosoomidesse inkorporeerumist. Siiski on aktiivseid partikleid võimalik konstrueerida ka ilma 5S rRNA-ta. 50S subühiku rekonstruktsioon ilma 5S rRNA-ta põhjustab assambleerunud subühikute peptidüültransferaasse aktiivsuse olulist vähenemist. Seda aktiivsust võivad osaliselt taastada ribosoomile suunatud antibiootikumide nagu makroliidid,

ketoliidid või B grupi streptogramiin lisamine rekonstruktsioonisegusse (Khaitovich et al., 1999).

3. Klooramfenikooli mõju ribosoomide assambleerumisele

3.1. Klooramfenikool

Klooramfenikool avastati 1947. aastal, seda produtseeriva *Streptomyces venezuelae* kultuurist. Klooramfenikool inhibeerib valgu biosünteesi, seondudes ribosoomi suurema subühiku peptidüültransferaasesse tsentrisse.

Klooramfenikool ei sega tRNA fragmendi seondumist peptidüültransferaasse tsentri P saiti, kuid võistleb tRNA seondumisega A saiti, samuti puromütsiiniga (Spahn & Prescott, 1996). Arvatakse, et klooramfenikool inhibeerib peptidüültransferaasset reaktsiooni segades tRNA 3'-CCA seondumist katalüütilisse tsentrisse ilma tRNA seondumist nõrgendamata. (Spahn & Prescott, 1996). Osa klooramfenikooli molekulist võib lisaks mimikeerida peptiidsidet (Vester & Garrett, 1988).

Kui antibiootikum-ribosoom kompleksi töödelda modifitseerivate kemikaalidega, kaitseb klooramfenikool 23S rRNA lämmastikaluseid A2059, A2062, A2451, G2505 ja suurendab A 2058 aktiivsust (Moazed & Noller 1987). Kõik need nukleotiidid asuvad domeen V tsentraalses lingus. Mutatsioonid, mis vahendavad klooramfenikooli resistentsust, asuvad nende saitide läheduses positsioonides 2057, 2451, 2452, 2447, 2503 ja 2503 (Cundliffe, 1990) kuid mutatsioonid G2505C ja G2583U/C põhjustavad hüpersensitiivsust klooramfenikooli vastu *in vitro* translatsiooni süsteemides (Saarma & Remme, 1992).

Resistentsust antibiootikumi ensümaatilise inaktivatsiooni läbi vahendab tavaliselt klooramfenikoolatsetüültransferaas (CAT). CAT modifitseerib klooramfenikooli seda atsetüleerides, produktiks on 3-O-atsetüül-klooramfenikool, mis seondub ribosoomiga väga nõrgalt ja ei oma antibiootilist aktiivsust (ülevaateks vt. Murray & Shaw, 1997)

3.2. "Klooramfenikooli partiklid"

Kõrge klooramfenikooli kontsentratsiooni juures (100 µg/ml) akumuleerub suur osa rRNA-st mittetäielike ribosomaalsete partiklitena (nn "klooramfenikooli partiklid"), olulisel määral ilmneb ka varem valmis sünteesitud ribosoomide degradatsiooni (Nomura & Watson, 1959).

rRNA/valguga suhe nendes partiklites on varieeruv ja tavaliselt suurem kui sama suhe valminud ribosoomis (Nomura & Watson, 1959, Dagley & Sykes, 1959, Hosokawa & Nomura 1965, Yoshida & Osawa, 1968). Klooramfenikooli partiklid kaovad kiirelt, kui antibiootikum on kultuurist eemaldatud ja partiklites akumuleerunud prekursor rRNA konverteeritakse normaalseks 30S ja 50S subühikuteks ilma eelneva lagundamiseta (Nomura & Hosokawa 1965). Seega viitavad tõendid sellele, et rRNA, mis inhibitsiooni ajal akumuleerub on peatatud, rRNA normaalne prekursorvorm (Sykes et al., 1977). Suurem osa partiklite valgulistest komponentidest tundub olevat sünteesitud enne kui antibiootikumi inhibitsioon algab (Kurland & Maaoe, 1962; Hosokawa & Nomura 1965, Yoshida & Osawa, 1968).

1960ndate lõpus ja 1970ndatel uuriti intensiivselt, kas "klooramfenikooli partiklid" on artefakt või võiksid nad olla ribosomaalsete partiklite prekursorid. Võimalik, et kõrge klooramfenikooli kontsentratsiooni juuresolekul sünteesitud rRNA eksisteerib rakus vaba rRNA ja "klooramfenikooli partiklite" valgud kombineeruvad rRNAga "kunstlikult" ekstraktsiooni käigus (Yoshida & Osawa, 1968). Kui töödelda kasvavaid rakke madala klooramfenikooli kontsentratsiooniga (1 µg/ml), on rakkude kasv vaid osaliselt inhibeeritud ja mittetäielike partiklite süntees on märgatav kõrvuti normaalsete ribosoomi subühikutega (Osawa et al., 1969). Seega täheldati, et madala klooramfenikooli kontsentratsiooni juures sünteesitud partiklid ei ole samasugused artefaktid kui on väidetavalt kõrge antibiootikumi kontsentratsiooni juures sünteesitud partiklid (Osawa et al., 1969).

Oli levinud ka seisukoht, et sarnased partiklid võiksid esineda normaalsel ribosoomide biosünteesil (Kurland et al., 1962; Hosokawa & Nomura, 1965). Meetodite arenedes hakati rohkem uurima klooramfenikooli

partiklite valgulist koostist ja leiti, et see sarnaneb ribosomaalsete subühikute omaga (Sykes et al., 1977), seega jäi viimane seisukoht enam levinuks.

3.3. rRNA ja ribosoomi valkude süntees klooramfenikooli juuresolekul kasvavates rakkudes

On levinud arvamus, et kui töödelda rakke klooramfenikooli või teiste sobivate valgusünteesi inhibiitoritega, on rRNA süntees stimuleeritud (Kurland & Maaløe, 1962). Kasvatades rakke 100 µg/ml klooramfenikooli juuresolekul tõuseb rRNA ja tRNA sünteesi tase kaks kuni kaheksa korda, rRNA-d ja tRNA-d sünteesitakse suhteliselt samas proportsioonis (85:15) kui eksponentsiaalses kasvufaasis olevates rakkudes (Shen & Bremer, 1977). Samas väheneb klooramfenikooliga töödeldud rakkudes mRNA sünteesi hulk (Shen & Bremer, 1977).

Vastupidiselt varem ilmunud töödele (Dennis, 1976; Kurland et al., 1962; Shen & Bremer, 1977) leidsid R. J. Harvey ja A. L. Koch, et totaalse rRNA süntees on inhibeeritud (Harvey & Koch, 1980). Nad pakkusid välja, et klooramfenikoolist tingitud rRNA akumulatsioon võib olla tingitud klooramfenikooli pidurdavast mõjust rRNA küpsemisele, mistõttu toimub vastsünteesitud rRNA suurenenud degradatsioon statsionaarses kasvufaasis (Harvey & Koch, 1980). Seega täheldati rRNA valmimise inhibitsiooni teise klooramfenikooli mõjuna rRNA sünteesile (Harvey & Koch, 1980). Klooramfenikooli juuresolekul toimub valgusüntees ainult polüribosoomides, mis sisaldavad üksnes küpset rRNA-d (Harvey & Koch, 1980). rRNA valmimise inhibitsioon on tõenäoliselt valgusünteesi inhibitsiooni kaudne tagajärg, kuna ei sünteesita piisavalt ribosomaalseid valke, et konverteerida kõik 16S rRNA eellasmolekulid 27S ribosomaalsesse prekursorpartiklitesse, mis on vajalik 16S rRNA küpsemiseks (Harvey & Koch, 1980).

Tingimustes, kus klooramfenikooli tõttu on stimuleeritud rRNA sünteesi tase, on stimuleeritud ka r-valkude erinev sünteesi tase (Dennis, 1976). Selle põhjuseks võiks olla rRNA sünteesi tagasisidestusmehhanismi toimumine. On teada, et paljud r-valkude operonid on reguleeritud translatsiooni repressor r-valkude poolt. rRNA sünteesi stimuleerimine peaks eemaldama need r-

valgud, millest enamus seonduvad rRNA-le otse, põhjustades derepressiooni r-valkude sünteesil nendelt operonidelt. Seda oletust on eksperimentaalselt tõestatud mitmete r-valkude operonide kohta (Yamagishi & Nomura, 1988).

On teada, et vähemalt mõned r-valkudest degradeeritakse kiiresti, kui nad sünteesitakse tingimustes, kus rRNA on ülehulgas (Dodd et al., 1991). Oletatavasti võivad mõned vabad r-valgud olla eriti tundlikud proteolüütilisele degradatsioonile (Fallon et al., 1979). Võimalik, et lagundatakse r-valke, mis ei suutnud ribosomaalsesse partiklisse inkorporeeruda (Dodd et al., 1991).

4. 50S subühiku biogeneesi mõjutavad antibiootikumid

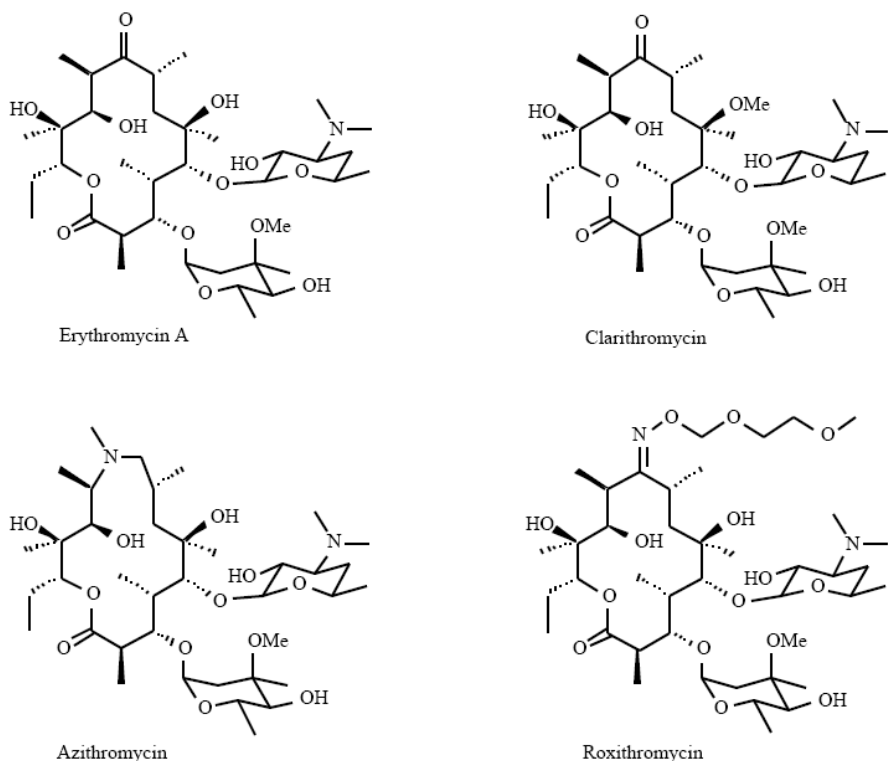
4.1. Erütromütsiini mõju 50S subühiku assambleerumisele *Escherichia coli* rakkudes

Erütromütsiin A on esimene kliinilises praktikas kasutatud makroliidide hulka kuuluv antibiootikum. Erütromütsiin interakteerub peptidüültransferaasse aktiivsusega seotud 50S subühiku komponentidega (Vogel et al., 1971). Erütromütsiin A ja teised makroliidide klassi kuuluvad antibiootikumid on makrolaktoonsed ühendid ehk 14-, 15-, 16-ühikulised ringstruktuurid, millele on kinnitunud amino- ja neutraalsed suhkru kõrvalahelad (joonis 2).

