

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Triin Truu

23S rRNA modifikatsioonide roll valgusünteesis

Magistritöö

Biomeditsiin

40 EAP

Juhendaja PhD Margus Leppik

TARTU 2016

INFOLEHT

23S rRNA modifikatsioonide roll valgusünteesis

Triin Truu

Valgusüntees on keeruline protsess, mille mõistmiseks on ribosoomi struktuuri ja tema funktsioneerimist juba aastakümneid uuritud. Kuigi teadmised on läinud detailsemaks, ei ole siiski kõik valkude sünteesi puudutavad aspektid teada. Käesolevas töös demonstreeritakse 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise mõju valgusünteesile. Sellest lähtuvalt tõestatakse, et peptidüültransferaase piirkonna modifikatsioonid ei ole ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud, kuid osalevad translatsiooniprotsessi peenhäälestamisel.

Märksõnad: ribosoom, 23S rRNA, PTC, modifikatsioonid, valgusüntees

CERCS kood: P320; Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

The role of 23S rRNA modifications in protein synthesis

Triin Truu

The process of protein synthesis is complicated and not yet fully understood. Although research in this field has been ongoing for decades the fine details behind assembling a functional ribosome lie behind the structure of the ribosome. In this thesis I demonstrate the importance of the modifications in the PTC region of the 23S rRNA. RNA modifications in the domain V of the 23S rRNA are not essential for assembling a functional ribosome. Instead they participate in the fine-tuning of the ribosome and therefore the translational process.

Keywords: ribosome, 23S rRNA, PTC, modifications, protein synthesis

CERCS code: P320; Nucleic acids, protein synthesis

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS.....	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1. Ülevaade <i>Escherichia coli</i> ribosoomist	8
1.1. Ribosomaalne RNA.....	8
1.2. Translatsiooni elongatsiooni mudel	10
2. 23S rRNA domeenid	13
3. Peptidüültransferaasne tsenter	16
4. RNA modifikatsioonide üldiseloomustus	18
4.1. rRNA modifikatsioonid	19
4.2. <i>E. coli</i> 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümid ja modifikatsioonid.....	21
5. Ülevaade valgusünteesi inhibeerivatest antibiootikumidest.....	25
5.1. 30S subühiku funktsioneerimist inhibeerivad antibiootikumid.....	25
5.2. 50S subühiku funktsioneerimist inhibeerivad antibiootikumid.....	26
EKSPERIMENTAALOSA	28
1. Töö eesmärk	28
2. Materjal ja meetodika	28
2.1. <i>Echerichia coli</i> tüved, plasmiidid ja viirus.....	28
2.2. Söötmed	29
2.3. Puhvrid, reagentid ja ensüümid	30
2.4. Praimerid	31
2.5. <i>Escherichia coli</i> tüvede konstrueerimine ja kontrollimine.....	31
2.6. <i>Escherichia coli</i> tüvede kasv ja generatsiooniaegade määramine.....	33
2.7. Ribosoomide lahutamine ja kogumine sahharoosgradiendi abil.....	34

2.8.	rRNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC (<i>high-performance liquid chromatography</i>) meetodiga	35
2.9.	<i>In vitro</i> peptidüülitransferaasse aktiivsuse määramine.....	36
2.10.	<i>In vitro</i> translatsioon.....	36
2.11.	<i>In vivo</i> translatsiooni täpsususe mõõtmine.....	37
2.12.	Kasvu inhibitsiooni eksperimendid.....	37
3.	Tulemused	38
3.1.	Konstrueeritud <i>Eschericia coli</i> tüved.....	38
3.2.	Generatsiooniajad	42
3.3.	Ribosoomide gradiendiprofiilid.....	44
3.4.	<i>In vitro</i> peptidüülitransferaasne aktiivsus.....	45
3.5.	<i>In vitro</i> translatsiooni aktiivsus	46
3.6.	<i>In vivo</i> translatsiooni täpsus on segane	47
3.7.	Antibootikumide tundlikkus	49
ARUTELU	51
1.	23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumine põhjustab aeglasemat kasvu.....	51
2.	<i>In vitro</i> PTC aktiivsus säilib ka 50S partiklite töötlemisel	52
3.	Domeeni V modifikatsioonide puudumine soodustab translatsioonilisi vigu	54
4.	PTC modifikatsioonid vähendavad tundlikkust erütromütsiinile	55
KOKKUVÕTE	57
SUMMARY	58
TÄNUSÕNAD	59
KASUTATUD KIRJANDUS	60
Artiklid	60
Raamatud	69
Bakalaureusetöö	69
LISAD	70

LISA 1	70
LISA 2	71
LISA 3	72
LISA 4	73

KASUTATUD LÜHENDID

Amp - ampitsilliin

Cam – klooramfenikool

GAC – GTPaasne keskus (ingl. k *GTPase associated centre*)

IPTG – isopropüül β -D-1-tiogalaktopüranosiid

FRT – Flp-rekombinaasi sihtmärk järjestus (*Flp recombination target*)

LLP – lüüsilahjenduspuhver

MOPS – 3-morfolinopropaansulfoonhape

ONPG – orto-nitrofenüül- β -galaktosiid

PTC – peptidüültransferaasne tsenter

SRL – sartsiin-ritsiin ling

TBE – tris-boorhape-EDTA puhver

Tc – tetratsükliin

TCA – trikloroäädikhape (ingl. k. *trichloroacetic acid*)

U – ühik (*Unit*)

wt – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Ribosoom on kompleksne masinavärk, mis katalüüsib aminohapete liitmist funktsionaalseteks valkudeks. Üheks levinumaks mudelorganismiks valgusünteesi uurimisel on *Escherichia coli*, kelle ribosoomid koosnevad 54 ribosomaalsest valgust ning 5S, 16S ja 23S ribosomaalsetest RNAdest.

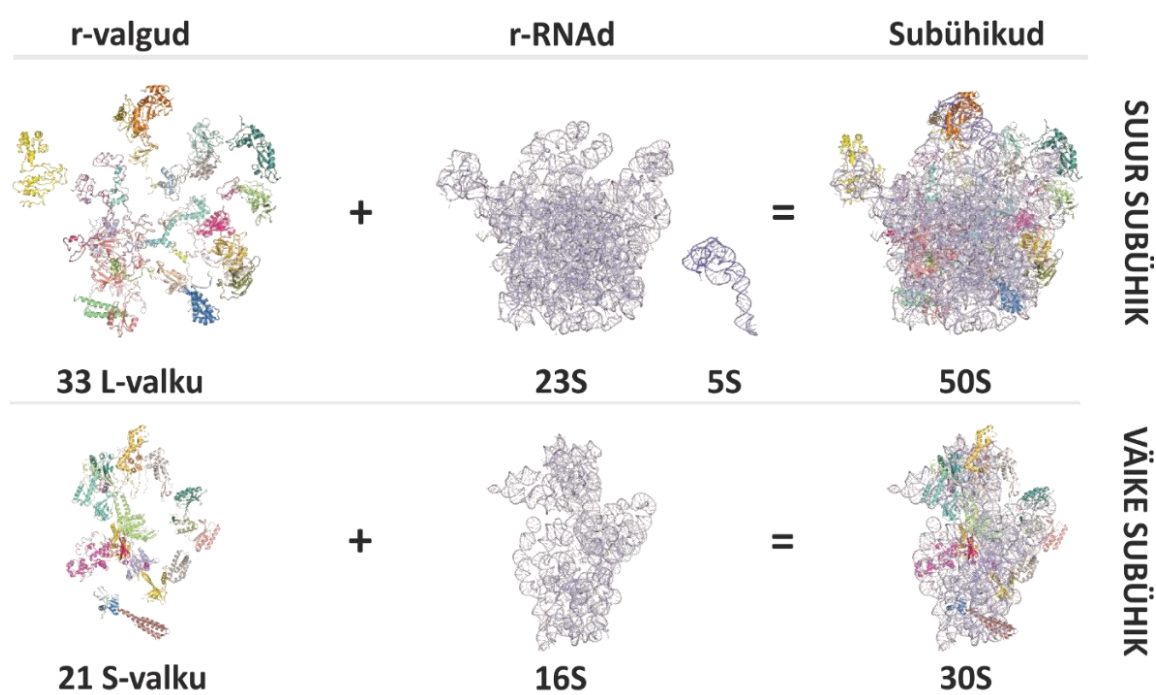
Valgusünteesiks oluline katalüütiline aktiivsus on 23S rRNA domeenis V asuval peptidüültransferaassel tsentril (PTC), kus toimub aminohapetevahelise paptiidsideme süntees. 23S rRNA domeen V sisaldab suuremat osa 23S rRNA modifikatsioonide, milleks on pseudouridiinid ja metüülmodifikatsioonid. 20 aastat tagasi avaldasid Harry Noller ja Rachel Green töö, milles püstitasid hüpoteesi, et 23S rRNA peptidüültransferaasset piirkonda moodustavas RNA ahelas on 80-nukleotiidne järjestus, milles asuvad modifikatsioonid on ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud (Green & Noller, 1996). Hetkel on üldsuse arvamus, et modifikatsioonide rolliks on ribosoomi peenhäälestamine. Varasematest töödest on teada, et eraldiseisvana ei põhjusta domeeni V modifikatsioonide puudumine fenotüübilisi efekte. Erandiks on metüültransferaasi RlmE poolt sünteesitav Um2552.

Käesolevas magistritöö kirjanduslikus osas antakse ülevaade ribosoomist, translatsiooni elongatsioonist ning täpsemalt peptidüültransferaasest tsentril, domeenis V asuvatest modifikatsioonidest ja ribosoomile seonduvate antibiootikumide mõjust valgusünteesile. Töö eksperimentaalses osas selgitatakse 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise mõju valgusünteesile.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Ülevaade *Escherichia coli* ribosoomist

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ensüümid, mis viivad läbi valkude biosünteesi. Erinevalt teistest rakulistest polümeraasidest on ribosoomid RNAI põhinevad ensüümid, mille RNA ja valgu suhe on bakteritel ligikaudu 2:1. Ribosoomi katalüütilise funktsiooni eest vastutab ribosomaalne RNA (rRNA) (Melnikov *et al.*, 2012; Yusupov *et al.*, 2001). Bakteri ribosoom koosneb väikesest 30S ja suurest 50S partiklist (Joonis 1). 30S alaühik koosneb 16S rRNAst (1542 nt) ja 21 ribosoomi valgust (S1-S21) ning 50S alaühik koosneb 23S rRNAst (2904 nt), 5S rRNAst (120 nt) ja 33 ribosoomi valgust (L1-L36) (Joonis 1) (Melnikov *et al.*, 2012; Wittmann, 1976). 30S ja 50S alaühikud moodustavad üheskoos translatsiooniliselt aktiivse 70S ribosoomi partikli. 70S partikli moodustumiseks on vajalikud subühikutevahelised sillad, mis 30S ja 50S partiklite kokkupuutepindasid koos hoiavad (Yusupov *et al.*, 2001).

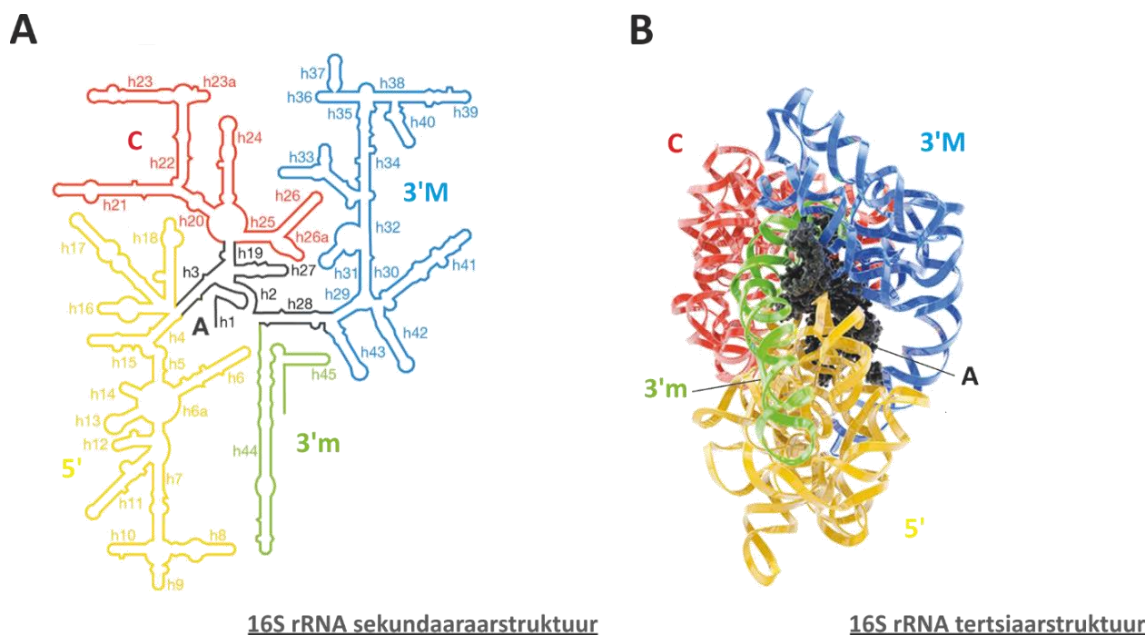


Joonis 1. Bakteriaalse ribosoomi komponendid. r-valgud ja rRNA on kujutatud eraldi ning suure ja väikese ribosomaalse subühiku koosseisus. rRNA on kujutatud hallina ja r-valgud on kujutatud mitmevärvilisena. Joonis kohandatud Rya Ero doktoritööst (Ero, 2012).

1.1. Ribosomaalne RNA

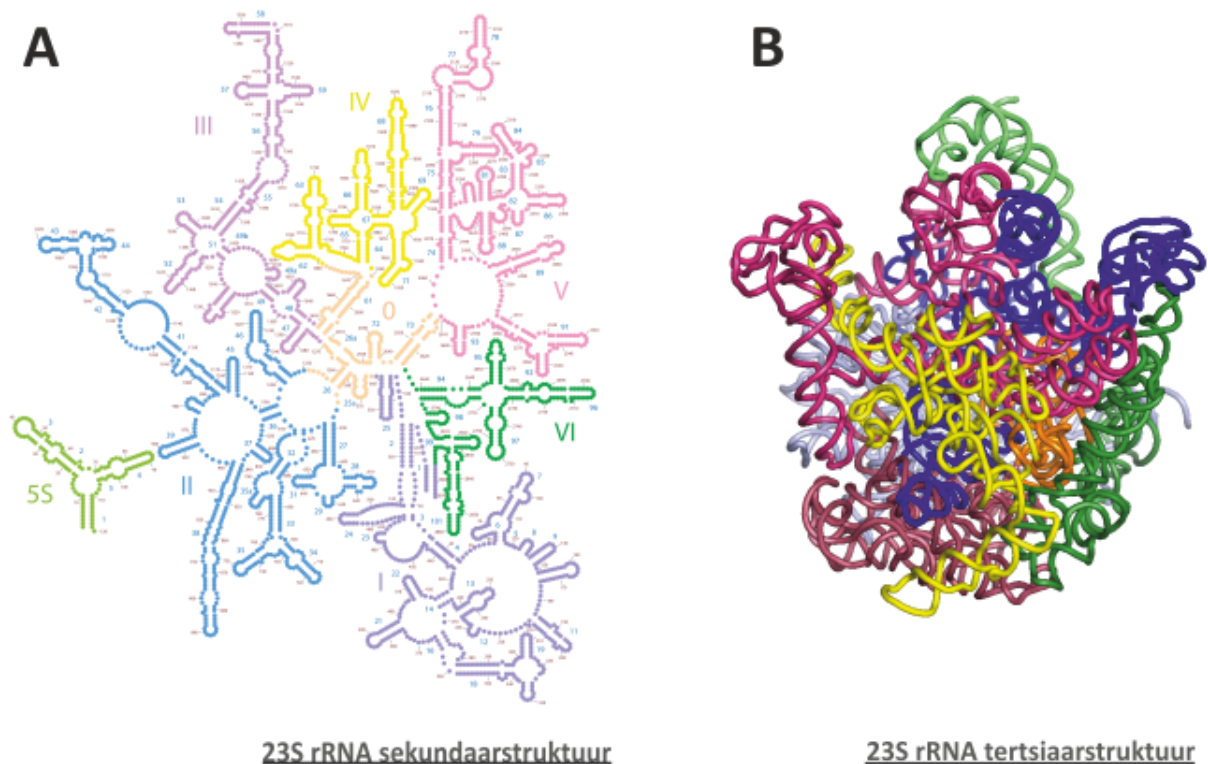
16S rRNA, 30S subühiku põhilise komponendi, sekundaarstruktuuris eristuvad neli suurt domeeni, milleks on tsentraalne domeen (C), 5' domeen (5'), 3' mažoorne domeen (3'M) ning 3' minoorne domeen (3'm) (Joonis 2A). Neid nelja domeeni ühendab domeen A (Gulen *et al.*, 2016), mida peetakse ka väikese subühiku evolutsiooniliseks eellaseks (Petrov *et al.*, 2015).

30S tertsiaarstruktuuris (Joonis 2B) on võimalik sekundaarstruktuuril kujutatud domeene selgelt eristada (Gao *et al.*, 2003; Wimberly *et al.*, 2000).



Joonis 2. 16S rRNA sekundaar- ja tertsiaarstruktuurid. **(A)** 16S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on näidatud 16S rRNA sekundaarstruktuuris eristatavad elemendid tsentraalne domeen (C) (punane), 3' mažoorne (3'M) domeen (sinine), 3' minoorne (3'm) domeen (roheline), 5' domeen (kollane) ning tsentraalne A domeen (must). **(B)** 16S rRNA tertsiaarstruktuur. Sekundaarstruktuuril kujutatud domeenid C, 3'M, 3'm, 5' ja A on tähistatud samade värvidega nagu näidatud paneelil A (Gulen *et al.*, 2016).

2013. aastal restruktureerisid Petrov *et al.* suure subühiku 23S rRNA sekundaarstruktuuri märkimisväärselt (Joonis 3) (Petrov *et al.*, 2013). Varasemat, fülogeneesi põhjal kujutatud 23S rRNA sekundaarstruktuuri kesket osa kujutatakse üheaheelise ringina, millest hargnesid kuus eristatavat domeeni (LISA 1) (Noller *et al.*, 1981). Mudeli restruktureerimise aluseks võeti 23S rRNA tertsiaarstruktuur, mis võimaldas rRNA struktuuri korrektsemalt määrata ja sekundaarstruktuuri domeene täpsemini defineerida. Tänu sellele näidati, et varasemalt üksikahelalise ringina tuntud 23S rRNA keskosa on ribosoomis samuti kõrgelt struktureeritud. Seega defineeriti see domeen 0-na, mis kõiki ülejäänud domeene (I, II, III, IV, V, VI) ühendab (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Erinevalt 16S rRNAst, mille tertsiaarstruktuuris moodustavad viis sekundaarstruktuuri domeeni eristatavad morfoloogilised elemendid (Joonis 2B), on 23S rRNA tihedalt läbipõimunud monoliitne struktuur. See tähendab, et 50S alaühiku ükski sekundaarstruktuuri domeen pole tertsiaarstruktuuri silmas pidades teistest selgelt eristatav (Joonis 3B) (Ban *et al.*, 2000).