H. S. Chittum ja W. S. Champney pakkusid välja, et erütromütsiin võiks lisaks translatsiooni häirimisele põhjustada ka 50S subühiku assambleerumise spetsiifilist inhibitsiooni (Chittum & Champney, 1995). Kasvatades rakke erütromütsiini juuresolekul ja märkides RNA-d ^3H uridiiniga, nägid nad vabade 50S subühikute hulga vähenemist, kusjuures vabade 30S subühikute hulk jäi samale tasemele ning uute partiklite teket sahharoosgradiendi profiilil ei täheldatud.

Kuna 50S subühiku assambleerumisdefekt on olulisest vähenenud erütromütsiini resistentsetes tüvedes, kus olid muteerunud L4 ja L22 valgud, tundub tõenäoline, et need valgud võiks osaleda selle antibiootikumi seondumisel 50S subühikuga (Chittum & Champney, 1995).

Pakuti välja, et erütromütsiin segab L4 valgu seondumist 23S rRNAle assambleerumise varases etapis, mille tagajärjeks võiks olla 23S rRNA degradatsioon ja 23S rRNAst oligonukleotiidide akumulatsioon rakus (Chittum & Champney, 1995). Selle mudeliga kooskõlas on ka tulemused: erütromütsiiniga töödeldud rakkudes ei märgatud 50S subühiku prekursorit uue piigina sahharoosigradiendil, kuid täheldati ülemäärast radioaktiivsust ^3H -ga märgitud gradiendi kergemas osas.



Joonis 2. Nelja 14-liikmelise makroliidi struktuur.

RNAasE mutantses tüves on subühikute assambleerumine suuremal määral mõjutatud kui metsiktüüpi tüves, nimelt märgati sahharoosgradiendil 25S ja 30S partikleid, 50S subühikute hulk oli oluliselt vähenenud (Usary & Champney, 2001). Leiti, et nii metsiktüüpi tüves kui RNAasE mutantses tüves esineb 30S regioonis nii 16S kui 23S rRNA-d. 23S rRNA-d leiti ka gradiendi ülemistes regioonides, mis võiks olla prekursorpartiklite RNA degradatsiooni tulemuseks (Usary & Champney, 2001). 50S subühikute prekursorite akumulatsioon RNAasE mutantses tüves võiks olla põhjustatud sellest, et metsiktüüpi tüves on RNAasE oluline peatunud 50S assambleerumise intermediaatide degradatsioonil (Usary & Champney, 2001).

J. Usary ja W. S. Champney pakkusid välja mudeli 50S subühiku assambleerumise inhibitsiooni kohta (Usary & Champney, 2001). Erütromütsiini juuresolekul saab mingi hulk valmivatest 50S subühikutest vältida assambleerumise inhibitsiooni ja küpsevad normaalselt 50S partikliteks. Need partiklid on võimelised siduma erütromütsiini ja seejärel inhibeerima translatsiooni. Samas, mingi osa valmivatest 50S subühikutest

seob erütromütsiini ja nende assambleerumine ebaõnnestub. Need peatatud assambleerumise intermediaadid on substraadiks ribonukeaasidele nagu RnaasE (Usary & Champney, 2001).

Eelpool mainitud artiklite autorid peavad oluliseks antibiootikumide aktiivsuse eest vastutava struktuur-funktsiooni seoste uurimist (Usary & Champney, 2001). Omandatud informatsioon võiks viia uute ratsionaalselt disainitud antibiootikumide arendamiseni (Usary & Champney, 2001). Vastupidiselt valgusünteesi inhibeerivale bakteriostaatilisele efektile võiks kõrgel määral bakteriotsiidseks osutada antibiootikumid, mis seonduvad eelistatult 50S prekursoritele ja peatavad efektiivselt ribosoomide assambleerumise märklaud rakkudes (Usary & Champney, 2001).

4.2. Makroliide mõju 50S subühiku assambleerumisele *Staphylococcus aureuse* rakkudes

1995. aastal avaldatud töös näitasid W. S. Champney ja R. Burdine, et makroliidid inhibeerivad 50S subühiku formeerumist ka *Bacillus subtilise* ja *Staphylococcus aureuse* rakkudes (Champney & Burdine, 1995). Selles töös järeldati, et makroliidide efekt ribosoomide assambleerumisele on väga spetsiifiline: seitse sarnast ühendit mõjutavad assambleerumist *S. aureuse* rakkudes, ainult kolm uuritud ühenditest *B. subtilise* rakkudes ja kaks *E. coli* rakkudes (Champney & Burdine 1995; Chittum & Champney 1995). Oluliseks tõendiks makroliide teise sihtmärgi, 50S subühiku assambleerumise inhibitsiooni, olemasolu kinnitamisel peeti tähelepanekut, et assambleerumist saab ennetada ka erütromütsiini resistentsetes tüvedes: *E. coli* kahes ribosoomi valgu mutandis ja *B. subtilise ermC* tüves (Champney & Burdine 1995; Chittum & Champney 1995).

Asitromütsiin ja klaritromütsiin (joonis 2) on erütromütsiini derivaadid, millel on suurem hapestabiilsus, neid kasutatakse põhiliselt Gram-positiivsete mikroorganismide poolt põhjustatud nakkushaiguste ravil. On näidatud, et translatsiooni inhibitsioon ja 50S subühiku biosünteesi inhibitsioon on ekvivalentsetes sihtmärgid nii erütromütsiini kui ka asitromütsiini ja klaritromütsiini puhul *S. aureuse* rakkudes (Champney & Burdine, 1996;

Champney & Burdine, 1998a). Kvantitatiivselt on nendes rakkudes parim inhibiitor klaritromütsiin, erütromütsiin on veidi vähem efektiivne, kuid asitromütsiin oluliselt vähem efektiivne (Champney & Burdine, 1998a).

Et erinevust makroliide aktiivsuses siduda erinevusega nende molekulide struktuuriga, viidi läbi katsed, kus üheksa erineva makroliidi aktiivsust uuriti samal kontsentratsioonil (Champney & Burdine, 1998b). Klaritromütsiin oli kõige efektiivsem inhibiitor nii valgusünteesil kui 50S subühiku assambleerumisel (Champney & Burdine, 1998b). Klaritromütsiin oli ka ainus uuritud antibiootikumidest, millel oli efekt 30S subühikute hulga vähenemisel (Champney & Burdine, 1998b).

Postantibiootiline efekt (PAE) kirjeldab aega, mis on vajalik rakkude inhibitsioonist paranemiseks pärast antibiootikumi töötlust. PAE sõltub sellest, kui kaua on rakk olnud antibiootikumidele eksponeeritud ja kui suur on antibiootikumi kontsentratsioon. Nii erütromütsiini kui ka klaritromütsiini puhul paranes translatsiooni võime aeglasemalt kui uute 50S partiklite süntees (Champney & Tober, 1999). Sellest järeldati, et täiskomplekt funktsionaalseid ribosoomi subühikuid on vaja rakkude toibumiseks enne kui maksimaalne translatsiooni võimekus taastub (Champney, 2003).

4.3. Makroliidide mõju 50S subühiku assambleerumisele *Haemophilus influenzae* rakkudes

Haemophilus influenzae valgusüntees on erütromütsiini poolsünteesilisele derivaadile asitromütsiinile neli korda tundlikum kui erütromütsiinile (Champney & Miller, 2002a). Asitromütsiini puhul on valgusünteesi inhibitsioon ja ribosoomi 50S subühiku assambleerumise inhibitsioon ekvivalentseid sihtmärgid, kuid erütromütsiini puhul tundub valgusüntees olema tähtsam inhibitsiooni sihtmärk (Champney & Miller, 2002a). Nendest tulemustest järeldati, et asitromütsiin seondub 50S subühikutele ja assambleerumise intermediaatidele võrdse afiinsusega, kuid erütromütsiini interaktsioon 50S subühikuga on tugevam kui asambleerumise intermediaadiga (Champney & Miller, 2002a).

Asitromütsiiniga sarnaselt käitub ka klaritromütsiin, mis inhibeerib samuti 50S subühiku sünteesi ja valgusünteesi ekvivalentselt, kuigi kümme korda suurema kontsentratsiooni juures (Mabe et al., 2004). Fluritromütsiin ja roksitromütsiin, mis on samuti erütromütsiini poolsünteesilised derivaadid, inhibeerisid eelistatult 50S subühiku sünteesi, kusjuures ka 30S subühiku süntees oli vähenenud (Mabe et al., 2004). Nendest tulemustest järeldati, et makroliidide interaktsioon 50S subühiku prekursoritega assambleerumise peatamiseks võib erineda *H. influenzae* varem täheldatud efektidest *E. coli* rakkudes (Mabe et al., 2004).

4.4. 16 –liikmelise makroliidide, linkosamiidide ja streptogramiin B mõju 50S subühiku assambleerumisele *Staphylococcus aureus* rakkudes

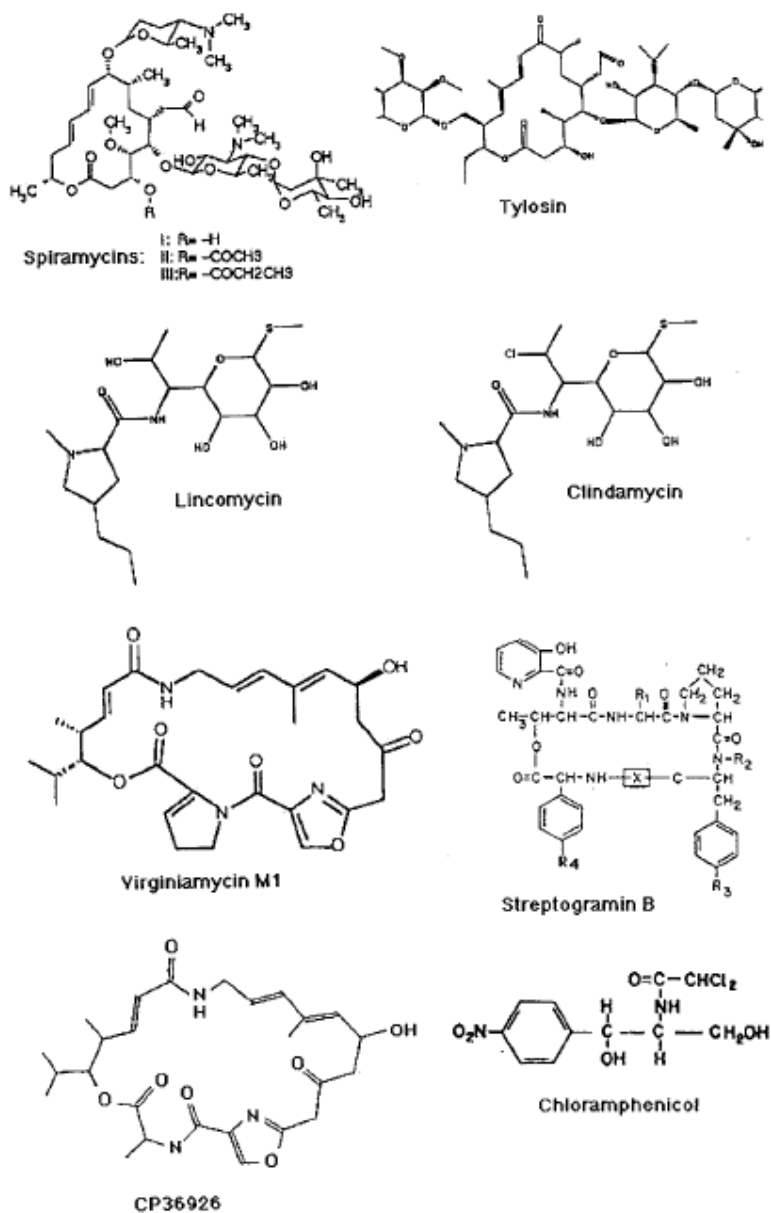
16-liikmelised makroliidid nagu spiramütsiin ja tülosiin, erinevad 14-liikmelistest makroliididest nagu erütromütsiin selle poolest, et neil on kaks lisa ringi süsiniku aatomeid ja erinevad suhkru kõrvalahelad (Kirst, 1994; joonis 3).