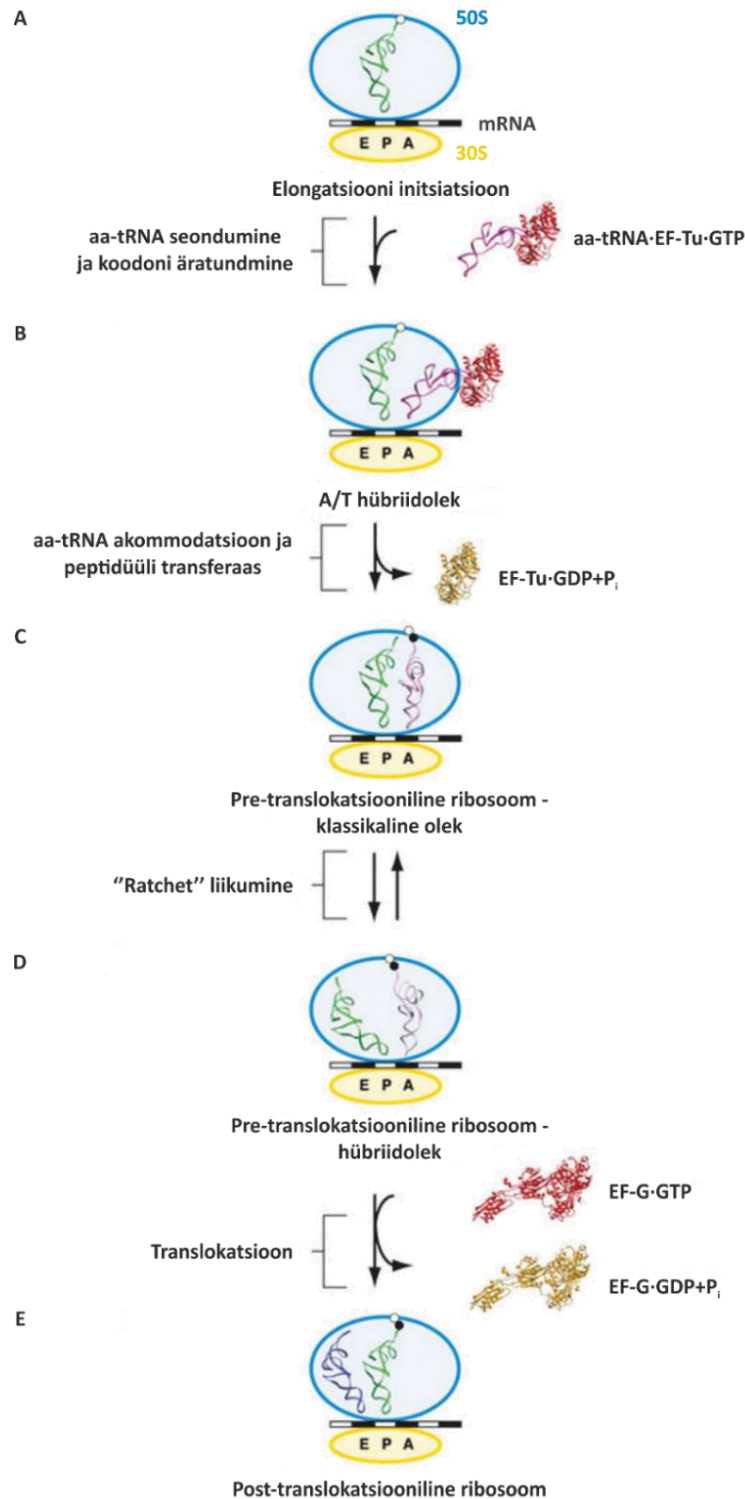


Joonis 3. 23S rRNA sekundaar ja tertsiaarstruktuurid. **(A)** Tertsiaarstruktuuri põhjal restruktureeritud 23S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on märgitud domeenid, I (helelilla), II (sinine), III (tumeroosa), IV (kollane), V (helerosa), VI (tumeroheline) ja 5S rRNA (heleroheline) ja hiljuti defineeritud domeen 0 (beež) (Petrov et al., 2013). **(B)** 23S rRNA tertsiaarstruktuur moodustab monoliitse struktuuri. Sekundaarstruktuuril kujutatud domeenid on värvitud vastavalt paneelil A näidatule (PDB ID: 3R8S).

1.2. Translatsiooni elongatsiooni mudel

Väike subühik sisaldab dekodeerivat tsentrit, kus toimub korrektse aminoatsüleeritud tRNA (aa-tRNA) seleksioon tänu komplementaarsusele mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vahel (Clemons *et al.*, 1999). Suur subühik sisaldab peptidüültransferaas tsentrit, mis katalüüsib uute aminohapete liitmist kasvavale polüpeptiidahelale. Peamine mudel translatsiooni elongatsioonitsüklist koosneb kolmest suurest sammust (Joonis 4). Esiteks seondub aminoatsüleeritud tRNA kompleksis EF-Tu ja GTPga ribosoomi A-saiti (Joonis 4B). Korrektne koodon-antikoodon interaktsioon põhjustab ribosoomi "suletud" konformatsiooni tekke, mis omakorda stabiliseerib tRNA seondumise (Ogle *et al.*, 2002). Seejärel toimub GTP hüdrolüüs, mida vahendab elongatsioonifaktor EF-Tu (Ramakrishnan, 2002). EF-Tu vahendatud GTP hüdrolüüsi järgselt vabaneb viimase küljest tRNA aminoatsüül osa ja liigub 50S subühiku A-saiti, peptidüültransferaassele tsentrile lähemale (Joonis 4C) (Schmeing *et al.*, 2009). Teiseks reageerib A-saiti seondunud aa-tRNA α -amino rühm P-saidis oleva peptidüül-tRNA karbonüülse süsinikuga, et saaks moodustuda peptiidside. Peptiidside tekkimine on spontaanne ja ei vaja lisafaktoreid. Vabanenud peptiidahel kantakse üle A-saidis olevale

tRNAle, mille tulemusena jääb P-saiti deatsüül-tRNA ja A-saiti peptidüül-tRNA, mis on omakorda ühe aminohappe võrra pikem. Elongatsioonitsükel lõpeb peptidüül-tRNA translokeerumisega A-saidist P-saiti ja deatsüül-tRNA liikumisega P-saidist E-saiti, kus ta seejärel ribosoomist dissotsieerub. Translokatsiooni toimumisele aitab kaasa elongatsiooni-faktor EF-G, mis on samuti GTPaas. Translokatsiooni ajal liigub mRNA-tRNA kompleks edasi kolme nukleotiidi ehk ühe koodoni võrra, see võimaldab A-saiti seonduda uuel aa-tRNA-l (Ramakrishnan, 2002).



Joonis 4. Translatsiooni elongatsiooni skeem. **(A)** Kui fMet-tRNA^{fMet} on ribosoomi P-saiti seondunud, **(B)** siis saab ribosoomi väikese subühiku A-saiti seonduda aminoatsüül-tRNA. Korrektne koodon-antikoodon paardumine vallandab EF-Tu GTP hüdrolüüsi ning EF-Tu vabaneb. **(C)** aa-tRNA nihkub 50S A-saiti ning spontaanselt toimub ka peptiidsideme teke. P-saiti jääb deatsüül-tRNA ning A-saiti peptidüül-tRNA. **(D)** Ratchet liikumise tulemusena asetuvad deatsüül-tRNA ja peptidüül-tRNA 3'otsad 50S subühikus vastavalt E- ja P-saitidesse (P/E ja A/P hübridolek). EF-G GTP hüdrolüüs võimaldab translokatsiooni toimumist ning **(E)** deatsüül-tRNA ja peptidüül-tRNA paigutuvad post-translokatsioonilises ribosoomis vastavalt E ja P-saitisesse. Joonis kohandatud (Agirrezabala ja Frank, 2009).

2. 23S rRNA domeenid

Järgnevas peatükis antakse lühiülevaade 23S rRNA domeenidest 0, I, II, III, IV ja VI. Töö temaatikast lähtuvalt keskendutakse detailsemalt domeenile V.

E. coli 23S rRNA koosneb 2904 nukleotiidist, mis sekundaarstruktuuris moodustab seitse domeeni. Kaheksanda domeenina loetakse 50S subühikus 5S rRNAd (Joonis 3). Varem defineeriti rRNA domeeni kui suurt linge, mis sisaldab omakorda väiksemaid linge ja biheelikseid (Noller *et al.*, 1981). Petrov *et al.* defineeris 2013. aastal domeeniks kompaktse ja globulaarse struktuuri, mis on võimeline iseseisvalt voltuma ja mida stabiliseerib domeenisisene molekulaarsete interaktsioonide võrgustik (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen 0

Domeen 0 (23S rRNA nukleotiidid 562–586, 1251–1270, 1648–1678, 1990–2057, 2611–2625), mille Petrov *et al.* sekundaarstruktuuri mudelis ümber defineerisid, moodustub heeliksitest 25a, 26a, 26, 61, 72 ja 73 (Joonis 3A). Heeliks 25a ja 26a moodustati varasemas sekundaarstruktuuris üksikahelatena kujutatud RNA ahelatest. Heeliks 26 positsioneeriti ümber domeenist II, heeliks 61 domeenist IV ja heeliks 72 ning 73 domeenist V. Tsentraalse domeenina moodustab domeen 0 50S partikli tuumiku ja ühendab kõiki teisi 23S rRNA domeene. Domeenil 0 tundub olevat ka teine struktuuriline roll. Ta sisaldab vagu, mis hoiab peptidüültransferaase tsentri A- ja P-piirkondi üksteisele lähedal. Ühtlasi osaleb domeen 0 peptiidahela väljumistunneli alguse moodustamises. Domeen 0 sisaldab üht RNA modifikatsiooni: m⁶A2030 (Golovina *et al.*, 2012; Petrov *et al.*, 2013).

Domeen I

Domeen I sisaldab heelikseid 1-24 (nt 1-561, 2895-2904) (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Domeen I paigutub 50S partikli selgmisse (solvendi poolsesse) piirkonda ja moodustab tertsiaarstruktuuris kontakte domeenidega II, III, IV ja V (Yusupov *et al.*, 2001). 23S rRNA domeeniga I seotud L4 valk seondub ribosoomile biogeneesi varajastes etappides ja osaleb peptiidahela väljumistunneli moodustamises (Schuwirth *et al.*, 2005). *E. coli* 23S rRNA Domeenis I ei ole teada ühtegi RNA modifikatsiooni (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen II

Domeeni II moodustavad heeliks 25, 27-46 (nt 587-1250) (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). See domeen on 23S rRNA suurim domeen ja moodustab suurema osa 50S subühiku selgmisest piirkonnast. Domeen II moodustab tertsiaarstruktuuris kontakte domeenidega III, IV, V ja VI

(Yusupov *et al.*, 2001). Domeen II sisaldab elongatsioonifaktorite seondumise piirkonda GAC ehk GTPaasset tsentrit. GAC on kõrgelt konserveerunud ja vajalik valgusünteesi kiiremaks toimumiseks. Domeenis II on neli RNA modifikatsiooni: m¹G745, Ψ746, m⁵U747 ja Ψ955 (Conrad *et al.*, 1998; Gustafsson ja Persson, 1998; Madsen *et al.*, 2003; Wrzesinski *et al.*, 1995).

Domeen III

Domeen III (nt 1271-1647) sisaldab heelikseid 47-60 (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Moodustades kompaktse globulaarse domeeni paigutub domeen III 50S subühiku alumisse piirkonda. Enim kontakte moodustab domeen III tertsaarstruktuuris domeeniga II, kuid interakteerub ka domeenidega I, IV ja VI. Domeeniga V interaktsioonid peaaegu puuduvad (Ban *et al.*, 2000). Näiteks *Trypanosoma brucei* mitokondriaalsel rRNA puudub üldse domeen III, mis võib viidata, et selle domeeni ülesannetega saavad hakkama ka abistavad r-valgud (Sloof *et al.*, 1985). Domeen III sisaldab modifikatsiooni m⁶A1618 (Sergiev *et al.*, 2008).

Domeen IV

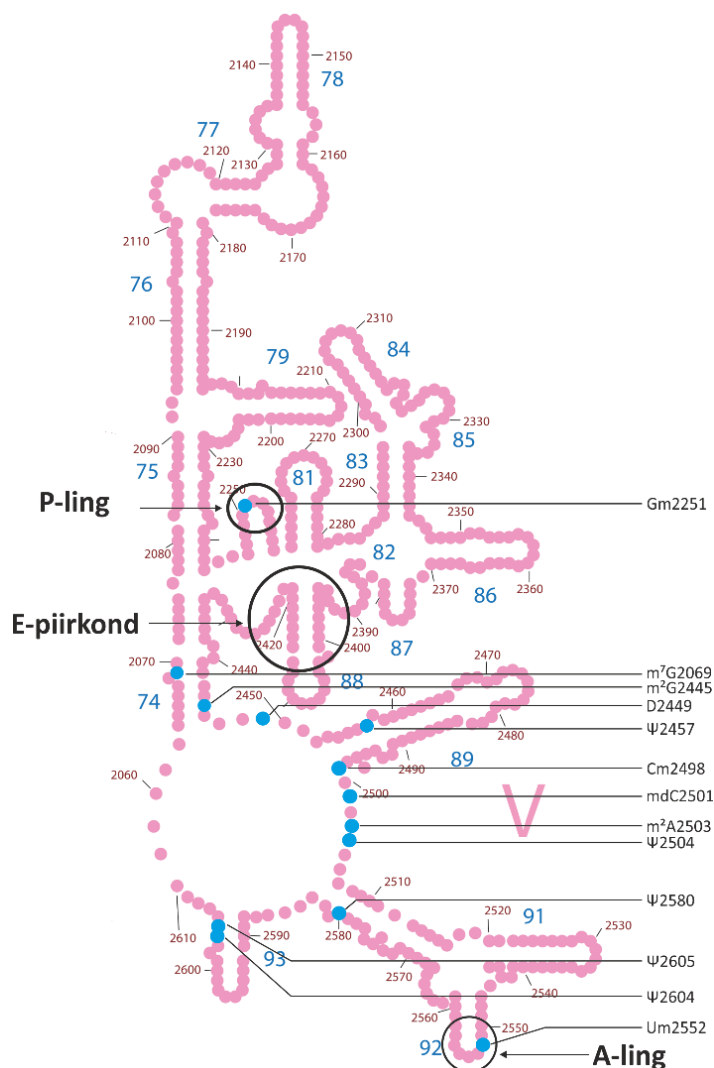
Domeen IV tekib heeliksitest 62-71 (nt 1679-1989) (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013) ja see moodustab suurema osa 50S subühiku kokkupuutepinnast 30S subühikuga (Ban *et al.*, 2000). Seetõttu on domeen IV 23S rRNA põhiline subühikutevaheliste sildade moodustaja. Domeen IV sisaldab kuut modifikatsiooni: m²G1835, Ψ1911, m³Ψ1915, Ψ1917, m⁵U1939 ja m⁵C 1962. Kolm neist (Ψ1911, m⁵Ψ1915, Ψ1917) paiknevad heeliksis 69 ja on fülogeneetiliselt kõrgelt konserveerunud (Campo *et al.*, 2005; Ofengand, 2002).

Domeen V

Domeen V (Joonis 5) moodustub nukleotiididest 2058-2601 ning sisaldab heelikseid 74-93 (Joonis 3A) (Petrov *et al.*, 2013). Domeen V paigutub tertsaarstruktuuris 50S partikli keskele domeenide IV ja II vahele ning interakteerub ka domeenidega I ja VI (Ban *et al.*, 2000). Üks olulisematest valkudest, millega 23S rRNA interakteerub on L1. Selle valgu puudumisel väheneb *E. coli* rakkudes valgusünteesi tase 40-60%. Põhjuseks võib olla peptidüül-tRNA nõrgem seondumine ribosoomile ja vähenenud EF-G-sõltuv GTPaasne aktiivsus (Subramanian & Dabbs, 1980). Kristallograafilised ja krüo-elektronmikroskoopilised andmed viitavad, et L1 valk on ribosoomi struktuuris väga liikuv ja selle funktsioon on kontrollida deatsüleeritud tRNA eemaldamist ribosoomi E-saidist (Agrawal *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Yusupov *et al.*, 2001).

Domeenis V paikneb ribosoomi kõige olulisem piirkond – peptidüültransferaasne tšenter. Aminoatsüül-tRNA sidumisel ribosoomi osaleb A-ling, mille moodustab heeliks-lingu 92 ling (Joonis 5). P-ling seondub peptidüül-tRNAGA ning selle moodustab heeliks-ling 80 (Joonis 5). P-lingu läheduses paikneb E-piirkond (ingl. k *E-site*), kus deatsüleeritud tRNA ribosoomist välja dissotsieerub (Moazed ja Noller, 1989).

Domeenis V paikneb enamuse 23S rRNA modifikatsioone: m⁷G2069 (Wang *et al.*, 2012), Gm2251 (Lovgren ja Wikstrom, 2001), m²G2445 (Lesnyak *et al.*, 2006), hU2449 (O'Connor, 2001), Ψ2457 (Del Campo, Kaya ja Ofengand, 2001), Cm2498 (Purta *et al.*, 2009), mdC2501 (Andersen, Porse ja Kirpekar, 2004), m²A2503 (Toh *et al.*, 2008), Ψ2504 (Conrad *et al.*, 1998), Um2552 (Caldas *et al.*, 2000), Ψ2580 (Conrad *et al.*, 1998), Ψ2604 ja Ψ2605 (Del Campo *et al.*, 2001) (Joonis 5).



Joonis 5. 23S rRNA domeen V. Joonisel on kujutatud A- ja P-lingud, E-piirkond ning kõik domeeni V modifikatsioonid. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Domeen VI

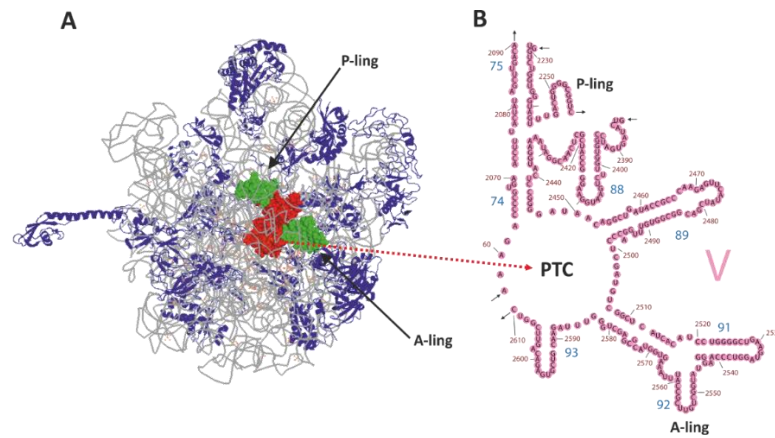
Domeen VI (nt 2667-2914), 23S rRNA kõige väiksem domeen, moodustub heeliksitest 94-97 (Joonis 3A). Domeeni VI stabiliseerivad ribosoomivalgud ja interaktsioonid domeeniga V. Lisaks moodustuvad kontaktid domeenidega II, III ja IV (Ban *et al.*, 2000). Domeeni VI kõige olulisem piirkond on heeliks 95 (nt 2649-2674). Seal paikneb kõrgelt konserveerunud sartsiin-ritsiin ling (SRL), mis aktiveerib EF-G GTPasse aktiivsuse (Clementi *et al.*, 2010). SRL on märklaud ribotoksiinidele, mis on võimelised hüdrolüüsima sartsiin-ritsiin lingi moodustavat

rRNAd. SRLi hüdroolüüs põhjustab ribosoomide inaktivatsiooni. *Escherichia coli* domeenis VI ei ole 23S rRNA modifikatsioone (Fischer *et al.*, 2015).

3. Peptidüültransferaasne tsepter

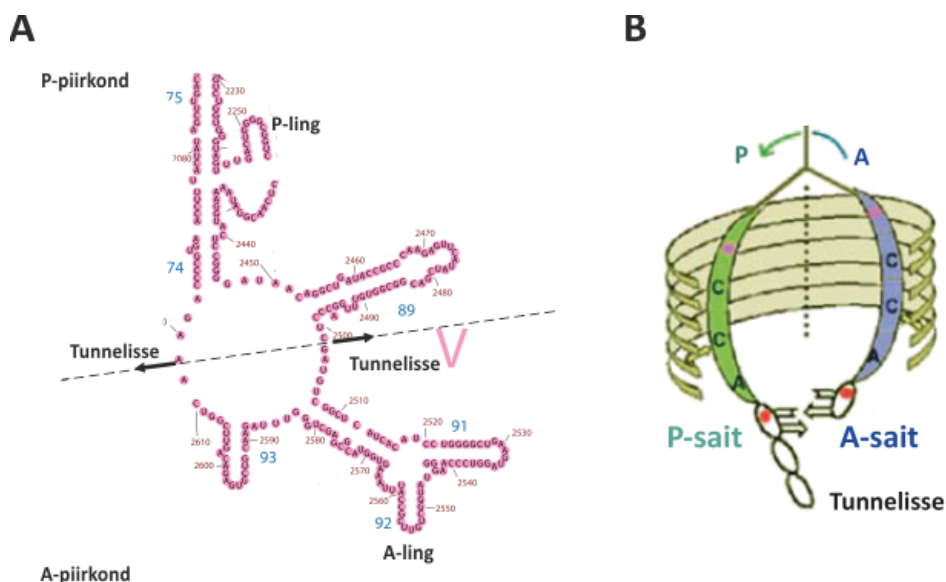
Ribosoomi kõige fundamentaalsemat funktsiooni – peptiidideme sünteesi – viib läbi peptidüültransferaasne tsepter. Juba 60-ndatel pakkus Francis Crick välja, et valkudel põhinev elutegevus võis alguse saada RNA maailmas ning primitiivne valgusünteesimehhanism võiski ainult RNAI põhineda (Crick, 1968). Sarnase hüpoteesi püstitas ka Harry Noller, kuid lisas, et funktsionaalsete valkude süntees ei saanud olla eesmärk omaette. Väikesed peptiidahelad võisid täiustada olemasolevate RNAde stabiilsust ja funktsiooni (Noller, 2004), mis võis omakorda anda olemasolevale eluvormile eeliseid.