Linkosamiidid (nt. linkomütsiin ja klindamütsiin) sisaldavad ühendatud 5- ja 6-liikmelisi ringe koos hädavajalike väävlirühmadega ning interakteeruvad 50S partikliga samamoodi kui makroliidid (LeGoffic, 1985; joonis 3).

Streptogramiin antibiootikumid koosnevad A ja B tüüpi molekulidest, mis mõlemad on laiendatud ringstruktuurid ning oluliselt erinevad üksteisest ja makroliididest (joonis 3). Funktsionaalselt on streptogramiin B toime sarnane makroliidide ja linkosamiidide inhibitoorsele efektile (Chinali et al., 1988). Streptogramiin A omab oluliselt erinevat inhibitoorset aktiivsust translatsioonile, soodustades konformatsioonilist muutust ribosoomis (Chinali et al., 1984). A ja B streptogramiinide kombinatsiooni inhibitoorsed efektid avalduvad translatsioonile sünergistlikult (Cocito et al., 1997).

Nende kolme antibiootikumide tüübi vahel esineb palju sarnasusi: nad okupeerivad sarnaseid, kattuvaid, sidumiskohti 50S subühikus (Tejedor & Ballesta 1986), ühte klassi kuuluvate molekulide sidumist saab välja tõrjuda

teisse klassi kuuluvate molekulide ülehulgaga (DiGiambattista et al., 1987), resistentsusmutatsioon ühe ühendi vastu bakteri rakus võib omada ristresistentsust teiste klasside ühendite inhibitsiooni vastu (Leclercq & Courvalin, 1991).



Joonis 3. 16-liikmeliste makroliidide (spiramütsiinid, tülosiin), linkoosamiidide (linkomütsiin, klindamütsiin), streptogramiinide A (virginamütsiin M1, CP36926) ja B ning klooramfenikooli struktuurid.

16-liikmelised makroliidid, linkosamiidid ja streptogramiin B omavad sarnast inhibitoorset efekti ka 50S subühiku moodustumisele, ilma 30S subühiku sünteesi mõjutamata (Champney & Tober, 2000a).

Klooramfenikool, mis omab spetsiifilist inhibitoorset efekti ribosoomi peptidüültransferaassele aktiivsusele ja erineb inhibitoorse efekti poolest teistest uuritud antibiootikumidest, samuti streptogramiin A, omavad 50S ja 30S subühikutele võrdset inhibitoorset efekti (Champney & Tober, 2000a). Tõenäoliselt pole subühikute sünteesi inhibitsioon kummagi ühendi puhul spetsiifiline vaid on tingitud ribosoomi valkude sünteesi vähenemisest (Champney & Tober, 2000a).

4.5. Ketoliidide mõju 50S ja 30S subühiku assambleerumisele

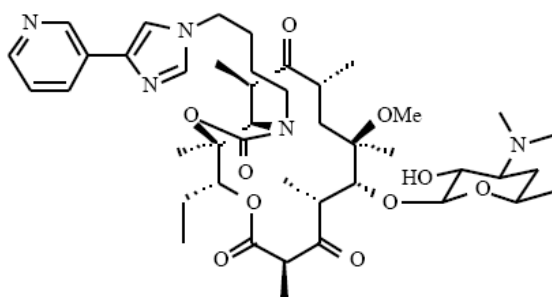
Ketoliidid on makroliidide sünteetilised derivaadid, milles on makrolaktoonringi kolmandas positsioonis asuv kladiinooos asendatud ketooni funktsiooniga (joonis 4). Lisaks sisaldavad nad sarnaselt klaritromütsiiniga 6-metoksü rühma. Nad seonduvad 50S partiklitele tugevamini kui makroliidid. Ketoliidid omavad olulist antibakteriaalset aktiivsust suure hulga Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete organismide vastu madalamal kontsentratsioonil kui makroliidid. Ketoliidid ei indutseeri *ermC* geeni ekspressiooni MLS_B tüvedes ja on efektiivsed kasvuinhibiitorid nendes resistentsetes organismides (Bonney et al., 1997). MLS_B fenotüüp on ristresistentsus kõigi kättesaadavate makroliidide, linkosamiidide ja grupp B streptogramiinide vahel.

Kui uuriti 11 ketoliidi mõju translatsioonile ja 50S subühiku assambleerumisele *S. aureuses*, siis 3 uuritud ühenditest (A22, A51 ja A53) omasid rakkudele nõrka inhibitoorset efekti, 3 (A11, A23 ja A52) ühendit omasid tagasihoidlikku inhibitoorset efekti ja 5 (A24, A54, A55, HMR3647 ja HMR3004) ühendit olid väga efektiivsed inhibiitorid (Champney & Tober, 1998).

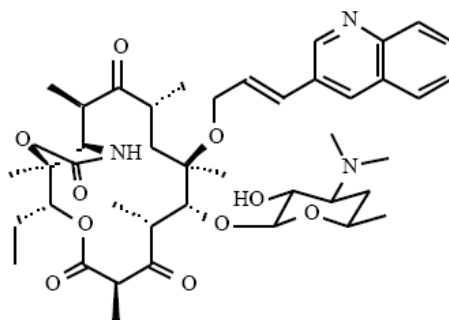
Viis efektiivsemat antibiootikumi alandasid rakkude kasvukiirust 8-10 korda. Lisaks 50S subühiku moodustumise vähenemisele märgati nende ketoliidide puhul ka 30S subühikute hulga vähenemist. 30S subühiku

formeerumise inhibitsiooni ei märgatud, kui kasutati ketoliidide kontsentratsiooni, mis põhjustas kasvukiiruse vähenemist 6 korda või alla selle (Champney & Tober, 1998).

Ühendite A54, A24, HMR3647 (telitromütsiin) ja HMR3004 suured aromaatsed kõrvalahelad andsid oluliselt edasi nende ühendite mõjukat inhibitoorset aktiivsust ja tegid need võrdseks või suuremaks inhibitsioonist, mida täheldati klaritromütsiini puhul samal kontsentratsioonil (Champney et al., 1998; Champney & Tober 1998). Nende ühendite aromaatsed ringid võiksid lubada tugevamat seondumist ribosoomi subühikule interkaleerudes RNA alustega või moodustades ribosoomaalsete valkude aromaatsete aminohapetega vesiniksidemeid (Champney & Tober, 1998). Kuna maksimaalne inhibitoorne efekt, mida täheldati ketoliidi A55 puhul, on unikaalne, tuleks uurida ka teisi ketoliidide omadusi (Champney & Tober, 1998).



Telithomycin (HMR-3647)



ABT-773

Joonis 4. Ketoliidide telitromütsiin (HMR-3647) ja ABT-773 struktuurid.

2001. aastal leidsid W. S. Champney ja C. L. Tober, et *S. aureuse* vastu on kõige optimaalsemad disainitud antimikroobsed ained ABT-773 ja HMR3004 (Champney & Tober, 2001). ABT-773 osutus efektiivseks ka *Streptococcus pneumoniae* rakkude kasvu inhibeerimisel (Champney & Pelt, 2002a), kuid kolm korda suuremal kontsentratsioonil kui telitromütsiin (HMR3647) (Champney & Pelt, 2002b). Arvatakse, et telitromütsiin ja sarnased ketoliidid esindavad uut poolsünteetiliste antimikroobsete ühendite põlvkonda, millel on kõrgem antibiootiline aktiivsus erinevate resistentsete mikroorganismide vastu (Champney & Pelt, 2002b).

4.6. Teised 50S subühiku inhibiitorid

Evernimitsiin

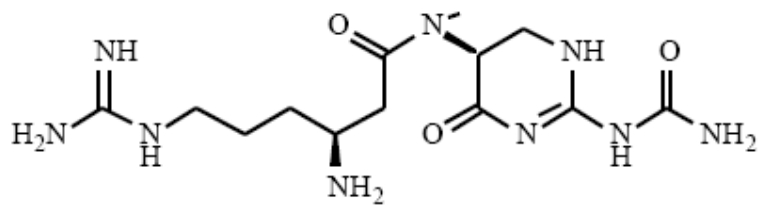
Evernimitsiinid on polüsahhariid-derivaadid, mis on isoleeritud mikroorganismist *Micromonospora carbonacea*. *S. aureuse* rakkudes on evernimitsiidide hulka kuuluv evernimitsiin (SCH27899) efektiivne madalatel kontsentratsioonidel (Champney & Tober, 2000b). Erinevalt varem uuritud makroliididest, leiti, et evernimitsiini eelistatud sihtmärk raku on translatsiooni inhibitsioon, 13 korda rohkem antibiootikumi tuli lisada söötmesse, et saavutada ekvivalentset 50S subühiku assambleerumise inhibitsiooni (Champney & Tober, 2000b).

TAN-1057A

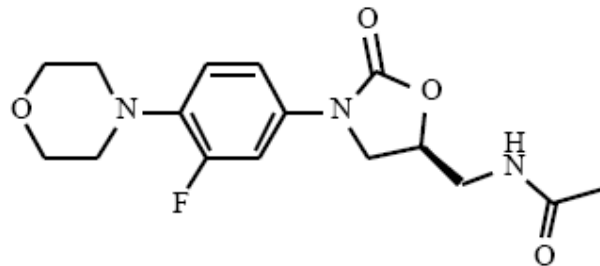
TAN-1057A on mikroorganism *Flexibacter sp.* poolt sünteesitav naturaalne antibakteriaalne valgusünteesi inhibiitor (joonis 5). Ka selle antibiootikumi puhul on näidatud rekkudes 50S subühiku assambleerumise defekti (Champney et al., 2001). Huvitavad on postantibiootilise efekti eksperimendi tulemused, valgusünteesi efektiivsuse ja rakkude arvukuse taastamiseks pärast antibiootikumi eemaldamist söötimest kulus rohkem aega, kui 50S partiklite hulga taastamiseks (Champney et al., 2001). Sellest järeldati, et antibiootikumi 50S subühikule seondumine võib olla kergemini pööratav kui prekursorile seondumine (Champney et al., 2001). Alternatiivselt võiksid inhibitsioonist vabanenud ribosoomid pühenduda eelitatult uute 50S subühiku valkude sünteesile, nii et kasv ei jätku enne, kui täielik komplekt 50S subühikuid on valminud (Champney et al., 2001).