Peptiidideme katalüüsi eest vastutab üksnes suur subühik (Monro, 1967). Suure alaühiku kristallstruktuuri uurimisel on leitud, et peptidüültransferaasne (PT) funktsioon on 23S rRNAI (Zhang *et al.*, 1998), mitte valkudel nagu ülejäänud ensümaatilistes reaktsioonides tavaks (Smith *et al.*, 2008). Seda näitas ka Noller *et al.* ja hiljem Khaitovich *et al.*, et suures osas valkudevabal 50S partiklil säilib peptidüültransferaasne aktiivsus (Khaitovich *et al.*, 1999; Noller, Hoffarth ja Zimniak, 1992). Peptidüültransferaasne tsepter moodustub 23S rRNA domeeni V kõrgelt konserveerunud sümmeetrilisest tsentraalsest rõngast (Joonis 6B), mida ümbritseb üldjuhul asümmeetriline ribosoomi struktuur. Proto-ribosoomiks nimetatud piirkonna kolmedimensionaalne struktuur on isegi olulisem, kui järjestuse konserveerumine. Substraatide õige positsioneerimine on peptiidideme tekkeks kõige olulisem, kuid konserveerumine peegeldab substraadi sidumiskohtade olulisust ribosoomis. Tsentraalsem osa sümmeetriapiirkonnast moodustab taskukujulise struktuuri, mille vastaskülgedes asuvad 23S rRNA A- ja P-lingud (Joonis 6A) (Agmon *et al.*, 2005; Davidovich *et al.*, 2009).



Joonis 6. Bakteriaalne peptidüültransferaasne tsepter (PTC). **(A)** 23S ja 5S rRNA-d on hallid, r-valgud on sinised, PTC ring on punane ja A ning P lingud rohelised. **(B)** 23S rRNA domeen V, millele on märgitud peptidüültransferaase ringi asukoht ning A- ja P-lingud. Paneel A (PDB ID:3R8S), paneel B kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

Sümmeetriapiirkond (Joonis 7A) moodustub 180 nukleotiidist ning koosneb kõikides eludomeenides universaalselt või üle 90% konserveerunud nukleotiididest (Doris *et al.*, 2015). Näiteks kolm olulise funktsiooniga konserveerunud nukleotiidi on G2251 ja G2252 P-lingus ning G2553 A-lingus. G2252 ja G2553 moodustavad sümmeetrilised Watson-Crick G-C aluspaarid universaalselt konserveerunud CCA järjestusega vastavalt P- ja A-saidi tRNAde 3' otstes (Hansen *et al.*, 2002; Kim ja Green, 1999; Samaha, Green ja Noller, 1995). See vihjab, et A-saidi tRNA 3' ots orienteerub 180° ümber, kui translokeerub P-saiti (Joonis 7B). tRNA 3' otsa roteeruv osa – C74-A76 – puutub kokku domeeni V nukleotiididega, mis moodustavad peptidüültransferaase tsentri tasku. tRNA 3' otsa roteeruva osa liikumine PTC tasku nukleotiidide abiga võimaldab aminohappe ülekannet kasvavasse peptiidahelasse (Agmon *et al.*, 2003). Lisaks tRNA korreksele positsioneerimisele PTC-s pakuvad Bashan *et al.* välja, et tRNA 3' otsa spiraalne roteerumine paigutab sünteesitava peptiidahela väljumistunneli suhtes õigesti, võimaldades kasvaval peptiidil efektiivselt ribosoomist väljuda (Bashan *et al.*, 2003).



Joonis 7. Peptidüültransferaase tsentri sümmeetriapiirkond. **(A)** Märgitud on PTC sümmeetriapiirkonda kaheks jaotav mõtteline joon ning A- ja P- lingud. Sümmeetriapiirkonda poolitaval teljel on märkitud ka piirkonnad (Tunnelisse), kus paiknevad peptiidi väljumistunneli algust moodustavad nukleotiidid. Joonis kohandatud (Petrov et al., 2013; Agmon et al., 2003). **(B)** tRNA 3' otsa rotatsiooni kujutav skeem PTC tasku sümmeetriapiirkonnas. tRNA 3' otsad on kujutatud banaanikujulisena. Nende vahel on kujutatud sümmeetriapiirkonda poolitav mõtteline piir. Peptidüültransferaase tsentri tasku sein on kujutatud ribadena. Selguse mõttes on jäetud kujutamata PTC tasku esiseina nukleotiidid A2602 ja U2585, mis moodustavad kontakte tRNAga roosade täpikestega märkitud piirkonnas. Joonis kohandatud (Agmon et al., 2005).

Kuigi enamus peptidüültransferaasest tsentrist 10Å raadiuses asetsevatest nukleotiidest on konserveerunud, siis 100% konserveerunud on neist ainult seitse. Neli neist paiknevad PTC tasku seinal: G2061, A2451, C2452 ja C2573, mis interakteeruvad tRNA roteeruva 3' otsaga (Agmon *et al.*, 2005). Peptidüültransferaase tsentri läheduses asub ka enamus 23S rRNA modifikatsioone. *E. coli* 23S rRNA A-lingus paikneb konserveerunud G2553 kõrval kõrgelt konserveerunud modifitseeritud nukleotiid Um2552. P-lingu konserveerunud nukleotiid G2251 on 2'O metüleeritud (Gm2251) (Caldas *et al.*, 2000; Lövgren ja Wikstrom, 2001). Ülejäänud modifikatsioonid asuvad PTC taskut moodustaval peptidüültransferaassel rõngal või sellest hargnevatel heeliksiteel (Del Campo, Kaya ja Ofengand, 2001; Lesnyak *et al.*, 2006; Purta *et al.*, 2009; Toh *et al.*, 2008).

4. RNA modifikatsioonide üldiseloostus

Tänapäevaks on leitud üle 100 erineva RNA modifikatsiooni (Rozenski, Crain ja McCloskey, 1999). rRNA lõplikuks valmimiseks on tarvis mitmeid lämmastikaluste või ribooside modifikatsioone. *E. coli* ribosomaalne RNA sisaldab 36 modifikatsiooni, kuid näiteks pärmi ribosoom sisaldab umbes sadat ja inimese ribosoom üle kaheksa modifikatsiooni (Decatur ja Fournier, 2002; Ofengand ja Fournier, 1998). RNA modifikatsioone on võimalik jagada neljaks

grupiks (Grosjean, 2005). Esimesse gruppi kuulub uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks (5'-ribosüül-uratsiil; Ψ), teise grupi moodustavad lämmastikaluse metülatsioonid, deaminatsioon inosiiniks, reduktsioon dihidrouridiiniks ja kolmandasse gruppi kuuluvad 2'-hüdrosüülrühma metülatsioonid. Neljanda grupi moodustavad haruldasemad kompleksed modifikatsioonid (Chow, Lamichhane ja Mahto, 2007). Lisaks on Siibak ja Remme andmete järgi võimalik modifikatsioone grupeerida nende ajalise tekkimise järgi ribosoomi assambleerumise käigus: varased, hilised ja keskmised (Siibak & Remme, 2010).

4.1. rRNA modifikatsioonid

Kõikidest modifikatsioonidest esineb rRNAdes enim pseudouridiini ja metülatsioone (Maden ja Hughes, 1997; Maden, 1990). Arhede ja eukarüootide ribosoomid sisaldavad modifikatsioonidest enim pseudouridiini (Dennis, Omer ja Lowe, 2001; Kiss, 2001), kuid bakterite ribosomaalne RNA sisaldab enim lämmastikaluse metülatsioone (Cantara *et al.*, 2011). Ribosoomi väike subühik võib mõnedes organismides funktsioneerida ka ilma pseudouridiinideta samal ajal kui mõne organismi väike subühik sisaldab pea 40 pseudouridiini. Arvatakse, et üldiselt vajab suur subühik optimaalseks funktsioneerimiseks vähemalt üht pseudouridiini, kuid võib sisaldada 50-60 pseudouridiini (Ofengand *et al.*, 2001). *E. coli* 23S rRNA sisaldab kokku kümme pseudouridiini, millest pooled asuvad peptidüültransferaase tsentri läheduses.

Lämmastikaluse modifikatsioone on *E. coli* väikeses subühikus kümme ja suures subühikus neliteist. Peamised nukleosiidi metülatsioonmodifikatsioonid on C-, N-, või O-metülatsioonid. Lisaks on suures subühikus metüleeritud pseudouridiin, dihidrouridiin ja 5-hüdrosütsütidin (Caldas *et al.*, 2000; Hama ja Ferré-D'Amaré, 2006; Havelund *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2001). Sagedasemad metülatsioonid on näiteks N2 positsioonist metüleeritud guanosiin (m_2G või N2-metüülguanosiin) ja riboosi 2'-hüdrosüülrühma metülatsioon (Nm). *E. coli* viiest N2-metüülguanosiinist kaks asub 23S rRNAs. Üks asub domeeni IV heeliksis 68 (m_2G1835), mis on heeliksi 69 ja seega ka subühikutevaheliste sildade B2b ja B2c läheduses. Teine modifikatsioon asub domeeni V heeliksis 74 (m_2G2445), mis hargneb välja PTC tsentraalsest rõngast (Lesnyak *et al.*, 2006; Sergiev *et al.*, 2006). 2'-hüdrosüülrühma metülatsioone on *E. coli* ribosomaalses rRNAs kokku neli. Kolm neist asuvad 23S rRNAs (Cm2498, Gm2251, Um2552) ning üks 16S rRNAs ($m^4Cm1402$) (Caldas *et al.*, 2000; Lovgren ja Wikstrom, 2001; Purta *et al.*, 2009).

Tavaliselt paiknevad rRNA modifikatsioonid enim konserveerunud funktsionaalsetes piirkondades ning mõned modifikatsioonid on ise evolutsiooni käigus konserveerunud

(Brimacombe *et al.*, 1993; Caldas *et al.*, 2000). Modifitseeritud nukleotiidide kontsentreerumine funktsionaalsetesse tsentritesse viitab modifikatsioonide vajalikkusele ribosoomi funktsioneerimisel. Enim konserveerunud pseudouridiinid paiknevad 23S rRNA heeliksis 69 (Ψ 1911, Ψ 1915, Ψ 1917), mis osaleb subühikutevaheliste sildade moodustamisel ja asub A- ning P-saidi tRNAde vahel (Ofengand *et al.*, 2001).

Ribosoomi suure subühiku funktsioneerimiseks on modifikatsioonid olulisemad kui väikese subühiku puhul. Rachel Green ja Harry Noller pakkusid välja hüpoteesi, et domeeni V peptidüültransferaasse tsentri piirkonnas paikneb 80-nukleotiidne piirkond (nt 2445-2623) (Joonis 5), mille modifikatsioonid on ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud. *In vitro* sünteesitud 23S rRNA, mis ei sisalda ühtegi modifikatsiooni, ei suuda assambleeruda funktsionaalseks subühikuks (Green & Noller, 1996). Samas näitasid Green ja Noller mõned aastad hiljem, et *Bacillus stearothermophiluse in vitro* konstrueeritud modifikatsioonideta 23S rRNA, säilis peptidüültransferaasne aktiivsus, kuigi see oli 10x vähenenud (Green & Noller, 1999). Eelmainitud 80-nukleotiidse piirkonna sees paikneb seitse modifikatsiooni: m_2G2445 , D (dihüdrouridiin) 2449, Ψ 2457, Cm2498, m_2A2503 ja Ψ 2504 (Green & Noller, 1996) ning hiljuti avastatud oh^5C2501 (Joonis 5) (Havelund *et al.*, 2011). Lisaks asuvad peptidüültransferaasse tsentri läheduses ning A- ja P-lingudes ülejäänud domeeni V modifikatsioonid (m^7G2069 , Gm2251, Um2552, Ψ 2580, Ψ 2604, Ψ 2605) (Sergiev *et al.*, 2011).

Modifikatsioonide keemilised omadused ei viita spetsiifilistele funktsionaalsetele omadustele, kuid on selge, et nukleotiidide modifitseerimine võib endaga kaasa tuua mitmeid rRNA struktuurseid muutuseid. Näiteks pseudouridiinidel on N-1 positsioonis vaba vesiniksideme doonor, mis võimaldab stabiliseerida rRNA tertsaarstruktuuri (Noeske *et al.*, 2015). Ribooosi 2'-hüdrosüülrühma metülatsioonid suurendavad RNA stabiilsust hüdrolüüsi suhtes (Helm, 2006) ning vesiniksideme doonori eemaldamisega tekib võimalus hüdrofoobseteks kontaktideks (Sergiev *et al.*, 2011). Alusmetülatsioonid suurendavad lämmastikaluste *stackingut* (Yarian *et al.*, 1999). Erinevad tulemused viitavad, et enamasti pole individuaalselt rRNA modifikatsioonidel valgusünteesile suurt efekti. Siiski on spekuleeritud, et modifikatsioonide kaotamine rRNAst omab kumulatiivset efekti, seega võivad modifikatsioonid rolli mängida translatsiooni peenregulatsioonil (ingl.k *fine-tuning*) (Decatur ja Fournier, 2002; Ofengand ja Fournier).

4.2. *E. coli* 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümid ja modifikatsioonid

Domeeni V pseudouridiinid ja nende süntaasid

Pseudouridiine sünteesivad pseudouridiinisüntaasid. Need ensüümid katalüüsivad kohtspetsiifiliselt rRNA ahelas uridiini jääkide isomerisatsiooni pseudouridiinideks. Pseudouridiinisüntaasid ei vaja uridiini isomerisatsiooniks lisaenergiat ega -faktoreid. Selleks, et Ψ -süntaasid juhuslikult U nukleotiidist RNA ahelas pseudouridiini ei sünteesiks on substraadi äratundmine väga oluline (Koonin, 1996). Eukarüootide ja arhede rRNA modifitseerimiseks on lisaks süntaasile tarvis ka abistavaid snoRNAsid, mille abil saavutatakse ensüümi kõrge spetsiifilisus õige nukleotiidi suhtes (Kiss, 2001). Eubakterite pseudouridiini süntaasid saavutavad spetsiifilisuse nii järjestusliku kui struktuurse informatsiooni põhjal. *E. coli* ensüümide põhjal on pseudouridiini süntaasid jagatud viide gruppi: RluA, RsuA, TruA, TruB ja TruD (Kaya & Ofengand, 2003; Koonin, 1996). Tavaliselt on iga pseudouridiini sünteesimiseks individuaalne ensüüm, kuid mõned pseudouridiinisüntaasid sünteesivad RNAsse rohkem kui ühe pseudouridiini. Näiteks RluC ja RluD sünteesivad 23S rRNAs kolme pseudouridiini (Conrad *et al.*, 1998; Leppik *et al.*, 2007). Lisaks on RluA võimeline uridiini isomeriseerima nii rRNA kui tRNA (Raychaudhuri *et al.*, 1999).

Escherichia coli 23S rRNA domeeni V pseudouridiine sünteesivad RluB, RluC, RluE ja RluF. (Conrad *et al.*, 1998; Del Campo *et al.*, 2001). **RluB** katalüüsib pseudouridiini sünteesi 23S rRNA positsioonis U2605 ning viimase kõrval positsioonis U2604 katalüüsib pseudouridiini sünteesi **RluF**, mis on RluB homolog. Lisaks leidsid Del Campo *et al.*, et RluF ei oma täielikku spetsiifilisust positsiooni U2604 suhtes, vaid võib vähesel määral modifitseerida ka U2605. Sama töö raames identifitseeriti ka modifikatsiooniensüüm **RluE**, mis katalüüsib pseudouridiini sünteesi 23S rRNA positsioonis U2457. Nende ensüümide deletsioonid ei põhjusta muutuseid rakkude generatsiooniaegades. Ka $\Delta rluB \Delta rluF$ topeltnutandil ei ole keskmistel temperatuuridel täheldatud fenotüübilisi defekte võrreldes metsiktüüpi tüvega (Del Campo *et al.*, 2001). Samas põhjustab $\Delta rluB$ külmatundlikkuse fenotüüpi. Lisaks akumulereuvad madalatel temperatuuridel vabad 30S ja 50S partiklid ning väheneb 70S partiklite osakaal rakkudes. Sellegipoolest pole veel täiesti selge, kas defekt tuleneb RluB poolt sünteesitava modifikatsiooni puudumisest või omab RluB rakus ka mingit muud funktsiooni (Jiang *et al.*, 2007). Näiteks võib RluB olla faktor 23S rRNA korrektseks pakkimiseks. RluE kohta on teada, et *in vitro* substraadiks saab olla vaba 23S rRNA, kuid *in vivo* substraat pole veel kindlaks määratud (Del Campo *et al.*, 2001). RluB, RluE ja RluF katalüüsivad modifikatsioonide

sünteesi ribosoomi varajases kokkupakkimise faasis (Siibak ja Remme, 2010), seega on tõenäoliselt nende ensüümide substraadiks suures enamuses valkudevaba 23S rRNA.

RluC on pseudouridiinisüntaas, mis katalüüsib 23S rRNAs kolme uridiini isomeriseerumist pseudouridiiniks positsioonidel U955 (domeen II), U2504 (domeen O) ja U2580 (domeen V) (Conrad *et al.*, 1998). *rluC* deletsioonitüvel ei esine kasvudefekte (Conrad *et al.*, 1998). Samas, pseudouridiin positsioonis 2504 suurendab raku resistentsust mitmetele antibiootikumidele, näiteks tiamuliinile, klindamütsiinile ja linesoliinidele. Kuigi *rluC* geeni võib leida mitmete α -proteobakterite genomist, siis ei ole see geen universaalselt konserveerunud. Kasvudefeki puudumine viitab samuti, et need pseudouridiinid ei ole ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud. (Toh ja Mankin, 2008). Sarnaselt teistele domeeni V pseudouridiinisüntaasidele sünteesib ka RluC modifikatsioon ribosoomi varajases assambleerimise faasis (Siibak & Remme, 2010).

Domeeni V metüülmodifikatsioonid ja metüültransferaasid

23S rRNA domeeni V metüülmodifikatsioone sünteesivad viis metüültransferaasi: RlmB, RlmE, RlmKL, RlmM ja RlmN (Caldas *et al.*, 2000; Lovgren ja Wikstrom, 2001; Purta *et al.*, 2009; Toh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Üldjuhul koosnevad metüültransferaasid kahest domeenist. Kuna metüültransferaasid kasutavad metüülrühma doonorina S-adenosüül-L-metioniini (SAM), siis sisaldavad nad SAM-i siduvat domeeni. SAM-i siduv järjestus on nõrgalt konserveerunud, kuid kõik metüültransferaasid seovad kofaktorit samas ekvivalentses positsioonis. Teine, substraati siduv domeen on samuti väga varieeruv (Martin ja McMillan, 2002).

RlmB katalüüsib 2'-O-metülatsiooni P-lingu universaalselt konserveerunud positsioonis G2251. *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalsed ribosoomid ei ole funktsionaalsed kui rakus puudub vastav metüültransferaas. Funktsionaalsuse defekt ei teki aga modifikatsiooni puudumisest, vaid RlmB analoogil Pet56p ensüümil endal on tõenäoliselt mingi teine funktsioon ribosoomi assambleerimisel. Lisafunktsioon võib tuleneda Pet56p N-terminaalse osa 143-aminohappelisest pikendusest, mis puudub *E. coli* RlmB-l (Lovgren ja Wikstrom, 2001; Sirum-Connolly ja Mason, 1993). *E. coli* kasvukiirus $\Delta rlmB$ tüvel ei erine metsiktüüpi tüvest. Samuti ei ole $\Delta rlmB$ tüvi võrreldes *rlmB*⁺ tüvega vähem konkurentne ja valgu puudumisel ei ole *wild type* rakud võimelised neid kasvukeskkonnast välja konkureerima (Lovgren ja Wikstrom, 2001). Erinevalt domeeni V pseudouridiinidest katalüüsitakse Gm2251 ribosoomi

assambleerimise keskmises faasis (Siibak ja Remme, 2010). Seega võib RlmB vajada mingit konkreetset 23S rRNA struktuuri või valk-rRNA kompleksi.

RlmE on metüültransferaas, mis kuulub kuumašokivalkude perekonda, ja katalüüsib 2'-O-riboosi metülatsiooni positsioonis U2552 (Caldas *et al.*, 2000). Um2552 on universaalselt konserveerunud nukleotiid peptidüültransferaasse tsentri A-lingus (Moazed & Noller, 1989). Lisaks on RlmE ise konserveerunud kõigis kolmes eludomeenis (Caldas *et al.*, 2000). Kuna *rlmE* deletsioon *E. coli*s suurendab translatsiooni defekte, on uridiini metülatsioon 23S rRNA positsioonis 2552 ilmselt vajalik translatsiooni täpsuse optimeerimiseks. Võrrelduna metsiktüübiga põhjustab Um2552 metülatsiooni puudumine kaks korda pikemat generatsiooniaega rikkas söötmes temperatuurivahemikus 10-42°C. Kuigi RlmE on kuumašoki valk, siis on ensüüm raku füsioloogia seisukohast oluline temperatuurist sõltumatult. Ühtlasi akumulatsioonid RlmE deletsioonitüves vabad 45S, 50S ja 30S subühikud ning proportsionaalselt väheneb funktsionaalsete 70S ribosoomide hulk (Bugl *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2000). Siibak ja Remme tegid kindlaks, et RlmE modifitseerib oma substraati ribosoomi assambleerumise hilises etapis (Siibak & Remme, 2010). Hiljuti tõestati, et *rlmE* deletsioonist põhjustatud akumulatsioonid 45S partikkel on küpse 50S ribosomaalse subühiku eellaspartikkel. Sealjuures näidati, et RlmE substraadiks on pigem 45S prekursor ning U2552 metülatsioon on vajalik 50S partikli kiiremaks lõpuni valmimiseks (Arai *et al.*, 2015). Kahe väikese GTPaasi, Obg ja EngA, üleekspressioon kompenseerib RlmE puudumisest tingitud kasvudefekte (Tan, Jakob ja Bardwell, 2002).

RlmKL on bifunktsionaalne metüültransferaas, mis katalüüsib m⁷G2069 ja m²G2445 modifikatsioonide lisamist *E. coli* 23S rRNAse (Wang *et al.*, 2012). RlmKL sünteesib modifikatsioone 50S partikli varajases assambleerumisjärgus (Siibak ja Remme, 2010; Wang *et al.*, 2012). Oma struktuurilt on RlmKL teistest RNA metüültransferaasidest erinev, kuna on aminohappeliselt järjestuselt umbes kaks korda pikem. Kui tavaliselt koosnevad metüültransferaasid kahest domeenist, siis RlmKL koosneb neljast domeenist (Wang *et al.*, 2012). Arvatakse, et *E. coli* RlmKL metüültransferaas on kahest erinevast ensüümist evolutsiooni käigus kokku liitunud ensüüm. Ensüümi fuseerumise teooriat toetab ka fakt, et RlmL funktsiooni omab ensüümi N-terminaalne domeen, mis katalüüsib m²G2445 sünteesi, ning RlmK funktsiooni täidab C-terminaalne domeen, mis katalüüsib omakorda m⁷G2069 sünteesi (Kimura *et al.*, 2012). m²G2445 on 23S rRNA järjestustes kõrgelt konserveerunud (Cannone *et al.*, 2002) ja paikneb PTC tsentraalselt rõngalt haruneva heeliksi 74 tüves. *rlmKL*

geeni deletsioon põhjustab võrreldes metsiktüüpi tüvega veidi aeglasemat kasvukiirust, seega võib järeldada, et RlmKL poolt katalüüsitud modifikatsioonid omavad rolli translatsiooni peenhääletamisel (Lesnyak *et al.*, 2006).

RlmM katalüüsib 2'-O-riboosi metülatsiooni 23S rRNA positsioonis C2498 (Cm2498) (Purta *et al.*, 2009). RlmM on võimeline modifikatsiooni sünteesima valkudevabal 23S rRNA, kuid mitte 70 ribosoomi partiklil. Ribosoomi eellaspartiklite analüüs selgitas, et RlmM metüleerib 23S rRNA ribosoomi assambleerimise keskmises faasis (Purta *et al.*, 2009; Siibak ja Remme, 2010). $\Delta rlmM$ tüvi on veidi nõrgema fitnessiga kui kontrolltüvi. See tähendab, et mutanttüvi ei suuda konkureerida metsiktüüpi tüvega (Purta *et al.*, 2009). Arvatakse, et kuna 2'O metülatsioon lisab hüdrofoobsust, võimaldab see RNA tertsaarstruktuuri stabiliseerida (Sergiev *et al.*, 2011), mis viitab jällegi, et 23S rRNA modifikatsioon osaleb 50S partikli struktuuri või translatsiooni optimeerimisel.

RlmN on ensüüm, mis metüleerib nukleotiidi A2503 nii, et tekib m²A2503 (Kowalak, Bruenger ja McCloskey, 1995; Toh *et al.*, 2008). *Staphylococcus aureus* sisaldab RlmN homologgi Cfr, mis metüleerib samuti 23S rRNA nukleotiidi A2503 (*E. coli* nomenklatuuri järgi). Erinevalt RlmNist metüleerib Cfr adeniini kaheksanda süsiniku (C8) juurest, moodustades m⁸A2503 (Giessing *et al.*, 2009). *S. aureus* tekitab Cfr poolt katalüüsitud modifikatsioon PhLOPSa fenotüübi ehk resistentsuse fenikoolide (nt. klooramfenikool), linkosamiidide (nt. klindamütsiin), oksasolidinonide (nt. linesoliid), pleuromutiliinide (nt. tiamuliin) ja streptogramiin A antibiootikumide (nt. virginiamütsiin M₁) vastu. Kõik need antibiootikumid on meditsiinis või veterinaarmeditsiinis olulised (Long *et al.*, 2006). Ka *Clostridium difficile*st leiti Cfr valgule sarnase funktsiooniga ensüüm, mis *E. coli*s ekspresseerides vähendas rakkude tundlikkust antibiootikumide klindamütsiin ja linesoliid suhtes (Hansen ja Vester, 2015). *E. coli* $\Delta rlmN$ tüvel väheneb tundlikkus kahekordselt tiamuliini, hügromütsiini A ja sparsomütsiini vastu võrreldes *wild type* tüvega. *E. coli* kasvukiirusele ei ole aga modifikatsiooni puudumisel positsioonis A2503 suurt mõju. Kasvu konkurentsikatsetes siiski ilmnes, et võrreldes kontrolltüvega on mutanttüve fitness veidi madalam (Toh *et al.*, 2008). Sarnaselt enamusele domeeni V modifikatsioonensüümidele katalüüsib ka RlmN A2503 metülatsiooni 50S partikli varajases assambleerimise etapis (Siibak ja Remme, 2010). Seega võib RlmN funktsioon olla nii tundlikkuse vähendamisel antibiootikumide suhtes kui translatsiooni peenhäälestamine.

5. Ülevaade valgusünteesi inhibeerivatest antibiootikumidest

Evolutsiooniliselt on ribosoom kujunenud üheks peamiseks antibiootikumide sihtmärgiks (Toh ja Mankin, 2008). Aktinomütseetide gruppi kuuluvad Gram positiivsed bakterid toodavad enamuse teadaolevatest antibiootikumidest, mille sihtmärgiks on bakteri ribosoom (Cundliffe, 1989). Lisaks looduslikele antibiootikumidele püüavad teadlased välja arendada ka sünteetilisi antibiootikume, kuna looduslike antibiootikumide väärkasutamisest on tekkinud antibiootikumiresistentsed bakteritüved (Walsh, 2003).

Antibiootikume tootvatel bakteritel on evolutsiooni käigus välja arenenud mehhanismid enesetapu vältimiseks. Levinud enesekaitse mehhanismideks on näiteks aktiivne antibiootikumide transport rakust välja, antibiootikumi molekuli modifitseerimine ja ka rRNAde modifitseerimine antibiootikumi sihtmärkkohdades. Paljud patogeensed bakterid on need kaitsemehhanismid üle võtnud, mis kujutab ohtu kliinilises meditsiinis infektsioonide ravimisel (Liu ja Douthwaite, 2002).

Üheks rRNA modifikatsioonidega seotud antibiootikumide resistentsuse näiteks on eelpool mainitud rRNA spetsiifilise modifikatsiooniensüümi RlmN homoloogi Cfr poolt katalüüsitud modifikatsioon, mis põhjustab mitmete antibiootikumide vastu tundlikkuse vähenemist või resistentsuse teket (Hansen ja Vester, 2015; Long *et al.*, 2006). Antibiootikumide laialdase kasutuse tõttu on tekkinud selektiivne surve. Horisontaalse geeniülekanega tekib juurde neid *Staphylococcuse* bakteritüvesid, mis on omandanud *cfr* geeni ning on muutunud mitmetele veterinaarmeditsiinis kasutatavatele antibiootikumidele resistentseks (Wendlandt *et al.*, 2015). Ka mitmeid 16S rRNA metüülatsioone on seostatud resistentsuse suurenemisega erinevate antibiootikumides suhtes. Üldjuhul katalüüsivad selliseid modifikatsioone eksogeensed metüültransferaasid, mille geene kannavad erinevad resistentsusega seotud plasmiidid (Wachino ja Arakawa, 2012).

5.1. 30S subühiku funktsioneerimist inhibeerivad antibiootikumid

30S subühiku peamine ülesanne on dekodeerimine ehk tRNAde selekteerimine vastavalt koodon-antikoodon aluspaardumise interaktsioonile. Seetõttu on 16S rRNA mõnede antibiootikumide (aminoglükosiidid ja tetratsükliinid) sihtmärgiks (Long ja Vester, 2008). Peamiselt seonduvad need antibiootikumid 16S rRNA nukleotiididega, mis asuvad mRNA ja tRNA seondumispiirkondade läheduses, inhibeerides initsiatsiooni. Teise variandina

seonduvad antibiootikumid nende nukleotiidide lähedusse, mis osalevad rRNA struktuurilistes ümberkorraldustes dekodeerimise ajal (Wilson, 2014).

Aminoglükosiidide klassi kuuluvad antibiootikumid (näiteks kanamütsiin) seonduvad 16S rRNA dekodeerivas tsentris heeliksiga 44 (h44). Need antibiootikumid vähendavad translatsiooni käigus tRNA selektsiooni täpsust (Davies ja Davis, 1968) ning inhibeerivad spontaanset ja EF-G katalüüsivat translokatsiooni (Cabanas *et al.*, 1978; Peskeet *et al.*, 2004). Lisaks seonduvad aminoglükosiidid ka 23S rRNA heeliksiga 69 (Scheunemann *et al.*, 2010) ning takistavad ribosomaalsete subühikute normaalset dissotsieerumist ja taaskasutamist (Borovinskaya *et al.*, 2007). Tetratsükliinide klassi kuuluvate antibiootikumide (näiteks doksütsükliin) peamiseks seonduvaks 30S subühikus on A-saidi tRNA antikoodon heeliks-ling. Seetõttu takistatakse aa-tRNAde korrektset positsioneerumist A-saiti (Pioletti *et al.*, 2001). Lisaks on tetratsükliinidel nõrgemaid seonduvaskohti ka 23S rRNA peptidüültransferaasse rõnga piirkonnas. Kuigi tetratsükliinide seonduvine 23S rRNAle on sarnane klooramfenikoolile, siis ei põhjusta see *in vitro* peptidüültransferaasi reaktsiooni inhibeerimist (Oehler *et al.*, 1997).

5.2. 50S subühiku funktsioneerimist inhibeerivad antibiootikumid

50S subühiku funktsioone inhibeerivad peamiselt makroliidide klassi kuuluvad antibiootikumid (näiteks erütromütsiin), linkosamiidid (näiteks klindamütsiin), oksasolidinoonid (näiteks linesoliid) ja klooramfenikool. Need antibiootikumid ründavad peptidüültransferaasset tsentrit ja inhibeerivad peptiidsiteme teket, takistades tRNAde korrektset paigutumist suure subühiku A- ja P-saiti. Lisaks on antibiootikumide sihtmärgiks ka peptiidahela väljumistunnel, mille kaudu blokeeritakse sünteesitava peptiidahela väljumine ribosoomist (Wilson, 2014).

Makroliidide klassi kuuluvad antibiootikumid seonduvad PTC lähedusse sünteesitava peptiidi väljumistunnelisse. Seega takistavad makroliidid peptiidahela sünteesi, põhjustades peptidüül-tRNA *drop-offi* koos lühikese (6-10 aminohapet) sünteesitud peptiidahelaga (Kannan ja Mankin, 2011; Tenson, Lovmar ja Ehrenberg, 2003). Erütromütsiin kontakteerub nukleotiididega A2058 ja A2059 23S rRNA peptidüültransferaasses ringis ning moodustab nende nukleotiididega kokku kolm vesiniksidet. Makroliididele resistentsete bakterite 23S rRNA positsioonist A2058 on leitud enim mutatsioone, mis on tõenäoliselt resistentsuse tekke põhjuseks (Schlunzen *et al.*, 2001). *erm* geenide poolt kodeeritavad metüültransferaasid mono- või dimetüleerivad 23S rRNA A2058 (näiteks m⁶2A), mis põhjustab lisaks makroliididele

resistentsust ka linkosamiididele ja B tüüpi streptogramiinidele (Douthwaite, Fourmy ja Yoshizawa, 2005).

Linkosamiidide klassi kuuluvad antibiootikumid interakteeruvad 50S subühiku A- ja P-saitidega (Kallia-Raftopoulos, Kalpaxis ja Coutsogeorgopoulos, 1994). Klindamütsiin moodustab vesiniksideme nukleotiidiga A2058 (Steiner, Kuechler ja Barta, 1988). Lisaks peptidüültransferaasi reaktsiooni inhibeerimisele põhjustab klindamütsiin sarnaselt makroliididele ka tRNA *drop-offi*. Üldjuhul akumulerevad klindamütsiini toimet rakkudes di-, tri- ja tetrapeptidüül-tRNAd (Tenson *et al.*, 2003).

Oksasolidinoonide esindaja linesoliid on sünteetiline antibiootikum ning inhibeerib valgusünteesi Gram-positiivsetes bakterites, seondudes ribosoomi peptidüültransferaasesse tsentrisse. Gram-negatiivsed bakterid, nagu näiteks *Escherichia coli*, on linesoliidi suhtes loomuomaselt resistentsed, Gram-negatiivsed bakterid sisaldavad rakumembraanis pumpasid, mis ei lase linesoliidil rakus akumulereuda ja seega ei saa põhjustada valgusünteesi inhibitsiooni (Schumacher *et al.*, 2007). Linesoliid seondub A-saiti (Wilson *et al.*, 2008) ja takistab tRNA korrektset positsioneerimist A-saiti (Ippolito *et al.*, 2008). On näidatud, et mitmed *housekeeping* modifikatsioonid on seotud nii linesoliidi kui teiste antibiootikumide resistentsusega (Long ja Vester, 2012).

Sarnaselt teistele valgusünteesi inhibeerivatele antibiootikumidele, mis seonduvad 50S subühikule, seondub ka klooramfenikool peptidüültransferaasse tsentri A-saiti (Bulkley *et al.*, 2010; Moazed ja Noller, 1987). Klooramfenikool kontakteerub ribosoomiga läbi 23S rRNA nukleotiidi C2452. Lisaks aitab klooramfenikoolil ribosoomile seonduda ka ribosoom-seoseline kaaliumi ioon, mida koordineerivad omakorda nukleotiidid G2447, C2501 ja C2061 (Bulkley *et al.*, 2010). Resistentsusmehhanismid klooramfenikoolile sisaldavad nii antibiootikumi ensümaatilist inaktivatsiooni läbi atsetüleerimise kui molekuli transporti rakust välja ning mutatsioone 23S rRNA geenis (Schwarz *et al.*, 2004).

EKSPERIMENTAALOSA

1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, millist mõju omab 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide üheaegne puudumine valgusünteesile. Sellest lähtuvalt püstitati töö hüpotees, mille kohaselt on *Escherichia coli* modifikatsioonid vajalikud valgusünteesi peenhäälestamiseks.

Probleemi uurimiseks konstrueeriti *E. coli* tüved, millest puuduvad 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid. Konstrueeritud tüvesid kasutati nii *in vitro* kui *in vivo* analüüside tegemiseks.

2. Materjal ja meetodika

2.1. *Echerichia coli* tüved, plasmiidid ja viirus

Tabel 1. Eksperimentide teostamiseks kasutatud *E. coli* tüved.

Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
MG1655	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
MG1655 (<i>ΔrluC, ΔrlmKL, ΔrlmM, ΔrlmN::kan</i>)	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 ΔrluC753 ΔrlmL764 ΔyfgB763 ΔygdE733::kan</i>	Triin Truu bakalaureuse töö
MG1655 (<i>ΔrluC</i>)	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 ΔrluC753</i>	M. Leppiku kingitus
JW1261-3	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔrluB777::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW3982-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, ΔrluF789::kan, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW4138-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, ΔrlmB730::kan, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW3146-2	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔrrmJ786::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW0931-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔrlmL764::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW2777-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔygdE733::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW2501-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔyfgB763::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW0336-1	F ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), ΔlacI785::kan, λ⁻, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
MG1655 (<i>ΔlacI ΔlacZ::kan</i>)	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1, ΔlacZ, ΔlacI::kan</i>)	A. Liivi kingitus

E. coli tüvi MG1655 ($\Delta rluB$, $\Delta rluC$, $\Delta rluF$, $\Delta rlmB$, $\Delta rlmE$, $\Delta rlmKL$, $\Delta rlmM$, $\Delta rlmN::kan$) valmis minu bakalaureusetöö tulemusena. MG1655 ($\Delta rluC$) valmistas M. Leppik (TÜMRI). *E. coli* tüvi MG1655 ($\Delta lacI$ $\Delta lacZ::kan$) valmistas A. Liiv (TÜMRI). KEIO kollektiooni tüved (JW1261-3, JW3982-1, JW4138-1, JW3146-2, JW0931-1, JW2777-1, JW2501-1, JW0336-1) kingiti T. Tensoni laborist (TÜTI).

Tabel 2. *Escherichia coli* tüvede transformeerimiseks kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Olulised geenid ja omadused	Allikas
pCP20	Ampitsilliini (Amp ^R) ja klooramfenikooli (Cam ^R) resistentne plasmiid temperatuuritundliku replikatsiooniga ja FLP rekombinaasi geeniga	Cherepanov ja Wackernagel, 1995; Datsenko ja Wanner, 2000
pSG25	Tetratsükliini (Tc) resistentsusgeeni sisaldav plasmiid, sisaldab <i>wild type lacZ</i> geeni	O'Connor & Dahlberg, 1993
pSG25 derivaat pSG12DP (-1)	Funktsionaalse LacZ süntees nõuab -1 raaminihet	O'Connor ja Dahlberg, 1993
pSG25 derivaat pSGlac7 (+1)	Funktsionaalse LacZ süntees nõuab +1 raaminihet	O'Connor ja Dahlberg, 1993
pSG25 derivaat pSG3/4	Plasmiid sisaldab UGA <i>nonsense</i> mutatsiooni, funktsionaalse LacZ süntees nõuab STOP-koodoni ülelugemist	O'Connor ja Dahlberg, 1993
pSG25 derivaat pSG163	Plasmiid sisaldab UAG <i>nonsense</i> mutatsiooni, funktsionaalse LacZ süntees nõuab STOP-koodoni ülelugemist	O'Connor ja Dahlberg, 1993

Tüvede konstrueerimisel kasutati transduktsiooni läbiviimiseks P1 bakteriofaagi (Sternberg, 1990).

2.2. Söötmed

Tabel 3. Rakukultuuride inkubeerimiseks kasutatud söötmed.

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	1.6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0.5% NaCl	Sambrook, Fritsch ja Maniatis, 1989
Luria-Betani (LB) agarsööde	1% trüpton, 0.5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1.5% agar	Bertani, 1951
MOPS minimaal - vedelsööde	1xMOPS soolad, 0.2 % sorbitool, 1.32 mM K ₂ HPO ₄ , 0.2 µg/ml tiamiin	Neidhardt, Bloch ja Smith, 1974
M9 minimaal-vedelsööde	1x M9 soolad, 2 mM MgSO ₄ , 0.4 % glükoos, 0.1 mM CaCl	Sambrook, Fritsch ja Maniatis, 1989

Söötmetele lisati vastavalt bakteritüve resistentsusele antibiootikumi kanamütsiin (Km) (*Amresco*) lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml või tetratsükliini (Tc) (*Sigma*) lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml. FLP rekombinatsioon viidi läbi LB-Amp tardsöötmele ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml.