Linesoliid

Oksasolidinoon ühend linesoliid on sünteetiline antimikroobne ühend, mis on efektiivne paljude Gram-positiivsete bakterite vastu, kaasa arvatud organismide vastu, mis on resistentsed metitsilliinile ja erütromütsiinile. On näitatud, et translatsiooni inhibitsioon ja 50S subühiku assambleerumise inhibitsioon on linesoliidi võrdsed sihtmärgid *S. aureuse* rakkudes (Champney & Miller, 2002b).



TAN1057A



Linezolid

Joonis 5. TAN-1057A ja linesoliidi struktuurid.

Eksperimentaalne osa

1. Töö eesmärk

Antibiootikumid klooramfenikool ja erütromütsiin inhibeerivad ribosoomide assambleerumist *in vivo* (Nomura & Watson 1959; Chittum & Champney 1995).

Väidetavalt inhibeerivad erütromütsiin ja mitmed teised makroliidid spetsiifiliselt 50S subühiku assambleerumist (ülevaateks Champney, 2003) Mudeli kohaselt seondub antibiootikum 50S prekursorpartiklil spetsiifilisse sidumiskohta, mis erineb valgusünteesi inhibitsiooni põhjustavast seondumisest ribosoomiga.

Kasvatades rakke klooramfenikooli juuresolekul tekivad neis mitmed erineva suurusega ribosomaalsed partiklid. Neid partikleid on põhjalikult uuritud ja viimaste ilmunud tööde kohaselt on ribosoomi assambleerumise defektid põhjustatud kaudselt, peptidültransferaasse aktiivsuse inhibeerimise tagajärjel (Dodd et al., 1991).

Antud töö eesmärgiks oli võrrelda klooramfenikooli ja erütromütsiini mõju ribosoomide assambleerumisele, selleks uuriti kummagi antibiootikumi juuresolekul kasvatatud rakkude ribosomaalseid partikleid ja nendes partikites sisalduvat rRNA-d.

2. Materjalid ja meetodid

2.1. Ribosoomide eraldamine

Ribosomaalsete partiklite eraldamiseks kasutati *E. coli* tüve MG1655 (Blattner et al., 1997). Rakke kasvatati kasvatati 2xYT (trüpton 16 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, NaCl 5 g/l) söötmes optilise tiheduseni $A_{600} = 0,2-0,3$ temperatuuril 25°C ja 37°C. Lisati klooramfenikooli (lõppkontsentratsioon 7 µg/ml) või erütromütsiini (100 µg/ml) ning kasvatati temperatuuril 25°C olevaid kultuure veel 2 tund ja temperatuuril 37°C olevaid kultuure veel üks tund. Rakud tsentrifugeeriti põhja rootoriga GS-3 temperatuuril 4°C tingimustel 4000 rpm 10 minutit. Rakud suspendeeriti 1 ml lüüsi puhvris (60mM KCl, 60mM NH₄Cl, 50mM Tris-HCl (pH 8), 6mM MgCl₂, 6mM β-merkaptopetanol, 16% sahharoos), lisati lüsootsüüm (lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) ja DNAasi (lõppkontsentratsioon 20U/ml). Rakud külmutati temperatuuril -70°C 15 minutit, seejärel sulatati jääveel 30 minutit. Külmutamist ja sulatamist korrati veel kaks korda. Seejärel tsentrifugeeriti lüüsitud rakke 20 minutit 13 000 rpm lauatsentrifugeerimis, supernatanti lahjendati lüüsilahjenduspuhvriga (60 mM KCl; 60 mM NH₄Cl; 10 mM Tris-HCl pH=8,0; 12 mM MgCl₂; 6 mM β-merkaptopetanol) kaks korda. 2 ml lahjendatud lüsaati kanti 10-25% (w/w) sahharoosigradiendile temperatuuriga 4°C ning ultratsentrifugeeriti rootoriga SW-28 (Beckman) tingimustel $\omega^2 t = 2,8 \times 10^{11}$ kiirusega 23 000 rpm.

2.2. RNA eraldamine

Ribosomaalne RNA sadestati sahharoosigradiendi fraktsioonidest 0,7 mahu isopropanooliga ning saadud sade lahustati 200 µl LLP-s. Sellele lisati 1 ml 5 M guanidiinium tiotsüanaadi (GuSCN), 4% Triton-X 100 lahust ning inkubeeriti väristil 20 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt lisati 25 µl räniliiva (50% SiO₂ suspensioon destilleeritud vees) ning loksutati aktiivselt 10 min toatemperatuuril, peale mida räni sadestati tsentrifugeerimises lauatsentrifugeerimis 1

minut 6000 rpm juures. Sellele järgnes esimene pesu 1 ml 5 M GuSCN ning teine pesu 1 ml 50% etanooliga, iga pesu järgselt sadestati rüni fuugimisega. rRNA elueeriti rünil 50 µl dH₂O'ga inkubeerides 5 min 55°C juures, rüniliiiv eemaldati tsentrifuugimisega. Puhastatud rRNA säilitati –20°C juures.

2.3. Praimeri ekstensioon

23S rRNA 5' otsa pikkus määrati kasutades pöördtranskriptaasi sõltuvat praimeriekstensiooni reaktsiooni (Liiv and Remme, 1998). Praimerina kasutati DNA oligonukleotiidi (5'-CGCCTCTGACTGCCAGGG-3'), mis on komplementaarne 23S rRNA nukleotiididega 31-48. Ühte reaktsiooni võeti 1 pmol rRNA-d (1 µl), 2 pmol praimerit (0,4 µl) ning 2 µl hübridisatsioonipuhvrit HB (225 mM HEPES-KOH (pH 7), 450 mM KCl), reaktsiooni maht viidi 9 mikrolitriini topeltdestilleeritud veega. Praimer seoti rRNAle langetades temperatuuri 10 minuti jooksul 90°C -> 42 °C. Seejärel lisati igale reaktsioonile 3 µl ekstensioonisegu ning inkubeeriti 30 min 42°C juures. Ekstensioonisegu sisaldas 1,2 µl revertaasi puhvrit RB (1.3 M TRIS-HCl (pH 8.5), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 0,8 µl dNTP(-C) segu (110 µM dATP, 110 µM dGTP, 110 µM dTTP, 6µM dCTP), 0,5 µl α-dCTP^{32P}, 0,7 µl H₂O, ja 0,1 µl Seikagaku revertaasi (23,5 U/ml). Seejärel lisati 1 µl chase segu (1 mM dNTP) ja 0,1 µl Seikagaku revertaasi ning inkubatsioon 15 min 42°C juures. Ekstensiooni reaktsioon peatati 120 µl stopplahuse (0,3M NaOAc/3 osa etanooli) lisamisega, sademe eristamiseks lisati 3 µl dekstraani, nukleinhapped sadestati 15 minutit temperatuuril -70°C. Sade lahustati 12 µl formamiid-STOPis (80% deioniseeritud formamiid, 10 mM EDTA (pH 8,0), 1mg/ml ksüleen tsüanool FF, 1 mg/ml broomfenool sinine). Proove kuumutati temperatuuril 95°C kaks minutit ning proovid kanti 7% polüakrüülamiidgeelile. Elektroforees toimus pingel 2000V kuni marker (broomfenoolsinine) liikus põhja. Geel kuivatati vaakumkuivatis ning teostati autoradiograafia röntgenfilmile.

Plasmiidid *BsB1067*, mis sisaldas 23S rRNA geeni, sekveneerimine viidi läbi ensümaatilisel meetodil kasutades *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit 1* (Amersham Biosciences).

2.4. RNA dot-blot

16S ja 23S rRNA suhte määramiseks erinevates ribosomaalsetes partiklites kasutati RNA dot-blot hübridisatsiooni kahe erineva radioaktiivselt märgitud DNA oligonukleotiidiga, mis olid komplementaarsed vastavalt 16S ja 23S rRNA'dega. Sahharoosgradiendi tsentrifuugimisel saadud ribosoomide fraktsioonidest eraldatud RNA proovid kanti Hybond-N⁺ hübridisatsioonifiltritele. rRNA-d võeti 0,2 pmol 50S subühiku kohta ja kõiki teisi proove mahuliselt sama palju. rRNA denatureeriti lisades 20 µl formamiidi, 6 µl formaldehüüdi ja 4 µl 10xMOPS (0,2M MOPS (pH7,0), 20 mM Na-atsetaat, 10 mM EDTA (pH 8.0) temperatuuril 65°C viis minutit. Proovid jahutati jääl ja lisati võrdne maht külma 20xSSC lahust (3M NaCl, 0,3 M Naatriumatsetaat), iga RNA proov kanti kahele filtrile vaakumblotteriga. rRNA fikseeriti Hybond-N⁺ hübridisatsioonifiltritele kasutades UV kiirgusega ristsidumist vastavalt tootja soovitudele (Amersham-Pharmacia). Hübridisatsioonioligotet (5'-GTTTGGGGTACGATTTGATG-3' 23S rRNA analüüsiks, 5'-GCCAGCGTTCAATCTGAG-3' 16S rRNA analüüsiks) märgistati ³²P isotoobiga 5' otsad kasutades T4 polünukleotiidkinaasi (Sambrook *et al*, 1989). Prehübridisatsioon toimus 4 tundi temperatuuril 50°C hübridisatsioonilahuses, mis sisaldas 6,35 ml 20xSSC, 2,5 ml 50xDenhardt (1% w/v) Ficoll 400, 1 % (w/v) polüvinüülpürrolidoon, 1 % (w/v) veise seerumalbumiini, 1, 25 ml 10% SDS ning 500 µl denatureeritud lõhe sperma DNAd, lahuse maht viidi 25 milliliitrini topeltdestilleeritud veega. Seejärel lisati kineeritud oligo ning hübridisatsioon toimus 12 tundi temperatuuril 50°C. Filtrit pesti 5 minutit 2x SSC, 0.1% SDS (w/v) puhvis ja seejärel 10 minutit 1x SSC, 0.1% SDS (w/v) puhvis. Peale viimast pesu kaeti filtrid kilega ning teostati autoradiograafia.

3. Tulemused

Antud töö eesmärgiks oli võrrelda ribosomaalsete partiklite akumulereerumist erinevate antibiootikumide juuresolekul kasvatatud rakkudes. Antibiootikumidest valiti erütromütsiin, kuna see oli esimene valgusünteesi inhibiitor, mille aktiivsuse näidati ka spetsiifilist 50S subühiku assambleerumise inhibitsiooni (Chittum & Champney, 1995). Teiseks kasutati klooramfenikooli, mille mõju ribosoomi subühikute assambleerumisele on uuritud intensiivselt 1960ndatel ja 1970ndatel. Klooramfenikool mõju ribosoomi subühikute assambleerumisele tuleneb tõenäoliselt sekundaarse efektina valgusünteesi inhibitsioonist (Dodd et al., 1991).