2.3. Puhvrid, reagentid ja ensüümid

Nimetus	Koostis
Puhver RF1	1.2% RbCl, 0.99% MnCl ₂ *4H ₂ O, 0.15% CaCl ₂ *2H ₂ O, 30 mM KAc (pH=7.5), 10.5% glütserool
Puhver RF2	10 mM MOPS, 0.12% RbCl, 1.1% CaCl ₂ *2H ₂ O, 15% glütserool
10x PCR puhver	750 mM TrisHCl pH 8.8, 200 mM NH ₂ SO ₄ , 0.1% tritonX 100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin
1x TBE puhver	90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA, (10x TBE puhvri pH 8.3)
Lüüsilahjenduspuhver LLP 1	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 1 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
LLP 6	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 6 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
LLP 10	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 10 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
LLP 12	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 12 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
LLP 15	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 15 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
LLP20	20 mM Tris, 60 mM KCl, 60 mM NH ₄ Cl, 20 mM MgOAc , 6 mM β-merkaptotetanool
Z-puhver	60 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 40 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ *7H ₂ O, 50 mM β-merkaptotetanool (lisatakse puhvrile vahetult enne kasutamist), pH 7.0
Fosfaatpuhver	60 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 40 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, pH 7.0
Puhver A	0.01 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , 2.5% metanool (<i>LiChrosolv</i>), pH 5.3
Puhver B	0.01 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , 20% metanool, pH 5.1
Puhver C	0.01 M NH ₄ H ₂ PO ₄ , 35% atsetonitriil (<i>LiChrosolv</i>), pH 4.9

Taq DNA polümeraas oli lahke kink Prof. J. Sedmanilt (TÜMRI). Lüsotsüüm on firmalt *AppliChem*, DNase I firmalt *Amresco*, nukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) firmalt *Solis Biodyne*, β-merkaptotetanool firmalt *Calbiochem*. Marker 1kb DNA Ladder firmalt *Solis Biodyne*, fMet-tRNA valmistas A. Liiv (TÜMRI), puromütsiin (*Sigma*), FAST AP fosfataas ja 10x

FAST AP puhver (*Thermo Scientific*), P1 nukleas (*Sigma*), ONPG (orto-nitrofenüül- β -galaktoos) (*Sigma*).

2.4. Praimerid

Tabel 4. Konstrueeritud tüvede valideerimisel kasutatud PCR praimerid.

Praimeri nimi	5'→3' järjestus
RluB DIR	GAGTCGTTTACT
RluB REV	GAAGTGGCACAT
RlmB DIR	CCCTCTTAAAA
RlmB REV	TCATATATTATT
RluC DIR	GGATGGACACGGAAACGGC
RluC REV	CGCTAATCGCGCTGTGTCAG
RlmE DIR	GCTTGAGCGGATGTGCCAGAC
RlmE REV	GCACAACGGCAATGACCAGC
RluF DIR	GCACATTGCTTCTGGAAAGTG
RluF REV	CAATCAACGCCTGAGATTTTC
RlmKL DIR	GTTTGGCCCTGGGTTATGCTCG
RlmKL REV	GCCGTTGCGGCCACCAGAC
RlmM DIR	CTTTATTGCCTGGCGCTGTCC
RlmM REV	GGAAGCCCGCATCGGGCATC
RlmN DIR	CAAACGTGGCATCCGTGCGCC
RlmN REV	TTGCATCGTTACATACTGCC

2.5. *Escherichia coli* tüvede konstrueerimine ja kontrollimine

Escherichia coli tüved konstrueeriti P1 bakteriofaagi vahendatud transduktsiooni (Sternberg, 1990) ning FLP rekombinatsiooni meetoditel (Datsenko ja Wanner, 2000).

2.5.1. Värske bakteriofaagi P1 viiruslüsaaadi valmistamine

Värske P1 viiruslüsaaat, mis sisaldas elujõulist viirust, valmistati *wt* MG1655 bakteritüve vedelkultuuris. MG1655 tüves transduktsiooni teel kromosomaalse geeni vahetamiseks Km resistentsuskasseti vastu kasutati edaspidiste viiruslüsaaatide valmistamiseks KEIO kollektsiooni tüvesid JW1261-3 ($\Delta rluB::kan$), JW4138-1 ($\Delta rlmB::kan$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::kan$), JW3982-1 ($\Delta rluF::kan$) (Baba *et al.*, 2006) või MG1655 ($\Delta lacI::kan$). Rakkude lüüsimine viiruspartiklite eraldamiseks toimus rakukultuuride kloroformtöötusega.

2.5.2. Transduktsioon

Transduktsiooni läbiviimiseks kasvatati *E. coli* retsipienttüved 2xYT vedelsöötmes kuni $OD_{600} \approx 1.5$, seejärel koguti rakud tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugis *Heraeus fresco* (3000 rpm, 5min) ja rakusademelt eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 2xYT söötmes, mis

sisaldas CaCl₂ ning MgCl₂ (lõppkontsentratsioonid vastavalt 10 mM ja 5 mM). Retsipenttüvi nakatati viiruslüsaaadiga ning inkubeeriti 30 min 37°C juures. Edasine rakkude nakatumine viirusega peatati naatriumtsitraadi lisamisega (lõppkontsentratsioon 0,3 M). Rakud koguti kokku tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugis ja suspendeeriti uuesti 1ml 2x YT vedelsöötmes. Rakud, mille geen oli P1 transduktsiooni käigus asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga selekteeriti LB+Km (25 µg/ml) tardsöötmele.

2.5.3. Transformatsioon

Genoomi, kindla geeni asemele, viidud kanamütsiini resistentsuskasseti eemaldamiseks kasutati pCP20 vahendatud FLP rekombinatsiooni (Datsenko ja Wanner, 2000). Bakterirakkude kompetentseks muutmiseks kasutati RbCl meetodit (Maniatis, Fritsch ja Sambrook, 1982). Üleöö kasvanud vedelkultuuridest tehti 20x lahjendused ning inkubeeriti 2xYT+Km vedelsöötmes temperatuuril 37°C kuni OD₆₀₀≈0,6. Rakud koguti tsentrifuugimise teel ning resuspendeeriti 1 ml RF1 puhvril. Seejärel inkubeeriti rakke 20 minutit jääl. Rakud koguti, suspendeeriti 200 µl RF2 puhvril ja inkubeeriti jääl 30 minutit. Plasmiidse DNA transformeerimiseks bakterirakkudesse lisati kompetentsetele rakkudele 60 ng pCP20 plasmiidset DNAd. Rakke inkubeeriti jääl 30 minutit. Transformeerimine tehti kuumašokimeetodil temperatuuril 42°C, 60 sekundit. Värskest transformeeritud rakke inkubeeriti 2xYT vedelsöötmes 37°C juures 1h, et kanamütsiini resistentsusgeen jõuaks enne LB-Km tardsöötmele kandmist ekspresseeruda.

2.5.4. Plasmiidse antibiootikumiresistentsuse geeni eemaldamine

pCP20 on Amp^R ja Cam^R resistentne temperatuuritundliku replikoni ja kõrgel temperatuuril indutseeritava FLP sünteesiga plasmiid (Cherepanow ja Wackernagel, 1995). Ampitsilliinile resistentsed transformandid selekteeriti LB+Amp tardsöötmele 30°C juures. pCP20 plasmidi eemaldamiseks inkubeeriti bakterirakke mitteselektiivsel LB tardsöötmele temperatuuril 37°C. Plasmidi kadumist kontrolliti LB+Amp ja LB+Km tardsöötmele.

2.5.5. Konstrueeritud *E. coli* tüvede kontrollimine

Koloonia-PCR

Konstrueeritud *E. coli* tüved kontrolliti koloonia-PCR meetodil. Bakterikolooniad suspendeeriti 10 µl MQ-vees ja rakud lüüsi 5 min temperatuuril 95°C. Lüüsunud rakususpensioonidele lisati 15 µl reaktsioonisegu (Tabel 5).

Tabel 5. PCR reaktsioonisegu koostis

Reaktsioonisegu	1 reaktsiooni maht
MQ H ₂ O	7 µl
10x PCR puhver	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
Taq DNA polümeraas (5U/µl)	1 µl
Praimer (<i>dir</i>)	15 pmol
Praimer (<i>rev</i>)	15 pmol
KOKKU	15 µl

Tabel 6. Koloonia-PCR reaktsiooni tingimused.

Etapp		Temperatuur	Aeg (sek)	Tsüklite arv
1	Algne denaturatsioon	94°C	180	1
2	Denaturatsioon	94°C	30	
3	Praimerite seondumine	56°C	40	32
4	Elongatsioon	73°C	120	
5	Lõplik elongatsioon	73°C	420	1

Geenide deletsiooni hinnati koloonia PCR-i reaktsioonil tekkinud DNA fragmentide pikkuste järgi 1% agarosgeelelektroforeesil 1X TBE puhvris. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV valguses. DNA fragmentide pikkuste hindamiseks kasutati 1kb DNA markerit.

x-gal test

LacZ geeni puudumist kontrolliti *x-gal* testi abil. LB tardsöötmetelt inokuleeriti üks koloonia kahes korduses 1 ml 2xYT vedelsöötmesse, millest ühele lisati 1 mM lõppkonsentratsioonis IPTGd. Rakud kasvatati 37°C juures kuni OD₆₀₀≈1.0. 1 ml rakukultuuridele lisati 15 µl kloroformi ja *x-gal*aktoosi (lõppkonsentratsioon 0.03 mg/ml). Proove segati intensiivselt toatemperatuuril 15 minutit. LacZ geeni intaktsust hinnati sinise värvi tekkimise järgi rakukulüsaadis.

2.6. *Escherichia coli* tüvede kasv ja generatsiooniaegade määramine

E. coli koloonia inokuleeriti 2 ml MOPS vedelsöötmes kahes korduses ja kasvatati temperatuuril 37°C üleöö. Üleööökultuuridest tehti 20x lahjendused MOPS vedelsöötmesse, inkubeeriti temperatuuril 37°C 1.5-2 h ning rakukultuur lahjendati OD₆₀₀≈0.05ni. Rakkukultuuride OD₆₀₀ mõõdeti kaheksas korduses 100 mikrolitrist rakukultuurist 96 kaevuga plaadilt mikroplaadilugejas *POLARstar Omega (BMG Labtech)*.

2.7. Ribosoomide lahutamine ja kogumine sahharoosgradiendi abil

2.7.1. Ribosoomide kasvatamine *E. coli* tüvedes ja rakkude lüüs

Üks koloonia inokuleeriti 2 ml 2xYT vedelsöötmesse. Üleöökuultuurid lahjendati otse 100 ml värskesse 2xYT söötmesse ja inkubeeriti loksutis kuni $OD_{600} \approx 1$. Bakterirakud koguti *Rotina 420* tsentrifuugiga tsentrifuugimise teel 4000 rpm 10 min.

Rakusade resuspendeeriti 1x lüüsilahjenduspuhvrts (1x LLP 12), millele lisati lüsootsüüm ($C_{l\ddot{o}pp} = 2$ mg/ml) ning DNAas I ($C_{l\ddot{o}pp} = 40$ U/ml). Rakumembraanide mehhaaniliseks lüüsimiseks kasutati *Precellys 24* homogenisaatorit vastavalt tootja juhistele (6000 rpm, 3x60 sek, 0,1 mm klaaskuulidega). Klaaskuulid ja membraan-kromosomaalne kompleks sadestati lauatsentrifuugis 13 000 rpm 15 minutit. Nukleiinhape koguse hindamiseks rakulüsaadis mõõdeti supernatandi optiline tihedus *NanoDrop (Thermo Scientific)* spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

2.7.2. Ribosoomaalsete partiklite puhastamine

Ribosoomide ja subühikute puhastamiseks kasutati ribosoomide lahutamist sahharoosigradiendis. Sahharoosigradiendit formeeriti 22% sahharoosilahusest (1x LLP 12 puhvrts) külmutamise-sulatamise meetodil. Ribosoomi partiklite lahutamiseks kanti sahharoosigradiendile $\sim 70U$ (A_{260}) rakulüsaati (1x LLP 12 puhvrts) ja ultratsentrifuugiti *Beckman Coulter L90K* ultratsentrifuugi rootoris SW28, $\omega^2t = 3.4 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 24000 rpm 12h temperatuuril 4°C. Ribosoomi fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivoolu-spektrofotomeetrit *GE Healthcare Monitor UVis-920* (OD_{260}), peristaltilist pumpa ning isekirjutajat *LKB Bromma 2210 recorder*. Ribosoomi partiklid koguti sahharoosigradiendist eraldi.

Sahharoosi kontsentratsiooni vähendamiseks lisati kogutud gradiendi fraktsioonidele $\sim 2x$ maht 1x LLP 12 puhvrts ning ribosoomi partiklid koguti ultratsentrifuugimise teel rootoris 45Ti, $\omega^2t = 1.0 \times 10^{12} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 37000 rpm 18.5h temperatuuril 4°C. 70S ribosomaalsed partiklid lahustati 1x LLP 1 puhvrts, dissotsieerimaks neid vabadeks 30S ja 50S partikliteks. 30S ja 50S partiklid suspendeeriti 1x LLP 12 puhvrts ning külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80°C juures.

Dissotsieeritud 30S ja 50S partiklid lahutati eelpool näidatud tingimustel, aga 1 mM MgOAc lõppkontsentratsioonil. Sahharoosigradiendist kogutud dissotsieeritud 30S ja 50S partiklid sadestati, lahustati ja hoiustati samamoodi nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.7.3. Ribosoomaalsete partiklite jaotus sahharoosigradiendis analüüsiks

Ribosoomide ja subühikute jaotumise analüüsimiseks sahharoosi gradiendis kasutati rakulüsaadi tseentrifuugimist lineaarses 15% kuni 40% sahharoosigradiendis 1x LLP 12 puhvris. Ribosoomi partiklite lahutamiseks kanti sahharoosi gradiendile 30U rakulüsaati (1x LLP 12 puhvris) ja ultratsentrifuugiti $\omega^2t=2.8 \times 10^{11} \text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 24000 rpm 12h, temperatuuril 4°C. Ribosoomi fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivoolu-spektrofotomeetrit (OD₂₆₀), peristaltilist pumpa ning isekirjutajat.

2.8. rRNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC (*high-performance liquid chromatography*) meetodiga

2.8.1. rRNA puhastamine

HPLC analüüsiks puhastati rRNA ribosomaalsetest partiklitest fenool-kloroform meetodil. Valkude eemaldamiseks ribosomaalsetest partiklitest lisati 3U (A₂₆₀) proovile võrdne maht fenooli (pH 5.5) ning segati intensiivselt toatemperatuuril 3 minutit, misjärel tseentrifuugiti valkude sade fenooli faasi lauatsentrifuugis 13000 rpm 3 minutit. Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi ja fenooltöötlust korrati veel kaks korda. Peale fenooltöötlust lisati rRNA lahuse vesifaasile fenooli eemaldamiseks võrdne maht kloroformi, segati 3 minutit ning tseentrifuugiti 13000 rpm 3 minutit. Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi ning rRNA sadestati 70% etanoolis +4°C juures 30 minutit ja tseentrifuugides lauatsentrifuugis 13000 rpm 15 minutit. Supernatant aspireeriti ning rRNA sade kuivatati temperatuuril 37°C 5 minutit. Puhastatud rRNA elueeriti 80 µl MQ vees. RNA kontsentratsioon määrati *NanoDrop* spektrofotomeetriga (A₂₆₀).

2.8.2 rRNA nukleosiidse kompositsiooni analüüs

rRNA nukleosiidide analüüsimiseks kasutati Gehrke ja Kuo poolt väljatöötatud meetodit (Gehrke & Kuo, 1989).

rRNA nukleosiidide ensümaatiliseks hüdrolüüsiks nukleosiid-5' monofosfaatideks töödeldi 2U (A₂₆₀) rRNAd P1 nukleaasiga 0.6 mM ZnSO₄ lahuses, inkubeerides üleöö temperatuuril 37°C. Fosfaatrühmade eemaldamine nukleosiidi küljest toimus 37°C juures 3h 1U bakteriaalse aluselise fosfataasiga FAST AP 1x FAST AP puhvris.

rRNA nukleosiidse kompositsiooni määramiseks kasutati *Shimadzu Prominence HPLC* süsteemi, kolonni *Supelcosil LC-18-S* (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) ning Gerhke ja Kuo poolt välja

töötatud analüüsiprogrammi (Gehrke ja Kuo, 1989). Nukleosiidide neeldumisprofiilid määrati lainepikkustel 260 nm ja 280 nm.

Erinevate rRNA nukleosiidide kompositsioon väljendus piikide pindaladena.

2.9. *In vitro* peptidüültransferaasse aktiivsuse määramine

In vitro peptidüültransferaasi (PT) reaktsiooni aktiivsuse määramiseks teostati *E. coli* dissotsieeritud 50S subühikutega [³⁵S]f-Met-tRNA^{Met} ja puromütsiini reaktsioon.

2.9.1 f-Met-tRNA^{fMet}-puromütsiini reaktsioon

E. coli MG1655 70S partiklitest dissotsieeritud 50S subühikuid aktiveeriti 20 minutit 49°C juures. Reaktsioon teostati 50 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 1x LLP, 0.1U 50S subühikuid, 2 pmol f-Met-tRNA^{Met} ja puromütsiini lõppkontsentratsiooniga 1,6 mM.

Reaktsioon initsieeriti 30 µl metanooli lisamisega ning segu inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 25°C termo-segajas *ThermoMixer C* (*Eppendorf*). Reaktsioon peatati 10 µl 10 M KOH (*AppliChem*) lisamisega ning segu inkubeeriti 20 minutit 42°C juures. Reaktsioonisegu neutraliseerimiseks lisati 200 µl 1M KH₂PO₄. Reaktsioonisegust N-formüül-metionüül-puromütsiini ekstraheerimiseks lisati reaktsioonisegule 1 ml etüülatsetaati (*AppliChem*). 5 ml sintsilatsioonisegusse *Optiphase Hisafe 3* (*Perkin Elmer*) lisati etüülatsetaadi faasist 500 µl ning radioaktiivsus mõõdeti sintsilatsioonianalüsaatoriga *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer*.

2.10. *In vitro* translatsioon

E. coli puhastatud ja dissotsieeritud ribosomaalsete partiklite translatsioonilise aktiivsuse määramiseks kasutati *in vitro* polü(U)-sõltuvat polüfenüülalaniini [polü(Phe)] sünteesi.

2.10.1. Polü(U)- sõltuv polü(Phe) süntees

Reaktsiooni läbiviimiseks segati kokku kaks reaktsioonisegu, reaktsioonisegu A [1x LLP 12, 30 µg polü(U) matriits-RNA ning 10 pmol 50S ja 15 pmol 30S subühikud] ja B [60 µg totaalset *E. coli* tRNAd (*Boehringer Mannheim*), 2 mM ATP, 1 mM GTP, 8 mM fosfoenoolpüruvaat, 1 µg püruvaadi kinaas (*Sigma*), 50 µM [¹⁴C]-Phe (280 dpm/pmol; *Amersham*), 2 µM EF-Tu (*Sigma*), 0.4 µM EF-G (*Sigma*) ja 0.3 µM fenüülalanüül-tRNA süntetaas (PheRS) (*Sigma*)]. Reaktsioonisegusid A ja B inkubeeriti eraldi 37°C 15 minutit *AccuBlock Digital Dry Bath* (*Labnet*) termoblokis. Eelinkubatsiooni käigus toimus reaktsioonisegus A ribosoomi

subühikute seondumine polü(U) matriitsiga ja reaktsioonisegus B toimus tRNA^{Phe} laadimine fenüülalaniniga.

Reaktsiooni aktiveerimiseks segati segud A ja B kokku ning inkubeeriti temperatuuril 37°C 10 minutit. Reaktsioon peatati 1 ml 5% trikloroatseethappega (TCA), et hüdrolüüsida [³⁵S]Phe-tRNA^{Phe}. Pärast proovide jahutamist filtreeriti proovid *Whatman GF/C* klaaskiudfiltrile ning proovides sisalduv radioaktiivsus mõõdeti 5 ml *PerkinElmer Optiphase Hisafe 3* sintsillatsioonisegus *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzeriga* [¹⁴C] detekteerimise protokolliga.

2.11. *In vivo* translatsiooni täpsususe mõõtmine

E. coli tüvede *in vivo* translatsioonitäpsuse mõõtmiseks transformeeriti tüvedesse erinevad pSG plasmiidid, pSG25, pSG12DP (-1), pSGlac7 (+1), pSG3/4, pSG163 (O'Connor ja Dahlberg, 1993).

Transformeeritud *E. coli* tüved inokuleeriti kahes korduses 2 ml MOPS vedelsöötmesse ning inkubeeriti loksutis üleöö temperatuuril 37°C. Rakukultuur lahjendati kuni OD₆₀₀≈0.08, misjärel inkubeeriti rakke loksutis 37°C kuni OD₆₀₀≈0.5. Rakukultuuri lahjendamist korrati samadel tingimustel ning rakukultuuri inkubeeriti kuni OD₆₀₀≈0.5-0.7. Piisava tiheduseni kasvanud rakukultuuri inkubeeriti jääl 10 minutit, misjärel lisati 800 µl Z-puhvrile 200 µl rakukultuuri ning mikrotiiterplaadil mõõdeti OD₆₀₀.

Ülejäänud rakulahus lüüsi kloroformi ja 0.1% SDS-ga (lõppkontsentratsioon 0.003%). Seejärel inkubeeriti neljas korduses 100 µl rakulüsaati mikrotiiterplaadis 30°C 10 minutit, misjärel mõõdeti reaktsioonieelne OD₄₂₀. β-galaktosidaasi reaktsiooni mõõtmiseks lahustati ONPG (4 mg/ml) 0.1 M fosfaatpuhvril. Reaktsioon käivitati 20 µl ONPG lahuse lisamisega. Reaktsiooni inkubeeriti 30°C juures 15 minutit ja reaktsiooni peatamiseks lisati 50 µl stopp lahust (1M Na₂CO₃). Seejärel mõõdeti reaktsioonijärgne OD₄₂₀.

2.12. Kasvu inhibitsiooni eksperimendid

E. coli tüvede kolooniad inokuleeriti kahes korduses 2 ml M9 minimaalvedelsöötmesse. Üleöökkultuurid lahjendati 2 ml M9 vedelsöötmesse kuni OD₆₀₀=0.02. Seejärel lisati antibiootikumid [rifampitsiin (0-200 µg/ml) (*Sigma*), kanamütsiin (0-10 µg/ml) (*Amresco*), streptomütsiin (0-20 µg/ml) (*Sigma*), klooramfenikool (0-16 µg/ml) (*Sigma*), erütromütsiin (0-400 µg/ml) (*Sigma*)] ning inkubeeriti 37°C juures 15h. OD₆₀₀ mõõdeti mikrotiiterplaadi lugejaga *POLARstar Omega (BMG Labtech)*. Nende katsetega opereeris PhD Aivar Liiv.

3. Tulemused

3.1. Konstrueeritud *Eschericia coli* tüved

23S rRNA domeeni V modifikatsioonide koosmõju uurimiseks valgusünteesile konstrueeriti käesoleva töö raames erinevaid *E. coli* tüvesid, kus puuduvad 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümid. Kõik konstrueeritud tüved valmistati bakteriofaag P1 vahendatud transduktsiooni ning FLP rekombinaasi vahendatud rekombinatsiooni meetoditel (ptk. 2.3).

Magistritöös kasutati algse retsipienttüvena minu bakalaureusetöös konstrueeritud *E. coli* tüve MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) (Triin Truu bakalaureusetöö), millest deleteeriti samm-sammuliselt geenid *rluF*, *rlmB*, *rluB* ja *rlmE*. Kõik KEIO kollektsiooni tüved (JW1261-3, JW3982-1, JW4138-1, JW3146-2), mida kasutati transduktsiooni doonortüvedena, sisaldasid modifikatsiooniensüümi geeni (*rluB*, *rluF*, *rlmB*, *rlmE*) asemel kanamütsiini resistentsuskasseti (*kan*). Km^R geen paikneb pärmil Flp-rekombinaasi sihtmärkjärjestuse FRT vahel (Baba et al., 2006), mis võimaldab pCP20 plasmiidilt kodeeritava FLP abil transformeeritud *E. coli* tüvest Km^R resistentsuskasseti eemaldada (Cherepanov & Wackernagel, 1995).

Käesoleva töö raames ei õnnestunud transduktsiooni teel deleteerida modifikatsiooniensüümi RluE (tulemused näitamata). *rluE* ja *rluC* geenid on *E. coli* genoomis üksteisest ~50 kb kaugusel (Zhou ja Rudd, 2013), mistõttu kanduvad need doonortüvest retsipienttüvesse P1 transduktsioonil koos. RluE geeni deleteerimiseks ei piisa P1 transduktsioonist ja selle geeni eemaldamiseks tuleb edaspidi kasutada teisi meetodeid.

Konstrueeritud tüved kontrolliti koloonia-PCR meetodil. Koloonia-PCRiks kasutati ptk. 2.2.4 välja toodud oligonukleotiide. Geeni deletsiooni hinnati PCR-i reaktsiooni produktina tekkinud DNA fragmentide pikkuste järgi (LISA 2).

Tabelis 7 on välja toodud käesoleva töö raames konstrueeritud *E. coli* tüved. MG $\Delta 8$ ja MG $\Delta 9$ erinevus seisneb RlmE poolt sünteesitud modifikatsiooni Um olemasolus (MG $\Delta 8$) või selle puudumises (MG $\Delta 9$).

Tabel 7. Konstrueeritud *E. coli* tüved

Lühend	Tüve nimi	Genotüüp
MG $\Delta 8$	MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN$)	$F^- \lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1 \Delta rluB777, \Delta rluC753, \Delta rluF789, \Delta rlmB730, \Delta rlmL764, \Delta ygdE733, \Delta yfgB763$

MG Δ9	MG1655 (<i>ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmE ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN</i>)	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 ΔrluB777, ΔrluC753, ΔrluF789, ΔrlmB730, ΔrrmJ786, ΔrlmL764, ΔygdE733, ΔyfgB763</i>
MG Δ9 ΔlacZ	MG1655 (<i>ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmE ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN ΔlacZ ΔlacI::kan</i>)	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 ΔrluB777, ΔrluC753, ΔrluF789, ΔrlmB730, ΔrrmJ786, ΔrlmL764, ΔygdE733, ΔyfgB763, ΔlacZ4787(::rrnB-3), ΔlacI785::kan</i>

Konstrueeritud MG Δ8 ja MG Δ9 (tabel 7) valmistati generatsiooniaegade mõõtmiseks, ribosoomide analüüsimiseks ja fraktsioneeritud ribosoomide edasiseks kasutamiseks HPLC analüüsil ning *in vitro* peptidüültransferaasi ja translatsiooni aktiivsuse määramiseks. Konstrueeritud tüvi ja MG Δ9 ΔlacZ valmistati *in vivo* translatsiooni täpsuse mõõtmiseks.

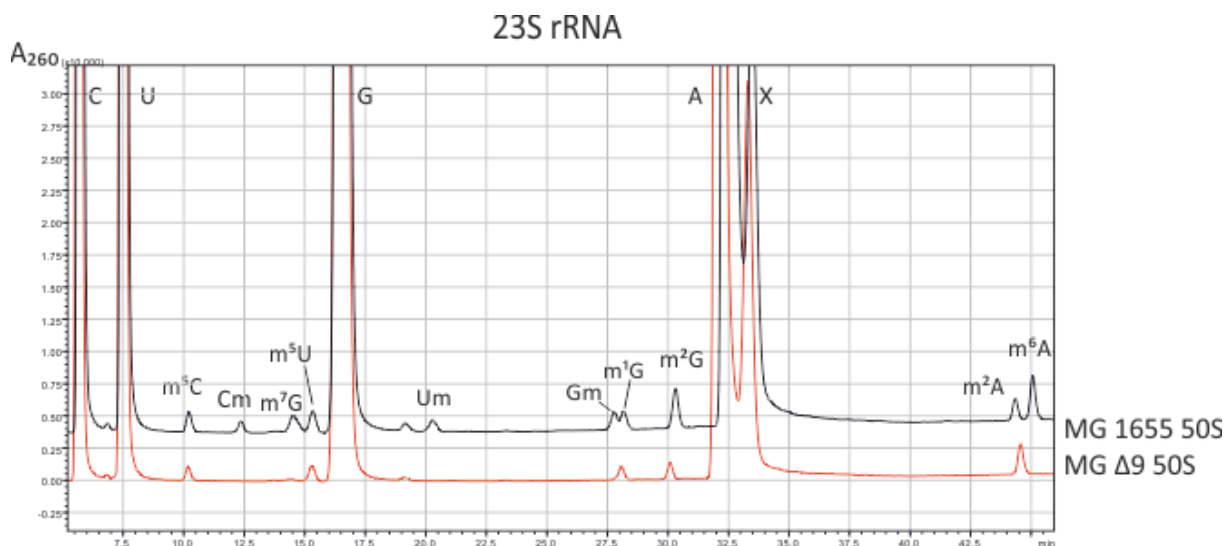
3.1.1. Konstrueeritud tüvede valideerimine HPLC meetodil

Konstrueeritud tüvesid kontrolliti ka deleteeritud modifikatsiooniensüümide poolt sünteesitavate rRNA modifikatsioonide puudumise suhtes, kasutades HPLC meetodit. Paralleelselt analüüsiti konstrueeritud tüvede MG Δ8 ja MG Δ9 (tabel 7) 23S rRNAd. 23S rRNA sisaldab kokku 17 modifikatsiooni, millest 11 asuvad domeenis V (Ofengand ja Del Campo, 2004).

Erinevate rRNA nukleosiidide kompositsioon väljendus HPLC kromatogrammis piikide pindaladena (joonis 8). Piikidealuste pindalade normaliseerimiseks ja nukleosiidide hulga suhte väljendamiseks võrreldes *E. coli* MG1655 23S rRNA nukleosiidse kompositsiooniga kasutati järgnevat valmit:

$$S = \frac{Y_{1,n}}{[\text{Average} \left(\frac{X_{1,n}}{X_{2,n}} \right) \cdot Y_{2,n}]}$$

kus S on modifitseeritud nukleosiidi pindala suhe wt tüve nukleosiidi pindalasse, $X_{1,n}$ – mittemodifitseeritud mutantse rRNA nukleosiidi piigialune pindala, $X_{2,n}$ – mittemodifitseeritud wt rRNA nukleosiidi piigialune pindala, $Y_{1,n}$ – modifitseeritud mutantse rRNA nukleosiidi piigialune pindala, $Y_{2,n}$ – modifitseeritud wt rRNA nukleosiidi piigialune pindala.

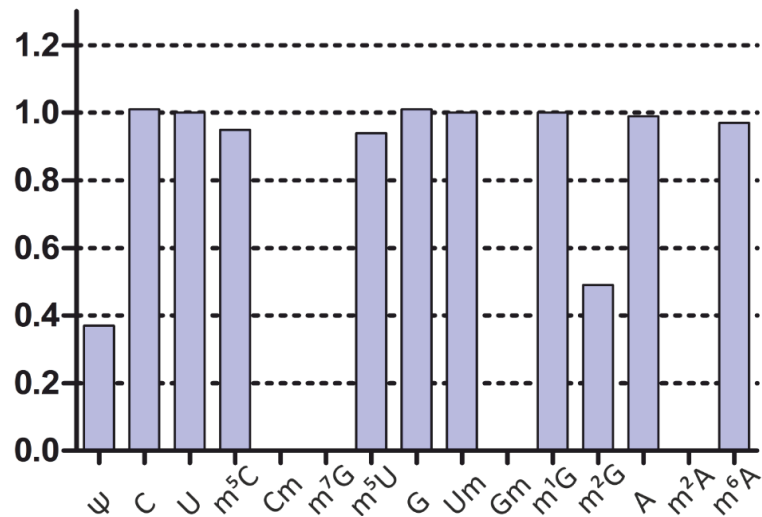


Joonis 8. 23S rRNAde HPLC analüüs. Joonisel on MG 1655 23S rRNA ja MG Δ9 23S rRNA piigid lainepikkusel 260 nm. Piikide aluseid pindalasid kasutati nukleosiidide suhete väljendamiseks. Välja on toodud ka 23S rRNA standardnukleosiidid (C, U, G, A) ning modifikatsioonid (v.a Ψ). X väljendab fenooli saastust proovis.

Modifikatsioonide ja neid sünteesivate ensüümide lihtsamaks jälgimiseks on esitatud tabel 8.

Tabel 8. 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid ja nendele vastavad modifikatsiooniensüümid

Modifikatsioon ja tema asukoht 23S rRNAs	Modifikatsiooniensüüm	Allikas
Ψ2605	RluB	(Del Campo, Kaya ja Ofengand, 2001)
Ψ955 Ψ2504, Ψ2580	RluC	(Conrad <i>et al.</i> , 1998)
Ψ2457	RluE	(Del Campo, Kaya ja Ofengand, 2001)
Ψ2604	RluF	(Del Campo, Kaya ja Ofengand, 2001)
Gm2251	RlmB	(Lovgren ja Wikstrom, 2001)
Um2552	RlmE	(Caldas, Binet, Bouloc, Costa, <i>et al.</i> , 2000)
m ⁷ G2069, m ² G2445	RlmKL	(Lesnyak <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2012)
Cm2498	RlmM	(Purta <i>et al.</i> , 2009)
m ² A2503	RlmN	(Toh <i>et al.</i> , 2008)



Joonis 9. Tüve MG $\Delta 8$ 23S rRNA HPLC analüüs. Välja on toodud mutanttüve MG $\Delta 8$ funktsionaalsetest ribosoomidest dissotsieeritud 50S subühiku 23S rRNA erinevate nukleosiidide suhe võrreldes MG1655 23S rRNA nukleosiididega. X-teljel on välja toodud erinevad 23S rRNA nukleosiidid ning Y-teljel suhtarvud.

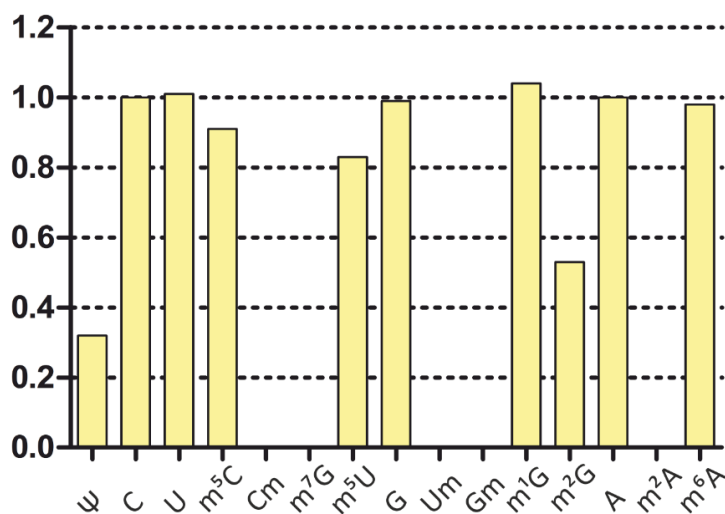
Konstrueeritud tüves MG $\Delta 8$ puuduvad kaheksa 23S rRNA domeeni V modifikatsiooni: viis pseudouridiini (Ψ), Gm, m⁷G, m²G, Cm ja m²A. Siinkohal tuleb märkida, et kuna RluC katalüüsib 23S rRNAs kolme pseudouridiini sünteesi, siis ainult üks neist paikneb domeenis V. Joonisel 9 on näha, et MG $\Delta 8$ nukleotiidide suhe võrreldes metsiktüüpi tüvega on vastavates positsioonides muutunud (joonis 9).

HPLC tulemustest selgub, et pseudouridiin on võrreldes kontrollribosoomidega alla 40% (joonis 9). *E.coli* 23S rRNAs sisaldab looduslikult kokku kümme pseudouridiini, millest üks on lisaks metüleeritud (Ofengand ja Del Campo, 2004). Analüüsitud tüvest on deleteeritud kolm pseudouridiinisüntaasi (RluB, RluC, RluF), mis sünteesivad kokku viis pseudouridiini. Seega näitavad tulemused üheselt, et kõigi kolme deleteeritud pseudouridiinisüntaasi poolt sünteesitavad modifikatsioonid on rRNA-st puudu.

Jooniselt 9 selgub ka, et modifikatsioonid Cm, m⁷G, Gm ja m²A on 23S rRNA nukleotiidses kompositsioonis täielikult puudu. See tulemus kinnitab samuti, et analüüsitud tüvest deleteeritud modifikatsiooniensüümid, RlmM, RlmKL (RlmK), RlmB ja RlmN, mis vastavaid modifikatsioone sünteesivad (Ofengand ja Del Campo, 2004), on bakteritüvest puudu.

Võrreldes kontrolltüve 23S rRNAga on joonisel 9 näha, et modifikatsiooni m²G hulk on poole võrra vähenenud. Seda tüüpi modifikatsiooni sünteesivad 23S rRNAs kaks erinevat metüültransferaasi – RlmKL (RlmL) ja RlmG. Mõlemad neist sünteesivad ühe m²G modifikatsiooni (Lesnyak *et al.*, 2006; Sergiev *et al.*, 2006). Kuna RlmKL on konstrueeritud

tüvest deleteeritud, siis peab ka modifikatsiooni hulk võrreldes metsiktüüpi tüvega poole võrra väiksem olema ja antud tulemus kinnitab modifikatsiooniensüümi puudumist rakust.



Joonis 10. Tüve MG Δ9 23S rRNA HPLC analüüs. MG Δ9 funktsionaalsetest ribosoomidest dissotsieeritud 50S subühiku 23S rRNA erinevate nukleosiidide suhe võrrelduna MG1655 23S rRNA nukleosiididega. X-teljel on välja toodud erinevad 23S rRNA nukleosiidid ning Y-teljel suhtarvud.

Konstrueeritud tüves MG Δ9 on lisaks eelmainitud modifikatsiooniensüümidele puudu ka RlmE. RlmE vastutab uridiini riboosi 2'-hüdrosüülrühma metülatsiooni (Um2552) (joonis 10) eest. MG Δ9 tüves on eeldatavalt puudu üheksa 23 S rRNA domeeni V modifikatsiooni puuduma. Joonise 9 Um piigi puudumine kinnitab, et lisaks modifikatsioonidele, mis olid puudu MG Δ8 tüves (joonis 8), on MG Δ9 rakkudest puudu ka modifikatsioon, mida sünteesib RlmE.

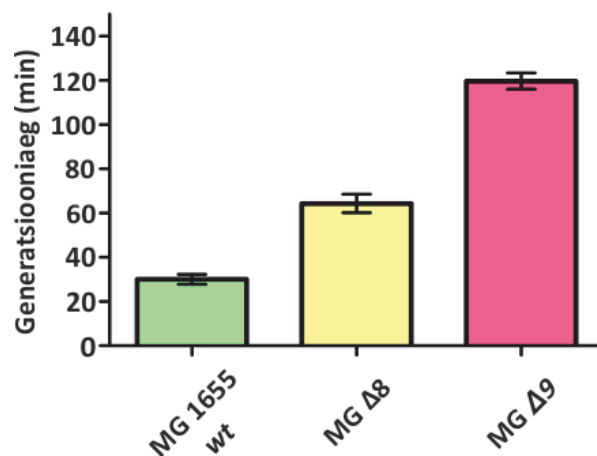
3.2. Generatsiooniajad

E. coli tüvede kasvukiirus mõõdeti MOPS minimaalvedelsöötmes ning generatsiooniajad arvatati järgmise valemi põhjal:

$$k = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{0.301 * t}$$

$$t_{\text{gen}} = \frac{1}{k}$$

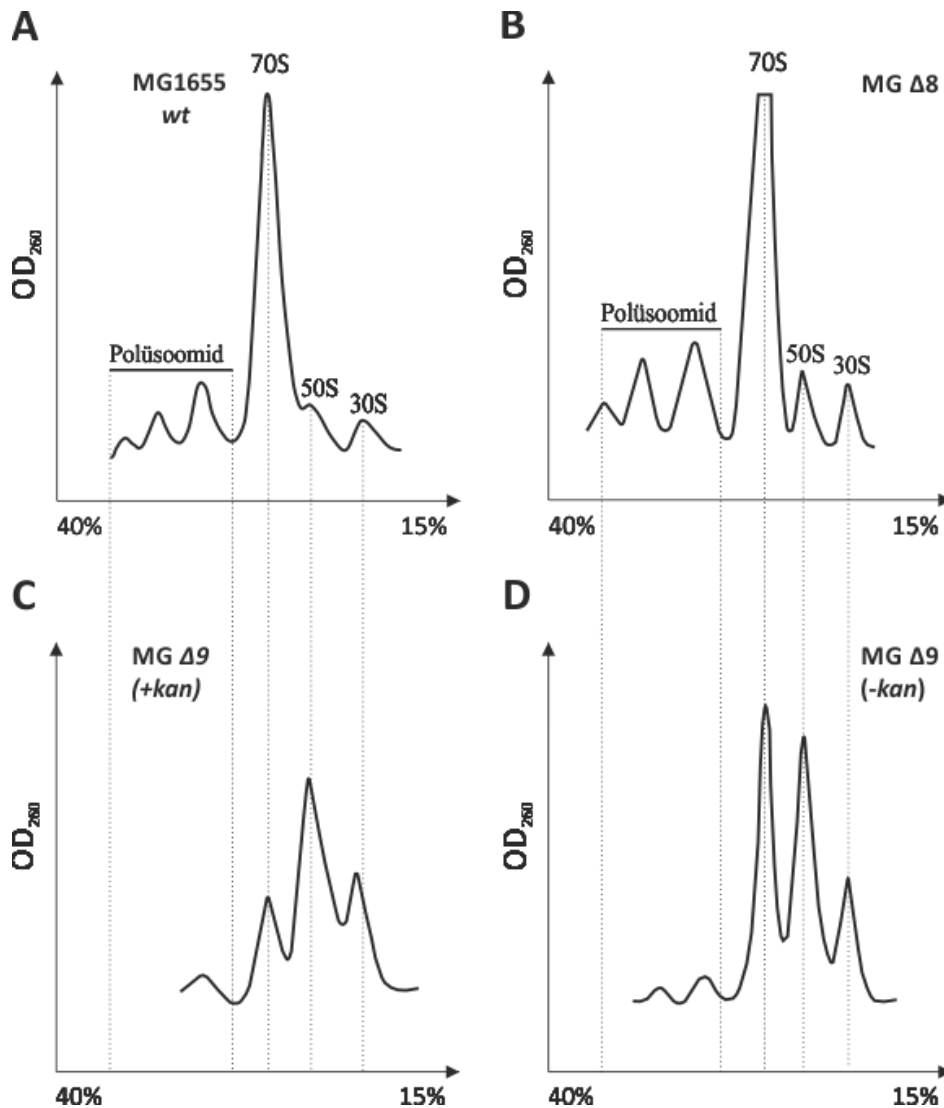
k – keskmise kasvukiiruse konstant, X₀ – algne populatsiooni suurus, X_t – populatsiooni suurus ajahetkel t, t – X_t ja X₀ vaheline aeg, t_{gen} – generatsiooniaeg.