Esmalt kasvatati *E. coli* MG1655 tüve rakke 2xYT söötmes temperatuuril 37°C tiheduseni OD₆₀₀=0,2-0,3, seejärel lisati erütromütsiin, klooramfenikool või kasvatati rakke ilma antibiootikumita veel tund aega (2-3 poolestusaega). Rakud lüüsi ja ribosomaalsed partiklid lahutati 10-25% sahharoosgradiendil.

On teada, et ribosoomi assambleerumise defekte on parem uurida madalamatel temperatuuridel, sest siis on assambleerumine aeglase ja prekursorpartiklid paremini jälgitavad. Temperatuuril 25°C kasvatati rakke samades tingimustes kui temperatuuril 37°C, kuid peale antibiootikumi lisamist kasvatati veel kaks tundi ühe tunni asemel, kuna rakkude poolestusaeg on temperatuuril 25°C ligikaudu kaks korda pikem.

Kõikidelt sahharoosgradientidelt koguti ribosomaalseid partikleid sisaldavad fraktsioonid, mis seejärel sadestati isopropanooliga ja kogutud partiklitest eraldati rRNA. Partiklite rRNA koostist analüüsiti dot-blot meetodiga. Eraldatud RNA denatureeriti ja kanti kahele membraanile, üks neist hübridiseeriti kineeritud oligoga, mis oli 23S rRNA spetsiifiline, ja teine 16S rRNA spetsiifilise oligoga.

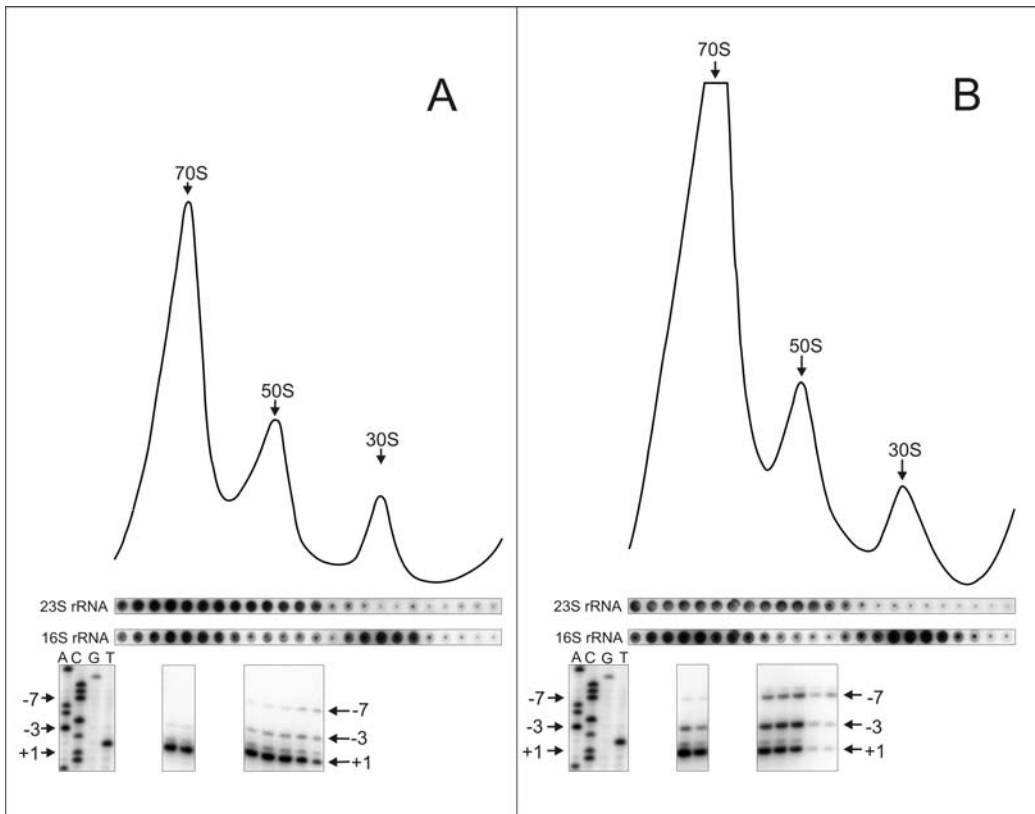
23S rRNA 5'otsa küpsusastet määrati praimerekstensiooni meetodil. 23S rRNA 5'otsas on RNAas III lõikamissaidid positsioonides -3 ja -7 (Liiv & Remme 1998). Tõenäoliselt toimub RNAasIII lõikamine -3 positsioonis siis kui 50S subühik on juba assambleerunud, 23S rRNA lõplik valmimine toimub tõenäoliselt ribosoomil, selle lõikamise eest vastutavat ensüümi pole veel

identifitseeritud. Analüüsimiseks valiti sahharoosgradiendi fraktsioonid, kus oli vastavalt dot-blot hübriidsatsiooni tulemustele näha 23S rRNA olemasolu. Sahharoosgradiendi 70S piirkonnast valiti kõikide uuritud rakkude puhul 2 eelnevalt kogutud fraktsiooni ja ilma antibiootikumita kasvatatud rakkude 50S piirkonnast 5 fraktsiooni ning antibiootikumi juuresolekul kasvatatud rakkude 50S ja 30S piirkonna vahelisest regionist 8 fraktsiooni.

Joonisel 6 on näha ilma antibiootikumita kasvatatud rakkude ribosomaalsete partilite analüüs. Paneelil A on analüüsitud temperatuuril 37°C kasvanud rakke ja paneelil B temperatuuril 25°C kasvanud rakke. Sahharoosgradiendi profiilil on mõlemal juhul hästi eristatavad 70S, 50S ja 30S ribosomaalsete partiklite regionid. Vabade 70S ribosomide hulk on suurem kui vabade 30S ja 50S subühik hulk. Vabade 50S ja 30S suhe on 2:1, mis oli oodatav tulemus, kuna 50S subühik on 30S subühikust ligikaudu kaks korda suurem. Dot-blot hübriidsatsiooniga tuvastati mõlemal temperatuuril kasvanud rakkudes 23S rRNA 70S ja 50S ribosomaalsetest partiklitest ning 16S rRNA 70S ja 30S ribosomaalsetes partiklites (joonis 6A ja 6B, keskmine paneel).

Praimerkestensiooni tulemused joonisel 6A näitavad, et temperatuuril 37°C kasvanud rakkudes on 70S ribosoomides suurem osa 23S rRNAde 5'otsadest täielikult protsessitud. 50S subühikutes esineb väga vähesel määral ka 23S rRNA molekule, mille 5'ots on 3 või 7 nukleotiidi võrra pikemad. Temperatuuril 25°C kasvanud rakkude 70S ribosoomides on 3 lisanukleotiidiga 23S rRNA 5'ots esindatud veidi suuremal määral kui temperatuuril 37°C kasvanud rakkudes (joonis 6B, alumine paneel). Madalamal temperatuuril kasvanud rakkudes on suuremal hulgal ka 3 ja 7 lisanukleotiidiga 23S rRNAsid 50S subühikutes.

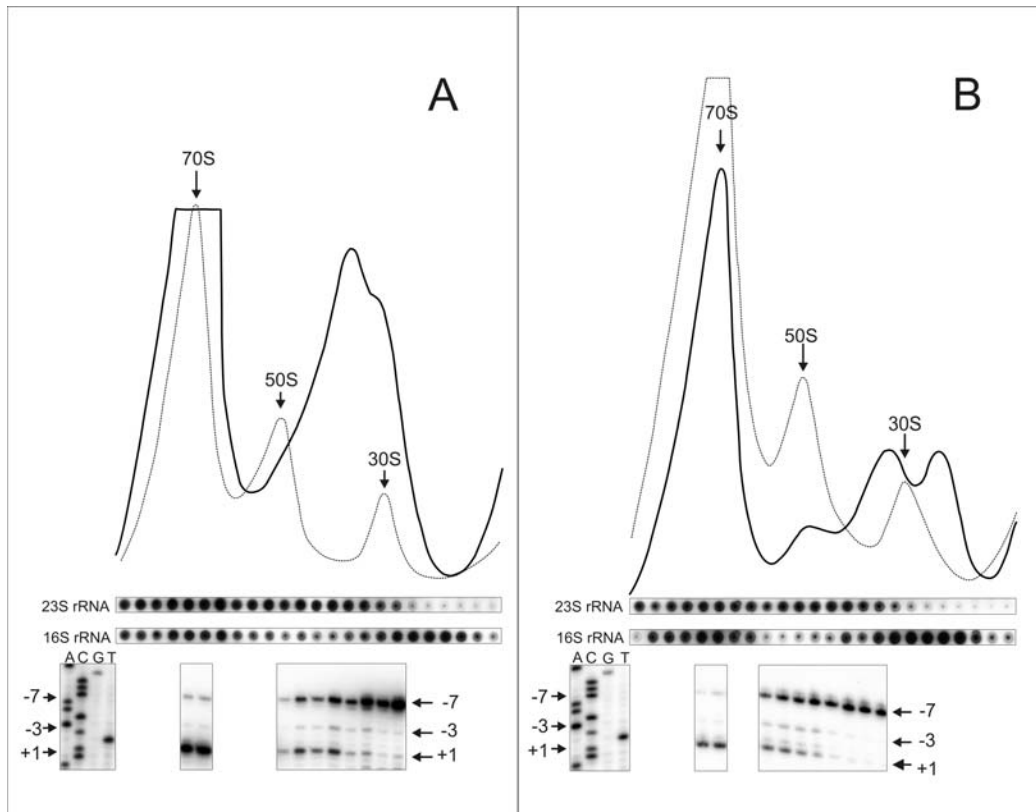
Temperatuuri 37°C erütromütsiini juuresolekul kasvatatud rakkude sahharoosgradiendi profiil on oluliselt erinev antibiootikumi puudumisel kasvatatud rakkude sahharoosgradiend profiilist (joonis 7A). Siin ja edaspidi on joonise taustal punktiirjoonega ära märgitud ilma antibiootikumita kasvatatud rakkude sahharoosgradiendi profiil, et tulemused oleksid paremini



Joonis 6. Ilma antibiootikumideta kasvanud rakkude ribosomaalsete partiklite jaotuvus 10-25% sahharoosgradiendil ja rRNA analüüs. Rakke kasvatati temperatuuril 37°C (paneel A) ja temperatuuril 25°C (paneel B) tiheduseni ligikaudu $OD_{600}=1$. Rakud lüüsi ja kanti 10-25% sahharoosgradiendile ning ultratsentrifuugiti rootoriga SW-28 tingimustel $\omega^2t=2,8 \times 10^{11}$. Gradiendi profiil mõõdetuna lainepikkusel OD_{260} on näha joonise ülemises osas. Sahharoosgradient fraksioneeriti ning kogutud fraktsioonidest eraldati rRNA, mida analüüsiti dot-blot meetodil, hübridiseerides vaakumblotteriga membraanile kantud rRNA-d 23S või 16S rRNA spetsiifilise oligoga (joonise keskel). Teatud proovidest määrati praimer ekstensiooni meetodiga 23S rRNA pikkus, kasutades praimerit mis kinnitub 23S rRNA 5'otsa lähedusse viidi läbi pöördtranskriptsioon (joonise alumises osas). Saadud cDNA fragmendid lahutati 7% PAAG geelil. Joonise alumises osas vasakpoolses ääres on ära toodud antud piirkonna nukleotiidne järjestus.