Joonis 11. *E. coli* tüvede MG1655 wt, MG Δ8 ja MG Δ9 generatsiooniajad.

Joonisel 11 on näidatud *E. coli* tüvede MG 1655 wt, MG Δ8 ja MG Δ9 (tabel 7) generatsiooniajad. Metsiktüüpi rakkude generatsiooniaeg on keskmiselt 30 minutit. MG Δ8 keskmine generatsiooniaeg on metsiktüüpi tüvest kaks korda aeglasem, umbes 64 minutit (joonis 11). MG Δ9 generatsiooniaeg on võrreldes metsiktüüpi tüvega neli korda aeglasem ehk keskmiselt 120 minutit (joonis 11).

3.3. Ribosoomide gradiendiprofiilid



Joonis 12. Ribosoomide profiilid 15%-40% sahharoosigradiendis. Näidatud on polüsoomid, 70S, 50S ja 30S partiklite asukohad. Kujutatud on (A) MG1655 wt, (B) MG Δ8, (C) MG Δ9 (+kan) ja (D) MG Δ9 (-kan) polüsoomide ja ribosomaalsete partiklite profile.

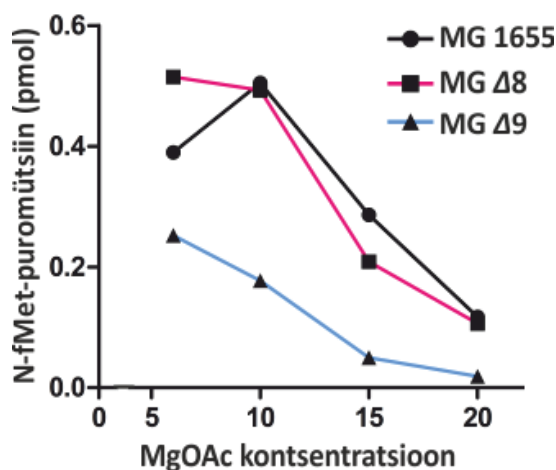
Võrreldes MG 1655 tüve 50S partiklitega (joonis 12A) on konstrueeritud tüve MG Δ8 (joonis 12B) 50S vabade subühikute osakaal veidi suurenenud. Konstrueeritud tüvest MG Δ9 on joonisel 12 näidatud kaks erinevat gradiendiprofiili (paneelid 12C ja 12D), millest ühes on kanamütsiini resistentsuskassett *rlmE* geeni asemel alles (+kan) (joonis 12C) ning teises on kanamütsiini resistentsuskassett eemaldatud (-kan) (joonis 12D). MG Δ9 (+kan) [MG1655 (*ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN ΔrlmE::km*)] ribosoomiprofiil on kontrollprofiilist suures osas erinev (joonis 12A ja C). MG Δ9 (+kan) 70S partiklite osakaal on drastiliselt vähenenud. Selle võrra on suurenenud vabade 50S ja 30S partiklite hulk, mis viitab 50S partiklite aeglasele või vigasele assambleerimisele. Lisaks on näha ka polüsoomide

proportsiooni vähenemist võrreldes *wt* tüvega. See tuleneb tõenäoliselt sellest, et MG $\Delta 9$ 50S subühikute võime moodustada funktsionaalseid ribosome on märkimisväärselt vähenenud.

Joonisel 12D näidatud konstrukti MG $\Delta 9$ (-*kan*) [MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$)] ribosoomiprofiil on *wt* tüvele sarnasem kui joonisel 12C paiknev MG $\Delta 9$ +Km tüve profiil. MG $\Delta 9$ (-*kan*) 70S partiklite osakaal on suurenenud võrreldes MG $\Delta 9$ (+*kan*) 70S ribosoomidega, kuid siiski on näha palju vabu 50S partikleid (joonis 12D). Polüsoome on võrreldes *wt* tüvega vähem (Joonis 12A ja D). Siinkohal tuleb kindlasti mainida, et tüvi MG $\Delta 9$ (+*kan*) on tüvest MG $\Delta 9$ (-*kan*) lühemat aega LB plaadil seisnud, mistõttu on MG $\Delta 9$ (+*kan*) tüvel olnud vähem aega kompenseerivate mutatsioonide tekkeks. Seega gradiendiprofiilil nähtav erinevus on seletatav väikeste kompenseerivate GTPaaside *Obg* ja *EngA* ekspressiooni (Tan *et al.*, 2002) või kompenseerivate mutatsioonidega.

3.4. *In vitro* peptidüültransferaasne aktiivsus

Peptidüültransferaasse aktiivsuse mõõtmiseks kasutati [^{35}S]-fMet-tRNA ja puromütsiini reaktsiooni vastavalt meetoditele peatükis 2.7. Peptidüültransferaasi reaktsioonis tekib fMet-puromütsiin. Joonisel 13 on näidatud MG 1655, MG $\Delta 8$ ja MG $\Delta 9$ 50S partiklite PTC aktiivsuse sõltuvust erinevatel Mg kontsentratsioonidel (6 mM, 10mM, 15 mM, 20 mM MgOAc) (joonis 13).

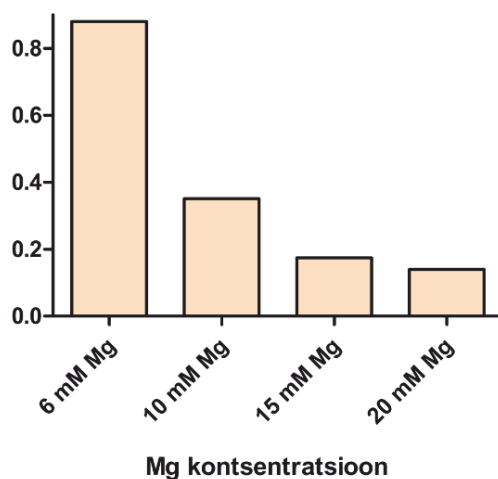


Joonis 13. *E. coli* tüvede MG1655, MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN$) ja MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$) PTC aktiivsuse sõltuvus Mg-ioonide kontsentratsioonist.

Joonisel 13 on näha, et peptidüültransferaasne aktiivsus sõltub Mg-ioonide kontsentratsioonist peaaegu pöördvõrdeliselt. Väiksematel Mg kontsentratsioonidel on PTC aktiivsem, ning Mg kontsentratsiooni kasvades muutub PTC aktiivsus väiksemaks. Katseid korrati

erinevatel inkubatsioonitemperatuuridel (50°C, 52°C, 54°C, 56°C), kuid PTC aktiivsuse ja temperatuuri vahelist seost ei leitud (LISA 4)

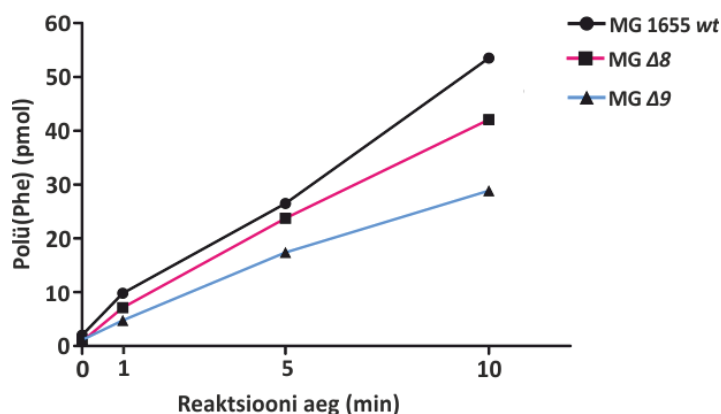
Lisaks on näha, et võrreldes kontrolltüve 50S subühikutega on MG $\Delta 9$ PTC aktiivsus tervikuna madalam võrreldes ülejäänud 50S subühikutega (Joonis 13). Selle täpsemaks väljendamiseks on näidatud ka suhtegraafik (joonis 14), mis näitab selgelt, et võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega väheneb mutanttüve ribosoomide peptidüültransferaase aktiivsus, sõltuvalt Mg ionide kontsentratsioonist, suhteliselt rohkem. Näiteks 6 mM Mg juures on mutanttüve MG $\Delta 9$ 50S partiklite PTC aktiivsus 0.8, ehk 80% metsiktüüpi tüve peptidüültransferaasest aktiivsusest. 20 mM Mg juures on mutanttüve 50S partiklite PTC aktiivsus võrreldes metsiktüüpi partiklitega 0.2, ehk 80% madalam.



Joonis 14. MG $\Delta 9$ [MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$)] ja *wild type* tüve peptidüültransferaase aktiivsuste suhted erinevatel temperatuuridel. X-teljel on Mg kontsentratsioonid (mM) ning y-teljel on suhtarvud.

3.5. *In vitro* translatsiooni aktiivsus

In vitro translatsioonianalüüsiks kasutati *in vitro* [^{14}C]-märgistatud polüfenüülalaniini sünteesi polü-uridiini matriitsilt, mille produkti (polü(Phe)) hulk detekteeriti TCA sademes sintsillatsiooni analüsaatori abil.



Joonis 15. *E. coli* MG1655 wt, MG Δ8 ja MG Δ9 *in vitro* valgusünteesi aktiivsus. X-teljel on märgitud reaktsiooniajad minutites ning y-teljel on märgitud reaktsiooniprodukti, polü(Phe), kontsentratsioon pikomoolides (pmol) Reaktsioonis on kasutatud 10 pmol 50S subühikuid.

Joonisel 15 on näha, et produkti tekib juurde lineaarselt ajast sõltuvalt. Reaktsiooni esimene mõõtmispunkt oli ajapunktis 0, seejärel 1, 5 ja 10 minutit. Analüüsid kasutati kõikidel juhtudel wt rakkudest puhastatud 30S subühikuid, et vältida sekundaarseid efekte, mis on tingitud 30S subühikute ebakorrektest protsessitusest. Joonisel 15 on näha, et MG wt tüve 70S ribosoomidest dissotsieeritud 50S partiklite polü(U) sõltuva polü(Phe) reaktsiooni kümnendaks minutiks tekib 50S partiklite kohta umbes 55 pmol polü(Phe). MG Δ8 dissotsieeritud 50S partiklite kohta tekib reaktsiooni kümnendaks minutiks umbes 40 pmol polü(Phe). Konstrueeritud mutanttüve MG Δ9 dissotsieeritud 50S partiklite kohta tekib reaktsioonis 10 minutiga umbes 30 pmol polü(Phe).

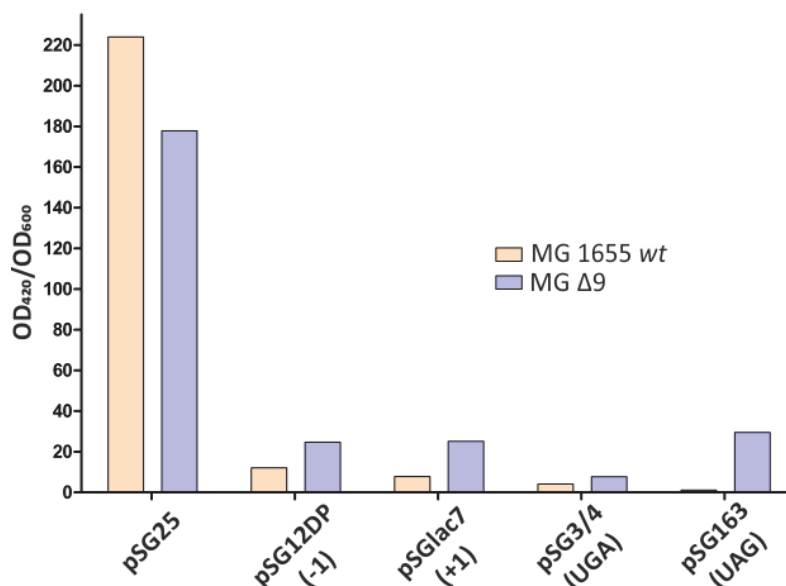
3.6. *In vivo* translatsiooni täpsus on segane

In vivo translatsioonitäpsuse analüüsiks konstrueeriti mutanttüved MG Δ8 Δ*lacZ* ja MG Δ9 Δ*lacZ* (tabel 7), millest oli lisaks modifikatsiooniensüümidele deleteeritud ka *lacZ* geen. *lacZ* kodeerib LacZ β-galaktosidaasi sünteesi, mis kuulub *lac* operoni ning katalüüsib laktoosi lagundamist glükoosiks ja galaktoosiks (Juers, Matthews ja Huber, 2012). Antud analüüsi teostamiseks kasutati laktoosi analoogi ONPG (orto-nitrophenüül-β-galaktosiid), kuna LacZ hüdrolyüsib ONPG galaktoosiks ja orto-nitrofenüülks. Viimane neist on tugeva kollase värvusega, mida on võimalik detekteerida lainepikkusel 420 nm (Neidhardt, Bloch ja Smith, 1974).

Translatsiooni täpsuse uurimiseks transformeeriti *E. coli* tüvedesse MG Δ8 Δ*lacZ* ja MG Δ9 Δ*lacZ* erinevad plasmiidid (ptk. 2.2.1). Plasmidi pSG25 ja tema derivaate kasutati translatsiooni täpsuse hindamisel sõltuvalt orto-nitrofenüüli optilise tiheduse muutusest (OD₄₂₀). PSG25 kodeerib *wild type* LacZ valku, kuid tema derivaatidelt funktsionaalse LacZ

sünteesiks peab ribosoom üles näitama translatsioonilist ebatäpsust, näiteks raaminihkeid ja stopp-koodoni ülelugemist.

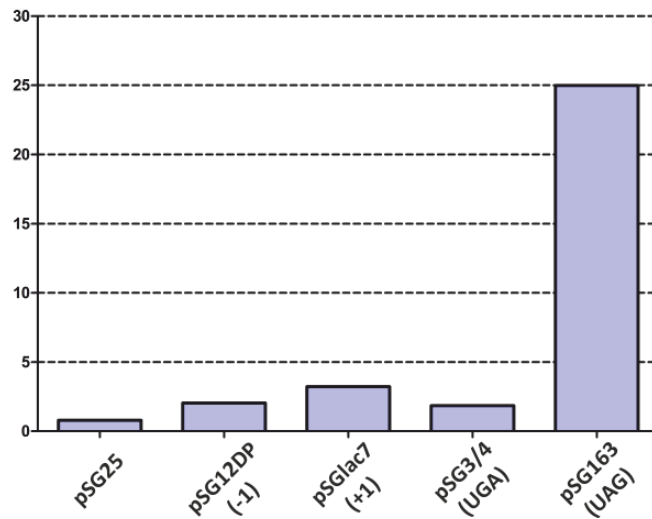
Joonisel 16 on kujutatud nitrofenüüli ja rakukultuuri optiliste tiheduste suhet, mis väljendab LacZ beeta-galaktosidaasi aktiivsust rakkude hulgast sõltumatult. Mida suurem on reaktsiooni produkti optiline tihedus (OD_{420}) kindlal rakukultuuri tihedusel, seda suurem on olnud beeta-galaktosidaasi aktiivsus. Seega võib tuletada, et seda rohkem on rakud sisaldanud ka beeta-galaktosidaasi.



Joonis 16. *In vivo* translatsioonitäpsus beeta-galaktosidaasi meetodil. X-teljel on näidatud erinevad kasutatud plasmiidid. (-1) ja (+1) tähistavad vastavalt miinus või pluss raaminihet ja (UGA) ning (UAG) tähistavad vastava STOP-koodoni läbilugemise vajadust funktsionaalse valgu sünteesimiseks. y-teljel on kujutatud OD_{420}/OD_{600} suhe. Võrreldud on MG1655 wt ja MG $\Delta 9$ $\Delta lacZ$ tüvede β -galaktosidaasi aktiivsuseid.

Antud katse kontrolltüvena kasutati MG 1655 ($\Delta lacZ$ $\Delta lacI::km$) ning analüüsitava tüvena kasutati MG $\Delta 9$ $\Delta lacZ$. Võrreldes MG $\Delta 9$ $\Delta lacZ$ tüve wt tüvega, on pSG25 plasmiidilt sünteesitud *wild type* LacZ aktiivsus veidi madalam (joonis 16). Samas on suurenenud LacZ aktiivsus plasmiidide korral, kus ribosoomis peab toimuma funktsionaalse valgu sünteesimiseks -1 (pSG12DP) ja +1 (pSGlac7) raaminihe ning UAG stopp-koodoni üle lugemine (pSG163).

MG wt ja MG $\Delta 9$ tüvede omavahelist suhet on kujutatud joonisel 17.



Joonis 17. MG1655 OD₄₂₀/OD₆₀₀ ja MG Δ9 ΔlacZ (ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN ΔrlmE) OD₄₂₀/OD₆₀₀ suhe. X-teljel on võrreldavad plasmiidid ning y-teljel suhtarvud.

Joonisel 17 on kujutatud MG1655 tüves saadud LacZ aktiivsuste (OD₄₂₀/OD₆₀₀) suhtes võrreldud mutanttüve LacZ aktiivsuseid (OD₄₂₀/OD₆₀₀). Jooniselt 17 saab tuletada, et LacZ aktiivsus mutanttüves on näiteks UAG stopp-koodoni üle lugemisel 25x suurem. See on indikaator, et konstrueeritud mutanttüve ribosoomid teevad mitu korda rohkem UAG stopp-koodoni üle lugemise viga kui *wild type* ribosoomid. Sarnast, kuid väiksema mastaabiga efekti on näha ka teiste translatsioonivigade toimumisel.

3.7. Antibiootikumide tundlikkus

Konstrueeritud tüvede MG Δ8 ja MG Δ9 antibiootikumide tundlikkust testiti kanamütsiini ja streptomütsiini suhtes, mis seonduvad peamiselt 30S subühikuga, ning klooramfenikooli ja erütromütsiini suhtes, mis seonduvad peamiselt 50S subühikule. Kontroll-antibiootikumina kasutati rifampiini, mis inhibeerib RNA sünteesi (Wilson, 2014).

Tabelis 9 on välja toodud erinevate antibiootikumide kontsentratsioon, mis vähendab bakterikultuuride optilist tihedust poole võrra ehk pool maksimaalsest inhibitoorsest kontsentratsioonist (IC₅₀).

LISAs 3 on välja toodud ka bakterikultuuride inhibitsioonikõverad.

Tabel 9. *Wild type* ning mutanttüvede IC₅₀ erinevate antibiootikumide suhtes.

IC 50 (µg/ml)			
Antibiootikum	MG 1655 wt	MG Δ8 (ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN)	MG Δ9 (ΔrluB ΔrluC ΔrluF ΔrlmB ΔrlmE ΔrlmKL ΔrlmM ΔrlmN)

Rifampiin	11.5	11	11
Kanamütsiin	3	9	4.7
Streptomütsiin	4.5	1.8	9
Klooramfenikool	1.2	1.1	1.1
Erütromütsiin	181	58	38

ARUTELU

Ribosomaalne RNA sisaldab konserveerunud funktsionaalsetes piirkondades erinevaid RNA modifikatsioone. 50S subühiku rRNA peptidüültransferaasest tsentrit moodustavad piirkonnad sisaldavad suurema osa 23S rRNA modifikatsioonidest (Ofengand ja Del Campo, 2004). Modifikatsioonide roll ribosoomis ei ole veel täiesti selge. Green ja Noller pakkusid 1996. aastal välja, et *E. coli* 23S rRNA sisaldab 80-nukleotiidset piirkonda, mille modifikatsioonid on ribosoomi funktsionaalsuse jaoks hädavajalikud (Green & Noller, 1996).

Aastaid on spekulieritud, et modifikatsioonidel on mitmeid rolle. Eraldiseisvatena pakutakse modifikatsioonide rolliks ribosoomi peenhäälestamist (ingl.k *fine-tuning*), mis üheskoos võimenduvad. Lisaks on näidatud ka seoseid antibiootikumide tundlikkuse ja modifikatsioonide vahel (Long *et al.*, 2006; Toh *et al.*, 2008).