jälgitavad. 50S ja 30S subühikud ei ole selgelt eristatavad, on ilmunud uued partiklid umbes 35S regioonis. 30S partiklite hulk on umbes 2 korda suurem kui imaginaarsete 50S partiklite hulk. Dot-blot hübridisatsioon näitab, et 23S rRNA on esindatud alates 70S fraktsioonist kuni ~35S fraktsioonini ja vähesel määral ka ~30S partiklite regioonis (Joonis 7B, keskel). 16S rRNA on põhiliselt 70S ribosoomi ja ~30S partiklite regioonis, kuid vähesel määral ka ~35S regioonis. Praimer ekstensioon analüüs näitab, et 70S ribosoomid

sisaldavad põhiliselt lõplikult protsessitud 23S rRNAd, kuid vähesel määral ka 7 nukleotiidi pikemaid 23S rRNA molekule (joonis 7A, all). 50S kuni

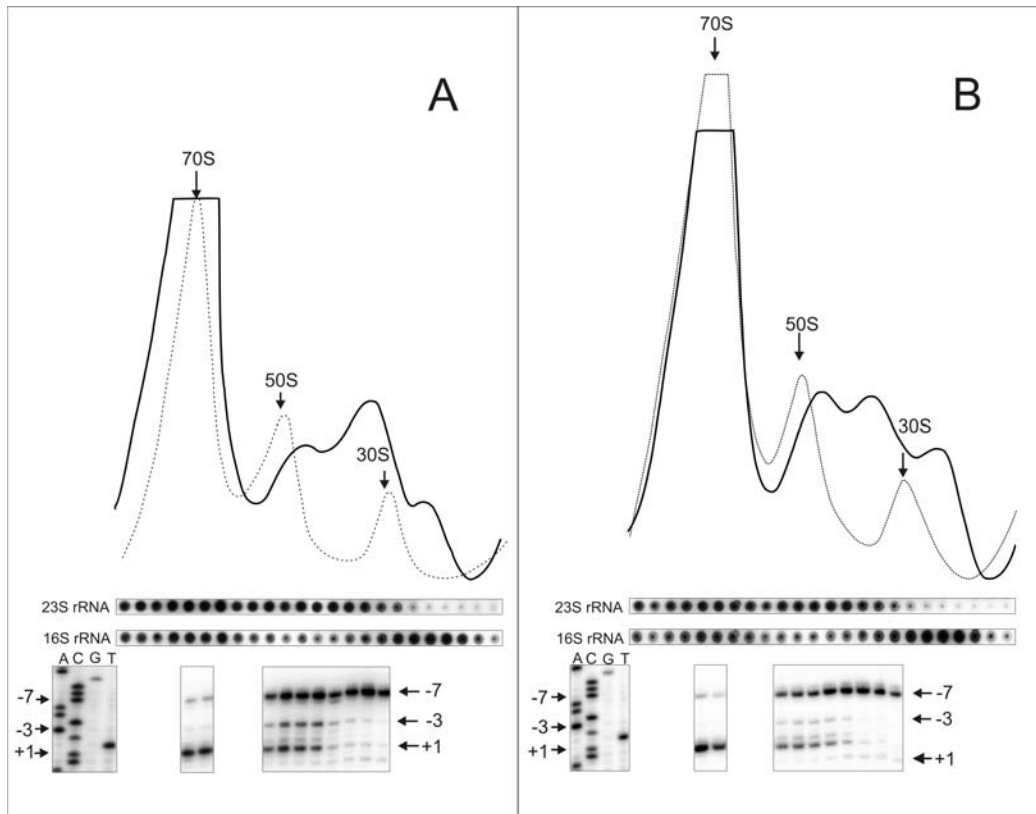


Joonis 7. Erütromütsiini juuresolekul kasvanud rakkude ribosomaalsete partiklite jaotuvus 10-25% sahharoosgradiendil ja rRNA analüüs. Rakke kasvatati temperatuuril 37°C (paneel A) ja temperatuuril 25°C (paneel B) tiheduseni ligikaudu $OD_{600}=0,2-0,3$, lisati erütromütsiin (lõppkontsentratsioon 100 $\mu\text{g/ml}$) ning kasvatati temperatuuril 37°C olevaid kultuure veel üks tund ja temperatuuril 25°C olevaid kultuure veel kaks tundi. Rakud lüüsiiti ja kanti 10-25% sahharoosgradiendile ning ultratsentrifuugiti rootoriga SW-28 tingimustel $\omega^2t=2,8 \times 10^{11}$. Gradiendi profiil mõõdetuna lainepikkusel OD_{260} on näha joonise ülemises osas. Punktirjoonega on märgitud ilma antibiootikumita kasvatatud rakkude sahharoosgradiend profiil, et tulemused oleks paremini jälgitavad. Sahharoosgradient fraksioneeriti ning kogutud fraksioonidest eraldati rRNA, mida analüüsiti dot-blot meetodil, hübriidseerides vaakumblotteriga membraanile kantud rRNAd 23S või 16S rRNA spetsiifilise oligoga (joonise keskel). Teatud proovidest määrati praimer ekstensiooni meetodiga 23S rRNA pikkus, kasutades praimerit mis kinnitub 23S rRNA 5'otsa lähedusse viidi läbi pöördtranskriptsioon (joonise alumises osas). Saadud cDNA fragmendid lahutati 7% PAAG geelil. Joonise alumises osas vasakpoolses ääres on ära toodud antud piirkonna nukleotiidne järjestus.

35S piirkonnas on esindatud kõiki kolme uuritava pikkusega rRNAid. 50S subühiku piirkonnas on võrdselt +1 ja -7 otsaga 23S rRNA-d, vähemal määral on -3 otsaga rRNA-d. Täielikult protsessitud 23S rRNAde osakaal väheneb liikudes ~35S partiklite regiooni poole ning ~35S partiklite regioonis on peaaegu kõik 23S rRNAst -7 vormis.

Temperatuuril 25°C erütromütsiini juuresolekul kasvanud rakkude sahharoosgradiendi profiil erineb oluliselt temperatuuril 37°C erütromütsiini juuresolekul kasvanud rakkude omast (võrdle joonis 7A ja 7B). Võrreldes ilma antibiootikumita temperatuuril 25°C kasvanud rakkudega on oluliselt vähenenud vabade 50S subühikute hulk ja tekkinud uued partiklid, mida võiks tähistada ~35S ja ~25S. ~50S partikleid on ligikaudu neli korda vähem kui ~35S ja ~25S partikleid. Dot-blot analüüsi põhjal on 23S rRNA põhiliselt 70S ribosoomides, ~50S partiklites ja vähemal määral ~35S regioonides (joonis 7B keskel). 16S rRNA on põhiliselt 70S, ~25S ja vähemal määral ~35S piirkonnas. Primer ekstensioon näitab, et 70S ribosoomides on enamus 23S rRNAde 5'otsad lõplikult protsessitud (joonis 7B, all). 50S regioonis on võrdselt esindatud 23S rRNA pikkustega +1 ja -7, kuid mida lähemale ~35S piirkonnale, seda vähem on partiklites küpset 23S rRNA 5'otsa, ~35S partiklites esineb ainult rRNA pikkusega -7.

Temperatuuril 37°C klooramfenikooli juures olekul kasvatatud rakkudes akumulereuvad partiklid, mida võiks tähistada ~50S, ~35S ja ~25S (joonis 8A). ~35S partikleid esineb kõige suuremal hulgal, ~50S partikleid on veidi vähem ning ~25S partikleid on kõige vähem. Dot-blot analüüsi põhjal on 23S rRNA põhiliselt 70S ja ~50S regioonis, 16S rRNA on põhiliselt 70S ja ~25S partiklites (joonis 8A, keskel). ~35S partiklid on heterogeense koostisega, neis esineb mõlemat rRNA peaaegu võrdses koguses. Primer ekstensiooni tulemuste kohaselt esineb 70S ribosoomides enamus 23S rRNAst lõplikult protsessitult, vähesel määral esineb 23S rRNA 7 lisanukleotiidiga 5' otsas. ~50S piirkonnas esineb nii +1, -3 kui ka -7 pikkusega 23S rRNA-d, kuid -7 on kõige levinum. ~35S partiklitest on enamus 23S rRNAst -7 prekursor vormis (joonis 8A, all).



Joonis 8. Klooramfenikooli juuresolekul kasvanud rakkude ribosomaalsete partiklite jaotuvus 10-25% sahharoosgradiendil ja rRNA analüüs. Rakke kasvatati temperatuuril 37°C (paneel A) ja temperatuuril 25°C (paneel B) tiheduseni ligikaudu $OD_{600}=0,2-03$, lisati klooramfenikool (lõppkontsentratsioon 7 $\mu\text{g/ml}$) ning kasvatati temperatuuril 37°C olevaid kultuure veel üks tund ja temperatuuril 25°C olevaid kultuure veel kaks tundi. Rakud lüüsi ja kanti 10-25% sahharoosgradiendile ning ultratsentrifuugiti rootoriga SW-28 tingimustel $\omega^2t=2,8 \times 10^{11}$. Gradiendi profiil mõõdetuna lainepikkusel OD_{260} on näha joonise ülemises osas. Punktiirjoonega on märgitud ilma antibiootikumita kasvatatud rakkude sahharoosgradiend profiil, et tulemused oleks paremini jälgitavad. Sahharoosgradient fraktsioneeriti ning kogutud fraktsioonidest eraldati rRNA, mida analüüsiti dot-blot meetodil, hübriidseerides vaakumblotteriga membraanile kantud rRNA-d 23S või 16S rRNA spetsiifilise oligoga (joonise keskel). Teatud proovidest määrati praimer ekstensiooni meetodiga 23S rRNA pikkus, kasutades praimerit mis kinnitub 23S rRNA 5'otsa lähedusse viidi läbi pöördtranskriptsioon (joonise alumises osas). Saadud cDNA fragmendid lahutati 7% PAAG geelil. Joonise alumises osas vasakpoolses ääres on ära toodud antud piirkonna nukleotiidne järjestus.

Temperatuuril 25°C klooramfenikooli juures olekul kasvatatud rakkude sahharoosgradiendi profiil sarnaneb sama antibiootikumiga kõrgemal temperatuuril kasvatatud rakkude omaga (joonis 8B), muutunud on vaid partiklite kogus. ~50S ja ~35S partikleid on ligikaudu võrdses koguses ja

~25S partikleid on kõige vähem Partikeid võiks sarnaselt kutsuda ~50S, ~35S ja ~25S partikliteks.

Sarnaselt eelneval temperatuuril kasvatatud rakkudega on 23S rRNA 70S ribosoomides, ~50S partiklites ja 16S rRNA 70S, ~35S ja ~25S partiklites (joonis 8B, keskel). Praimerekstensiooni tulemuste kohaselt on 70S ribosoomides põhiliselt küps 23S rRNA ja ~35 partiklites –7 rRNA 5'otsaga 23S rRNA (joonis 8B, all). ~50S partiklites on esindatud +1, -3 ja –7 5'otsaga 23S rRNA, kui –7 rRNA-d on kõige rohkem.

4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda klooramfenikooli ja erütromütsiin mõju ribosoomi subühikute biogeneesil. Saadud tulemused on vastuolus töödega, mis näitavad, et erütromütsiin inhibeerib 50S subühikute assambleerumist spetsiifiliselt (Chittum & Champney, 1995; Usary & Champney, 2001).

S. Champney ja tema kaastöölised nägid erütromütsiini juuresolekul kasvatatud rakkude sahharoosgradiendi profiilil vabade 50S subühikute hulga vähenemist, kuid ei näinud 30S subühikute vähenemist ega ka lisapartiklite teket (Chittum & Champney, 1995). Käesolevas töös kirjeldatud tulemused näitavad, et erütromütsiin mõjutab ka 30S subühiku teket ja antud antibiootikumiga kasvatatud rakkudest eraldatud ribosomaalsete partiklite sahharoosgradiendi profiilil on märgata prekursorpartiklite teke. Lisaks on näha, et assambleerumise defekti määr on temperatuurist sõltuv.

“Klooramfenikooli partiklid” on suhteliselt hästi kirjeldatud (Hosokawa & Nomura 1965, Osawa et al., 1968), selles töös saadud tulemused kinnitavad varem avaldatud “klooramfenikooli partiklite” 30S ja 50S subühikutest erinevat liikumist sahharoosgradiendil. Temperatuuril 25°C akumulatsioonid klooramfenikooli ja erütromütsiin juuresolekul kasvatatud rakkudes sarnase sedimentatsiooni koefitsendiga partiklid, erinevus on vaid partiklite hulgas. Sarnasusi on näha ka antibiootikumide juuresolekul temperatuuril kasvatatud rakkude sahharoosgradientide profiilides, mõlema antibiootikumi juuresolekul kasvatatud rakkudes esinevad ~35S partiklid. Erütromütsiini temperatuuril 37°C kasvatatud rakkude puhul pole selgesti eralduvaid ~50S partikleid, kuid tõenäoliselt on nende hulk nii väike, et nad kaovad ~35S partiklite varju. Võrreldes ilma antibiootikumita kasvanud rakkudega on erütromütsiiniga temperatuuril 37°C kasvatatud rakkudes oluliselt suurenenud 30S partiklite hulk.

Dot-blot analüüsil selgus, et ka kummagi antibiootikumide juuresolekul ja erinevatel temperatuuridel kasvavates rakkudes on rRNA koostis sarnane, Kõikidel juhtudel on ~50S partiklites põhiliselt 23S rRNA, ~35S partiklites on nii 23S rRNA kui ka 16S rRNA, ~25S partiklites on põhiliselt 16S rRNA.

Klooramfenikooli juuresolekul kasvavates rakkudes on ka varem sarnaseid tulemusi saadud (Osawa et al., 1968), kuid erütromütsiinga kasvatatud rakkudes on vaid nähtud, et 30S regioonis esineb suurenenud määral 50S subühiku eellasi (Usary & Champney, 2001).

On näidatud, et “klooramfenikooli partiklites” esineb suurel määral protsessimata rRNA (Harvey & Koch, 1980). Teatavasti on 23S rRNA 5’otsas RNAas III lõikamissaidid positsioonides –3 ja –7 (Liiv & Remme 1998). Tõenäoliselt toimub RNAasIII lõikamine –3 positsioonis siis kui 50S subühik on juba assambleerunud, 23S rRNA lõplik valmimine toimub tõenäoliselt polüsoomides selle lõikamise eesti vastutavat ensüümi pole veel identifitseeritud. Mõlemal temperatuuril klooramfenikooli juuresolekul kasvatatud rakkudes esines ~50S partiklites nii +1, -3 kui ka –7 otsaga molekule, kuid enim oli esindatud 7 lisanukleotiidiga vorm. ~35S partiklid sisaldasid põhiliselt 7 lisanukleotiidiga vormi. Seega kinnitavad saadud tulemused, et suurem osa ~50S ja ~35S partiklitest ei ole küpsed 50S subühikud.

Erütromütsiiniga kasvatatud rakkudest eraldatud ~50S ja ~35S partiklites sisaldub samuti suuremas hulgas lõplikult protsessimata 5’otsaga 23S rRNA. Kõige enam on molekule, millel on 7 lisanukleotiidi, mis viitab sellele, et suurem osa partiklitest pole 50S subühikud vaid on selle eellased.

Palju töid on avaldatud selle kohta, et makroliidid ja teised 50S subühikule seonduvad antibiootikumid inhibeerivad spetsiifiliselt 50S subühiku assambleerumist erinevates mikroorganismides (ülevaateks vt. nt. Champney, 2003). Antud töö tulemused demonstreerivad, et erütromütsiin ei inhibeeri 50S subühiku assambleerumist spetsiifiliselt *E. coli* rakkudes, kuna erütromütsiini juuresolekul kasvanud rakkudes on lisaks 50S prekursorile olemas ka 30S subühiku eellane

Vastupidiselt varem avaldatud töödel (Champney & Burdine, 1995, Champney & Tober, 2000a), võib antud tulemuste põhjal oletada, et “klooramfenikooli partiklid” ja “erütromütsiini partiklid” on sarnase koostisega. Sarnasus avaldub sahharoosgradiendi profiilides, partiklite rRNA koostises ning erinevates partiklites esnieva 23S rRNA 5’otsa pikkuses. Kuna antud töös ei uuritud partiklite r-valgulist koostist ei saa väita, et need partikit on ka identse valgulise koostisega.

Tõenäoliselt inhibeerib klooramfenikool ribosomaalsete subühikute assambleerumist kaudselt, tänu valgusünteesi inhibeerimisele. R-valkude süntees on reguleeritud translatsiooni repressor r-valkude poolt. On teada, et olukorras, kus rRNA süntees on suurem kui ribosomaalsete valkude süntees, on enamus repressorvalkudest seondunud rRNAle, mis põhjustab derepressiooni r-valkude sünteesil nendelt operonidelt (Yamagishi & Nomura 1988). Selline olukord põhjustab r-valkude erinevat sünteesitaset, mistõttu on ribosoomide biogeneesis häiritud. Samane olukord tekib ka rakkude kasvatamisel klooramfenikooli juuresolekul: rRNA süntees jätkub, kuid r-valkude süntees toimub erineval tasemel, eeldatavalt moodustuvadki seetõttu heterogeense koostisega “klooramfenikooli partiklid”.

Erütromütsiini inhibeeriv mõju subühikute assambleerumisele võiks toimida samaselt klooramfenikooliga, tänu valgusünteesi inhibitsioonile toimub r-valkude süntees erineval tasemel, mistõttu moodustuvad heterogeense koostisega ribosomaalsed partiklid. Et paremini mõista “erütromütsiini partiklite” olemust, oleks oluline uurida ka nende partiklite valgulist koostist ja võrrelda seda “klooramfenikooli partiklite” valgulise koostisega.

Kokkuvõte

Klooramfenikooli juuresolekul kasvanud rakkudes akumulatsioonid mittetäielikult assembleerunud ribosomaalsed partiklid. Tõenäoliselt toimub sellistes rakkudes valgusünteesi inhibitsiooni tõttu r-alkude süntees erineval tasemel ning ribosoomi subühikute biogenees on häiritud (Dodd et al., 1991).

On näidatud, et võrreldes ilma antibiootikumita kasvatatud rakkudega esineb erütromütsiiniga kasvanud rakkudes oluliselt vähem vabu ribosoomi 50S subühikud ja 30S subühikute hulk ei ole muutunud. Väidetavalt inhibeerib erütromütsiin 50S subühikute biogeneesi spetsiifiliselt, seondudes 50S subühiku prekursoritele ning takistades nende valmimist 50S subühikuteks (Chittum & Champney, 1995).

Antud töö eesmärgiks oli võrrelda klooramfenikooli ja erütromütsiini mõju ribosoomide assembleerumisele. Tulemused näitavad, et erütromütsiini juuresolekul kasvanud rakkudes ei toimu spetsiifilist 50S subühikute assembleerumise inhibitsiooni erütromütsiini poolt, inhibeeritud on mõlema subühiku assembleerumine.

Erütromütsiini juuresolekul temperatuuril 25°C kasvanud rakkudes moodustuvad "klooramfenikooli partiklite" sarnased partiklid. Partiklite ligikaudne sedimentatsiooni koefitsient, rRNA koostis ning 23S rRNA 5'otsa küpsusaste on sarnane.

Tõenäoliselt on sarnaselt klooramfenikoolile ka erütromütsiini inhibitoorne mõju subühikute assembleerumisele kaudne, mis avaldub tänu valgusünteesi inhibitsioonile.

Effect of antibiotics chloramphenicol and erythromycin on the ribosome assembly in *Escherichia coli*

Triinu Siibak

Summary

Ribosomal precursor particles with reduced sedimentation coefficient accumulate in the cells treated with chloramphenicol. Most likely it is a consequence of protein synthesis inhibition due to differential r-protein synthesis (Dodd et al., 1991).

The lack of free ribosomal 50S subunits in the presence of erythromycin has been previously reported (Chittum & Champney, 1995). The total amount of free 30S subunit was not reduced in these experiments (Chittum & Champney, 1995). It has been suggested that erythromycin has specific inhibitory effect on 50S subunit biogenesis by binding to precursor particles and preventing the maturation of 50S subunits.

The aim of current work was to examine the effect of these two drugs on the ribosome assembly. The results of this work show, that the erythromycin inhibits biogenesis of both ribosomal subunits, 30S and 50S, by equal degree. Therefore erythromycin does not have specific inhibitory effect on 50S subunit assembly in *E. coli* cells.

Particles similar to “chloramphenicol particles” accumulate in the cells treated with erythromycin. The sedimentation coefficient, rRNA content and maturation state of 23S rRNA 5' end are similar between ribosomal particles accumulating in the presence of erythromycin or chloramphenicol.

The inhibitory effect of the erythromycin on subunit assembly is most likely indirect and acts by inhibition of protein synthesis as in the case with chloramphenicol.

Kasutatud kirjandus

1. **Allas, Ü., Liiv, A. and Remme, J.** (2003) Functional interaction between RNase III and the *Escherichia coli* ribosome. *BMC Mol. Biol.* 4(1), 8
2. **Bonnefoy, A., Girard, A. M., Agouridas, C. and Chantot, J. F.** (1997) Ketolides lack inducibility properties of MLS(B) resistance phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 40(1), 85-90
3. **Bram, R. J., Young, R. A. and Steitz, J. A.** (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell.* 19(2), 393-401
4. **Champney, W. S.** (2003) Bacterial ribosomal subunit assembly is an antibiotic target. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(9), 929-947
5. **Champney, W. S. and Burdine, R.** (1995) Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(9), 2141-2144
6. **Champney, W. S. and Burdine, R.** (1996) 50S ribosomal subunit synthesis and translation are equivalent targets for erythromycin inhibition in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(5), 1301-1303
7. **Champney, W. S. and Burdine, R.** (1998a) Azithromycin and clarithromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Curr. Microbiol.* 36(2), 119-123
8. **Champney, W. S. and Burdine, R.** (1998b) A comparison of the inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by nine different macrolide antibiotics. *Curr. Microbiol.* 37(6), 412-417
9. **Champney, W. S. and Miller, M.** (2002a) Inhibition of 50S ribosomal subunit assembly in *Haemophilus influenzae* cells by azithromycin and erythromycin. *Curr. Microbiol.* 44(6), 418-424
10. **Champney, W. S. and Miller, M.** (2002b) Linezolid is a specific inhibitor of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Curr. Microbiol.* 44(5), 350-356

11. **Champney, W. S. and Pelt, J.** (2002a) The ketolide antibiotic ABT-773 is a specific inhibitor of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Streptococcus pneumoniae* cells. *Curr. Microbiol.* 45(3), 155-160
12. **Champney, W. S. and Pelt, J.** (2002b) Telithromycin inhibition of protein synthesis and 50S ribosomal subunit formation in *Streptococcus pneumoniae* cells. *Curr. Microbiol.* 45(5), 328-333
13. **Champney, W. S., Pelt, J. and Tober, C. L.** (2001) TAN-1057A: a translational inhibitor with a specific inhibitory effect on 50S ribosomal subunit formation. *Curr. Microbiol.* 43(5), 340-345
14. **Champney, W. S. and Tober, C. L.** (1998) Inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 11 different ketolide antibiotics. *Curr. Microbiol.* 37(6), 418-425
15. **Champney, W. S. and Tober, C. L.** (1999) Molecular investigation of the postantibiotic effects of clarithromycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6), 1324-1328
16. **Champney, W. S. and Tober, C. L.** (2000a) Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. *Curr. Microbiol.* 41(2), 126-135
17. **Champney, W. S. and Tober, C. L.** (2000b) Evernimicin (SCH27899) inhibits both translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(6), 1413-1417
18. **Champney, W. S. and Tober, C. L.** (2001) Structure-activity relationships for six ketolide antibiotics. *Curr. Microbiol.* 42(3), 203-210
19. **Champney, W. S., Tober, C. L. and Burdine, R.** (1998) A comparison of the inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by nine different macrolide antibiotics. *Curr. Microbiol.* 37(6), 412-417
20. **Chinali, G., Moureau, P. and Cocito, C.** (1984) The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 259(15), 9563-9568

21. **Chinali, G., Nyssen, E., DiGiambattista, M. and Cocito, C.** (1988) Inhibition of polypeptide synthesis in cell-free systems by virginiamycin S and erythromycin. Evidence for a common mode of action of type B synergimycins and 14-membered macrolides. *Biochim. Biophys. Acta.* 949(1), 71-78
22. **Chittum, H. S. and Champney, W. S.** (1995) Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.* 30(5), 273-279
23. **Cocito, C., DiGiambattista, M., Nyssen, E. and Vannuffel, P.** (1997) Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 Suppl A:7-13
24. **Condon, C., Squires, C. and Squires, C. L.** (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 59 (4), 623-645
25. **Cundliffe, E.** (1990) Recognition Site for Antibiotics within rRNA. The Ribosome: structure, function and evolution. 479-490
26. **Dagley, S. and Sykes, J.** (1959) Effect of drugs upon components of bacterial cytoplasm. *Nature.* 183(4675),1608-1609
27. **Dennis, P. P.** (1976) Effects of chloramphenicol on the transcriptional activities of ribosomal RNA and ribosomal protein genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 108(3), 535-546
28. **DiGiambattista, M., Engelborghs, Y., Nyssen, E. and Cocito, C.** (1987) Kinetics of binding of macrolides, lincosamides, and synergimycins to ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262(18), 8591-8597
29. **Dodd, J., Kolb, J. M. and Nomura, M.** (1991) Lack of complete cooperativity of ribosome assembly in vitro and its possible relevance to in vivo ribosome assembly and the regulation of ribosomal gene expression. *Biochimie.* 73(6), 757-767
30. **Dohme, F. and Nierhaus, K. H.** (1976) Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes in vitro. *J. Mol. Biol.* 107(4), 585-599
31. **Fallon, A. M., Jinks, C. S., Yamamoto, M. and Nomura, M.** (1979) Expression of ribosomal protein genes cloned in a hybrid plasmid in *Escherichia coli*: gene dosage effects on synthesis of ribosomal proteins

- and ribosomal protein messenger ribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 138(2), 383-396
32. **Franceschi, F. J. and Nierhaus, K. H.** (1988) Ribosomal protein L20 can replace the assembly-initiator protein L24 at low temperatures. *Biochemistry.* 27(18), 7056-7059
 33. **Franceschi, F. J. and Nierhaus, K. H.** (1990) Ribosomal proteins L15 and L16 are mere late assembly proteins of the large ribosomal subunit. Analysis of an *Escherichia coli* mutant lacking L15. *J. Biol. Chem.* 265(27), 16676-16682
 34. **Harvey, R. J. and Koch, A. L.** (1980) How partially inhibitory concentrations of chloramphenicol affect the growth of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18(2), 323-337
 35. **Held, W. A. and Nomura, M.** (1973) Rate determining step in the reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits. *Biochemistry.* 12(17), 3273-3281
 36. **Hosokawa, K. and Nomura, M.** (1965) Incomplete ribosomes produced in chloramphenicol- and puromycin-inhibited *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 12, 225-241
 37. **Khaitovich, P. and Mankin, A.S.** (1999) Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5 S rRNA. *J Mol Biol.* 291(5), 1025-1034
 38. **King, T. C. and Schlessinger, D.** (1983) S1 nuclease mapping analysis of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258(19), 12034-12042
 39. **King, T. C., Sirdeshmukh, R. and Schlessinger, D.** (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(1), 185-188
 40. **Kirst, H. A.** (1994) Semi-synthetic derivatives of 16-membered macrolide antibiotics. *Prog. Med. Chem.* 31, 265-295
 41. **Kurland, C. G. and Maaoe, O.** (1962) Regulation of ribosomal and transfer RNA synthesis. *J. Mol Biol.* 4193-4210
 42. **Kurland, C. G., Nomura, M., and Watson, J. D.** (1962) The physical properties of the chloromycetin particles. *J. Mol. Biol.* 4, 388-394

43. **Leclerq, R. and Courvalin, P.** (1991) Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35(7), 1273-1276
44. **Le Goffic, F.** (1985) Structure activity relationships in lincosamide and streptogramin antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 16 Suppl A:13-21
45. **Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M. P.** (1999a) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA.* 5(1),139-146
46. **Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M. P.** (1999b) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18(10), 2878-2885
47. **Liiv, A. and Remme, J.** (1998) Base-pairing of 23 S rRNA ends is essential for ribosomal large subunit assembly. *J. Mol. Biol.* 276(3), 537-545
48. **Lindahl, L.** (1975) Intermediates and time kinetics of the in vivo assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 92(1),15-37
49. **Lindahl, L. and Zengel, J. M.** (1986) Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 20, 297-326
50. **Mabe, S., Eller, J. and Champney, W. S.** (2004) Structure-activity relationships for three macrolide antibiotics in *Haemophilus influenzae*. *Curr. Microbiol.* 49(4), 248-254
51. **Moazed, D. and Noller, H. F.** (1987) Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie.* 69(8), 879-884
52. **Murray, I. A. and Shaw, W. V.** (1997) O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(1), 1-6
53. **Nierhaus, K. H.** (1991) The assembly of procaryotic ribosomes. *Biochimie.* 73, 739-755
54. **Nierhaus, K. H., Bordasch, K. and Homann, H. E.** (1973) Ribosomal proteins. 43. In vivo assembly of *Escherichia coli* ribosomal proteins. *J. Mol. Biol.* 74(4), 587-597

55. **Nierhaus, K. H. and Dohme, F.** (1974) Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71(12), 4713-4717
56. **Nomura, M. and Hosokawa, K.** (1965) Biosynthesis of ribosomes: fate of chloramphenicol particles and of pulse-labeled RNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 12, 242-265
57. **Nomura, M., and Watson, J. D.** (1959) Ribonucleoprotein Particles within Chloromycetin-Inhibited *Escherichia Coli*. *J. Mol. Biol.* 1:204
58. **Nowotny, N. and Nierhaus, K. H.** (1982) Initiator proteins for the assembly of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79(23), 7238-7242
59. **Osawa, S., Otaka, E., Itoh, T. and Fukui, T.** (1969) Biosynthesis of 50 s ribosomal subunit in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 40(3), 321-351
60. **Saarma, U. and Remme, J.** (1992) Novel mutants of 23S RNA: characterization of functional properties. *Nucleic Acids Res.* 20(12), 3147-3152
61. **Shen, V. and Bremer, H.** (1977) Rate of ribosomal ribonucleic acid chain elongation in *Escherichia coli* B/r during chloramphenicol treatment. *J. Bacteriol.* 130(3), 1109-1116
62. **Sirdeshmukh, R. and Schlessinger, D.** (1985) Ordered processing of *Escherichia coli* 23S rRNA in vitro. *Nucleic. Acids Res.* 13(14), 5041-5054
63. **Spahn, C. M. and Prescott, C. D.** (1996) Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J. Mol. Med.* 74(8), 423-439
64. **Spillmann, S., Dohme, F. and Nierhaus, K.H.** (1977) Assembly in vitro of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *J. Mol. Biol.* 115(3), 513-523
65. **Srivastava and Schlessinger, D.** (1988) Coregulation of processing and translation: mature 5' termini of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA form in polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85(19), 7144-7148
66. **Sykes, J., Metcalf, E. and Pickering, J. D.** (1977) The nature of the proteins in 'chloramphenicol particles' from *Escherichia coli* A19 (Hfr rel met rns). *J. Gen. Microbiol.* 98(1),1-16

67. **Tejedor, F. and Ballesta, J. P. G.** (1986) Reaction of some macrolide antibiotics with the ribosome. Labeling of the binding site components. *Biochemistry*. 25(23), 7725-7731
68. **Traub, P. and Nomura, M.** (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 59(3), 777-784
69. **Traub, P. and Nomura, M.** (1969) Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. VI. Mechanism of assembly of 30 s ribosomes studied *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 40(3), 391-413
70. **Usary, J. and Champney, W. S.** (2001) Erythromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* 40(4), 951-962
71. **Vester, B. and Garrett, R. A.** (1988) The importance of highly conserved nucleotides in the binding region of chloramphenicol at the peptidyl transfer centre of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *EMBO J.* 7(11), 3577-3587
72. **Vogel, Z., Vogel, T., Zamir, A. and Elson, D.** (1971) Correlation between the peptidyl transferase activity of the 50 s ribosomal subunit and the ability of the subunit to interact with antibiotics. *J. Mol. Biol.* 60(2), 339-346
73. **Yamagishi, M. and Nomura, M.** (1988) Effects of induction of rRNA overproduction on ribosomal protein synthesis and ribosome subunit assembly in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170(11), 5042-5050
74. **Yoshida, K. and Osawa, S.** (1968) Origin of the protein component of chloramphenicol particles in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 33(3), 559-569
75. **Young, R. A. and Steitz, J. A.** (1978) Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75(8):3593-3597