1. 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumine põhjustab aeglasemat kasvu

Käesoleva magistritöö tulemustest selgub, et peaaegu kõigi *Escherichia coli* 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumisel väheneb bakterirakkude kasvukiirus neljakordselt (joonis 11). Eriti võimendab generatsiooniaja pikenemist RlmE poolt sünteesitava modifikatsiooni Um2552 puudumine A-lingus. Ilma Um2552 puudumisest tingitud efektita, on MG Δ 8 tüve kasvukiirus kaks korda aeglasem kui metsiktüüpi tüvel. Seejuures tuleb märkida, et võrreldes metsiktüübiga põhjustab ainuüksi Um2552 puudumine 23S rRNAs kaks korda aeglasemat kasvukiirust (Caldas *et al.*, 2000). Seega ei tulene MG Δ 9 4x kasvukiiruse vähenemine ainult RlmE puudumisest, vaid see võimendub kõigi käesoleva töö raames deleteeritud modifikatsioonide koosmõjul.

Aeglase kasvukiiruse põhjustele heidab valgust ribosoomide saharoosgradiendi analüüs (joonis 12). Nimelt on MG Δ 9 domeeni V üheksa modifikatsiooni puudumisel esialgne ribosoomide profiil metsiktüüpi ribosoomide profiilist väga erinev. Funktsionaalseid 70S ribosome on oluliselt vähem kui metsiktüüpi tüves (Joonis 12C ja D). Vähenenud ribosoomide võrra on aga suurenenud vabade 50S ja 30S partiklite osakaal rakus. Kuna funktsionaalseid ribosome on vähe, siis on ka polüsoome oluliselt vähem, mis viitab väiksemale valgusünteesi tasemele. Keskmistel temperatuuridel on konkreetsel kasvukiirusel ribosoomide hulk rakus konstantne ning peptiidahela elongatsioon ja rakkude kasvukiirus võrdelises seoses. Seega sõltub neil tingimustel rakkude kasvukiirus translatsiooni tasemest (Farewell ja Neidhardt,

1998). Magistritöö tulemused on kooskõlas rakkude kasvukiiruse ja funktsionaalsete ribosoomide hulga seosega.

RlmE puudumisel on MG $\Delta 9$ inaktiivsete vabade 50S partiklite (tulemused näitamata) osakaal normaalsest suurem (joonis 12C ja D). Kuna RlmE poolt sünteesitav modifikatsioon käivitab 50S subühiku hilise assambleerimise faasi (Arai et al., 2015), on alust spekuloida, et vabade subühikute suur hulk on põhjustatud lõplikult assambleerumata 50S subühikutest. Seega on Um2552 oluline ribosoomi lõplikuks valmimiseks ja funktsionaalsuse saavutamiseks. Um2552 puudumine koos teiste modifikatsioonidega 23S rRNA domeenis V ei ole rakkudele letaalne. Ribosoomide biogeneesis tekivad funktsionaalsed 70S ribosoomid ja polüsoomid, kuigi väiksemas hulgas, viitab see et, ajapikku saavutab 50S partikkel funktsionaalsuse ka ilma Um2552 modifikatsioonita.

Eluvormidele omaselt toimub ka konstrueeritud mutantüves MG $\Delta 9$ adapteerumine tekkinud olukordadega. Andmed viitavad, et MG $\Delta 9$ tüves tekivad ajas kompenseerivad mutatsioonid, mis kajastuva ka sahharoosi gradiendi profiilides (Joonis 12C ja D). Kuna analoogset kompensatsiooni on näidatud ka $\Delta rlmE$ tüves, kus väikeste GTPaaside üleekspressioon taastab fenotüübilisi defekte (Tan, Jakob ja Bardwell, 2002) ei ole alust arvata, et tegemist on kanamütsiini kasseti poolt põhjustatud fenotüübilise erinevusega. Lisaks võivad fenotüübi taastumisele kaasa aidata ka kompenseerivad mutatsioonid mujal genoomis.

Ka MG $\Delta 8$ tüvi näitab üles väikest fenotüübilist efekti, nimelt on selle tüve generatsiooniaeg kaks korda pikem (joonis 11) ning ribosoomigradiendi profiililt selgub, et 50S vabade partiklite osakaal on veidi suurenenud võrreldes *wt* tüvega (joonis 12B). Varasemate andmete põhjal on teada, et 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümide individuaalsel deleteerimisel omab fenotüübilist efekti vaid RlmE deleteerimine (Caldas et al., 2000). Käesoleva töö tulemused näitavad, et erinevatel rRNA modifikatsioonidel on kooperatiivne toime. Eraldivõttes modifikatsioonide puudumisel fenotüübiline mõju puudub, kuid mitme modifikatsiooni samaaegne puudumine vähendab oluliselt funktsionaalsete ribosoomide taset rakkudes ja seeläbi ka kasvukiirust. See toetab hüpoteesi, et rRNA modifikatsioonid on osa ribosoomi funktsiooni peenhäälestusest ja nende kadumine omab kumulatiivset efekti.

2. *In vitro* PTC aktiivsus säilib ka 50S partiklite töötlemisel

In vitro peptidültransferaasne aktiivsus on MG $\Delta 9$ tüve 50S subühikus madalam kui MG $\Delta 8$ või *wt* tüve PTC aktiivsus. Siiski säilib 50S partiklil peptidültransferaasne aktiivsus erinevatel

temperatuuridel (LISA 4) ja Mg kontsentratsioonidel (Joonis 13). Kuigi PTC aktiivsus erinevatel tingimustel säilib, on seos Mg ionide kontsentratsiooni ja PTC aktiivsuse vähenemise vahel. Mida suurem on Mg kontsentratsioon, seda väiksemaks muutub PTC aktiivsus nagu juba varem teada oli (Petropoulos *et al.*, 2004). See võib viidata, et Mg ionide ülehulk takistab peptidüültransferaasi toimumist kuna põhjustab ribosoomi struktuuri suuremat stabiliseeritust ja vähendades sellega vajalike konformatsiooniliste muutuste toimumise tõenäosust. Kuna tRNA roteerumine PTC taskus on oluline aminohappe ülekandeks sünteesitavale petiidahelale (Agmon *et al.*, 2005), siis võib Mg-ionide struktuuriline inhibitsiooni olla seotud tRNA 3' CCA otsa roteerumise takistamisega. Ka PTC aktiivsuse määramise katsest selgub, et peamiselt põhjustab PTC väiksemat aktiivsust erinevatel Mg-ionide kontsentratsioonil Um2552 puudumine A-lingust, kuna MG $\Delta 8$ tüve PTC aktiivsus on sarnane metsiktüüpi tüve PTC aktiivsusele.

PTC aktiivsuse katsetest selgus ka, et pooletunnine inkubatsioon kõrgel temperatuuril (50°C-56°C) ei põhjusta PTC aktiivsuse märkimisväärset vähenemist (LISA 4). Seega on 50S partikli peptidüültransferaasne tsepter oma olemuselt piisavalt robustse ehitusega, et olla stabiilne ning temperatuurist sõltuvat PTC kahjustust selles temperatuurivahemikus ei toimu. Seega tundub, et modifikatsioonid ei oma PTC struktuuri stabiilsusest lähtuvalt suurt mõju peptidüültransferaasi aktiivsusele. Teiselt poolt on aga alamodifitseeritud ribosoomide peptidüültransferaasne keskus (MG $\Delta 9$) tundlikum magneesiumi põhjustatud inhibitsioonile.

In vitro valgusünteesi protsessiivsus on mõlemal mutanttüvel väiksem kui metsiktüüpi tüvel (joonis 15). Kui 50S partikli peptidüültransferaasse reaktsiooni aktiivsuse puhul ei olnud *wild type* ja MG $\Delta 8$ tüvedel suuri erinevusi, siis modifikatsioonide puudumine 23S rRNA domeenist V põhjustab polü(U) sõltuva polüfenüülalaniini sünteesikiiruse vähenemist võrrelduna *wt* ribosoomidega. Kuna potentsiaalselt ei saa tegemist olla peptidüültransferaasi reaktsiooni enda defektiga, siis võib spekuloida, et probleemid on kas valgusünteesi initsiatsiooni- või elongatsioonifaasis. Samas võib aeglasem translatsioon olla põhjustatud aktiivsete ribosoomide väiksemast osast kogu ribosoomide populatsioonis.

MG $\Delta 9$ ribosoomide veelgi aeglasema valgusünteesi kiiruse, võrrelduna MG $\Delta 8$ ribosoomidega, peamiseks faktoriks võiks olla PTC madalam aktiivsus, kuid ei saa kindlasti välistada ka initsiatsiooni või elongatsiooni protsessiga seotud võimalikke probleeme. Edasised katsed peavad näitama, mis on täpselt madalama translatsioonitaseme põhjus, kas aeglasemad ribosoomid või funktsionaalsete ribosoomide väiksem osakaal.

3. Domeeni V modifikatsioonide puudumine soodustab translatsioonilisi vigu

Looduses on valgusüntees optimeeritud kiiruse ja täpsuse suhtes. Valgusüntees peab olema piisavalt kiire ja samas ka piisavalt täpne. Keskmiselt teeb bakteriaalne ribosoom $10^{-4} - 10^{-3}$ viga ühe koodoni kohta (Kurland, 1992). Kiiruse ning täpsuse tasakaal on oluline bakteriraku kohasuse (*fitnessi*) hoidmiseks. Kui rakk teeb valgusünteesil palju vigu, siis võivad tekkida peptiidahelad, mis pole võimelised funktsionaalseks valguks voltuma. Sellised valgud võivad võtta alternatiivseid struktuure ja olla rakule toksilised (Kohanski *et al.*, 2008). Teisalt on näidatud, et translatsioonilised vead võivad rakule teatud tingimustes kasulikuks osutada (Fan *et al.*, 2015).

PTC piirkonnaga seotud modifikatsioonidest on varem näidatud, et Um2552 puudumine põhjustab vigade tõusu valgusünteesi käigus (Caldas *et al.*, 2000). MG $\Delta 9$ ribosoom teeb translatsioonil vigu (joonis 16 ja 17), millest kõige sagedasem on UAG stopp-koodoni üle lugemine. Väiksemas mastaabis teeb ribosoom ka -1 kui +1 raaminihet ja UGA üle lugemist. Seejuures on veidi vähenenud ka *wild type* LacZ süntees võrreldes metsiktüüpi tüvega, mis on samuti seletatav vigade tekkimisega translatsiooni käigus.

Tavaliselt toimub lugemisraamis stopp-koodoni esinemisel mRNAs translatsiooni terminatsioon. Erinevalt teistest koodonitest tunnevad tavaliselt stopp-koodoni ära terminatsioonifaktor RF1 või RF2, mis suunavad peptiidi vabanemist ribosoomilt. Terminatsiooni supressioon ehk stopp-koodoni üle lugemine toimub siis, kui terminatsioonifaktorite asemel seondub mRNA koodonile mõni tRNA. UAG stopp-koodoni üle lugemise puhul toimub aatRNA seondumine efektiivsemalt kui RF-1 poolt suunatud terminatsioonisündmus (Nakamura ja Ito, 1998).

23S rRNA domeeni V enamuse modifikatsioonide puudumine tundub olevat seotud translatsioonilise täpsuse vähenemisega. Kahjuks ei võimalda käesolevad tulemused eristada, kui suur osa translatsiooni vigadest on põhjustatud modifikatsiooni Um2552 puudumisest ja kui suur osa ülejäänud modifikatsioonide puudumisest. Selle suhte välja selgitamiseks on oluline analüüsida ka MG $\Delta 8$ translatsioonivigade suhet metsiktüüpi tüvega. Translatsioonitäpsuse vähenemine on ilmselt üks põhjustest, miks enamuse modifikatsioonide puudumisel ilmneb mutandil neli korda aeglasem kasvufenotüüp.

4. PTC modifikatsioonid vähendavad tundlikkust erütromütsiinile

Bakterite kasvu inhibeerimisel on valgusünteesi mehhanism üks peamisi sihtmärke. Antibiootikumide mõju vältimiseks on mitmeid mehhanisme, millest üks on ka rRNA sihtmärknukleotiidide modifitseerimine (Liu ja Douthwaite, 2002). Enamasti on antibiootikumidele tundlikkuse vähenemise või resistentsuse tekkimisega seotud erinevad metülatsioonid. *E. coli* 23S rRNA domeen V sisaldab kokku kuut rRNA metülatsiooni (Ofengand ja Del Campo, 2004).

Domeeni V modifikatsioonide üheaegse puudumise mõju antibiootikumide tundlikkusele ei ole varem uuritud. 50S subühiku tundlikkuse välja selgitamiseks A saiti ründavate antibiootikumide suhtes kasutati antibiootikume erütromütsiin ja klooramfenikool (tabel 9). Kuigi klooramfenikool seondub ribosoomi A-saiti, siis on tavaliselt resistentsusmehhanismid seotud antibiootikumi molekuli ensümaatilise inaktiveerimise või rakust välja pumpamisega. Sellest tulenevalt leiti käesoleva töö raames, et modifikatsioonide puudumine ei mõjuta ribosoomide tundlikkust klooramfenikoolile (tabel 9). Samas on mõlemad mutanttüved tundlikumad erütromütsiini suhtes. MG $\Delta 8$ on metsiktüüpi tüvest kolm korda tundlikum ning MG $\Delta 9$ 4.5 korda tundlikum. Erinevalt klooramfenikoolist seondub erütromütsiin peptiidahela väljumistunneli juurde ja blokeerib sünteesitava peptiidahela väljumise ribosoomist.

Arvestades asjaolu, et ka magneesium inhibeerib mutantseid ribosome rohkem kui metsiktüübi ribosome, siis viitab MG $\Delta 8$ ja MG $\Delta 9$ ülitundlikkus erütromütsiinile ribosoomi peptidüültransferaase tsentri struktuuri muutusele. See on kooskõlas rRNA modifikatsioonide struktuurse rolliga peptidüültransferaase tsentri organiseerimisel.

Kuigi aminoglükosiidid kanamütsiin ja streptomütsiin seonduvad peamiselt 30S partikliga, on neil siiski kontakte ka 50S partikliga (Scheunemann *et al.*, 2010). Streptomütsiini kohta on näidatud, et peamised kontaktid 50S subühikus toimuvad rRNAga (Melancon & Brakier-Gingras, 1985). Streptomütsiini korral on MG $\Delta 9$ tüve tundlikkus kaks korda madalam kui *wild type* tüvel. Streptomütsiini kohta on näidatud, et peamised kontaktid 50S subühikus toimuvad rRNAga ja potentsiaalselt isegi peptidüültransferaase tsentri läheduses (Melancon & Brakier-Gingras, 1985). See tähendab, et modifikatsioonide puudumisel muutub peptidüültransferaase piirkonna struktuur piisavalt palju, et üheksa puuduoleva modifikatsiooni korral muutub *E. coli* MG $\Delta 9$ streptomütsiinile vähem tundlikuks. See võib viidata modifikatsioonide või modifikatsioonide poolt mõjutatud 23 rRNA struktuuri muutumisele niisuguseks, et streptomütsiini efekt MG $\Delta 9$ tüves valgusünteesile nõrgeneb.

Seega vastupidiselt erütromütsiinile muudavad 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid üheskoos ribosoomi streptomütsiinile veidi tundlikumaks. Samas tulenevalt MG $\Delta 9$ väga aeglasest kasvukiirusest tuleks antibiootikumide tundlikkusega seotud katseid korrata ka teistes kasvutingimustes ja teiste ribosoomi seonduvate antibiootikumidega, millel võiks olla potentsiaalne kontakt 23S rRNA domeenis V paiknevate modifikatsioonidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise mõju valgusünteesile. PTC piirkonna modifikatsioonide puudumine põhjustab rakkude generatsiooniaja neljakordset pikenemist. Selle põhjuseks võib olla *in vitro* katsetes välja selgitatud valgusünteesi aeglasem kiirus, kuid on võimalik, et efekt tuleneb aktiivsete ribosoomide alampopulatsiooni madalamast osakaalust võrreldes *wild type* ribosoomidega. Üheksa modifikatsiooni puudumisel on 50S partiklite peptidüültransferaasne aktiivsus madalam kui metsiktüüpi 50S subühikute aktiivsus. Lisaks panustab fenotüübi väljakujunemisse ka translatsiooniliste vigade suurem toimumise sagedus. Eriti aktiivselt toimub UAG stopp-koodoni ülelugemine, peale selle teevad mutantsed ribosoomid transleerimisel ka raaminihke vigu rohkem kui referentstüve ribosoomid.

Fenotüübi kujunemisel on suurima efektiga modifikatsiooni Um2552 puudumine. Teiste modifikatsioonide üheaegne puudumine omab väiksemat efekti, kuid on siiski märkimisväärne. Modifikatsioonide puudumisel ei ole suurt mõju PTC struktuurilisele stabiilsusele. Võib-olla on nende mõju olulisem elongatsiooni initsiatsiooni faasile ning tRNA interaktsioonidele PTC tasku seinaga nukleotiididega ja seega korrektsele positsioneerumisele PTC taskus. Ühtlasi võivad modifikatsioonid osaleda PTC nukleotiidses struktuuri moduleerimises ja mõjutada tundlikkust erinevatele antibiootikumidele.

E. coli 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide mõju translatsiooni peenhäälestamisele on arvestatav. Sellegipoolest ei ole nad ribosoomi funktsioneerimiseks hädavajalikud, nagu pakkusid 1996. aastal välja Harry Noller ja Rachel Green.

The role of 23S rRNA modifications in protein synthesis

Triin Truu

SUMMARY

Ribosomes are responsible for the protein synthesis in all kingdoms of life. In order for the cell to survive and strive - proteins, the building blocks of all cellular and non-cellular organisms, must be synthesized efficiently. Therefore, ribosome has to be efficient.

The heart of the ribosome lies in the 50S subunit where the ribozyme lives. 23S rRNA domain V contains the peptidyl transferase centre (PTC) which catalyzes peptide chain elongation and therefore protein synthesis. Many modified nucleosides are clustered in the PTC area which have been proposed to have an effect on protein synthesis. Geen and Noller hypothesized the existence of 80 nucleotide area in domain V of 23S rRNA in which the modifications are essential (Green and Noller, 1996). From previous work it has been shown that single deletion of a modification has no effect on *Escherichia coli* phenotype (Del Campo *et al.*, 2001; Lovgren and Wikstrom, 2001).

In this work it is demonstrated that the modifications in the PTC area are not essential for the ribosome to function. Instead they fine-tune the ribosome for efficient translation. Deletion of most of the domain V modifications in 23S rRNA has an effect on the overall activity of peptidyl transferase reaction. *In vitro* protein synthesis is slower than with wild type ribosomes. Growth of mutant bacteria is 4-fold slower than wild type *E. coli*. Also modifications in domain V help keep the ribosome less faulty. Deletion of domain V modification caused more translational mistakes, for example UAG stop codon readthrough and frameshifting. Some evidence is supporting the fact that PTC area modifications help keep ribosome less sensitive to ribosome targeting antibiotics.

Even though a lot of work has been done with understanding the importance of the 23S rRNA domain V modifications there are still some aspects to learn. For example the speed of protein synthesis could shed some light whether modification free PTC has problems with initiation or some other translation phases.

TÄNUSÕNAD

Minu eriline tänu läheb juhendajale Margus Leppikule, kes lisaks magistritöö suurepärasele juhendamisele on nende kahe magistrantuuriõppe aasta jooksul osalenud ka teistes minu jaoks oluliste protsesside abistamisel, näiteks biomeditsiini magistriõppekava arendamises.

Veel tänan professor Jaanus Remmet, et ta mulle sellise ribosoomimaailma avardava ülesande usaldas. Eraldi tootsin välja ka Aivar Liivi, kes peaaegu igale laboritööd puudutavale küsimusele vastuse ja lahenduse suutis pakkuda.

Täna ka kõiki molekulaarbioloogia ja biokeemia õppetooli inimesi, kellega laboris koos töötamine kogu eluks meelde jääva kogemuse annab.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid

- Agirrezabala, X., & Frank, J. (2009). Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 42(3), 159–200. <http://doi.org/10.1017/S0033583509990060>
- Agmon, I., Auerbach, T., Baram, D., Bartels, H., Bashan, A., Berisio, R., ... Zarivach, R. (2003, June). On peptide bond formation, translocation, nascent protein progression and the regulatory properties of ribosomes. Derived on 20 October 2002 at the 28th FEBS Meeting in Istanbul. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. Germany.
- Agmon, I., Bashan, A., Zarivach, R., & Yonath, A. (2005). Symmetry at the active site of the ribosome: structural and functional implications. *Biological Chemistry*, 386(9), 833–844. <http://doi.org/10.1515/BC.2005.098>
- Agrawal, R. K., Spahn, C. M., Penczek, P., Grassucci, R. A., Nierhaus, K. H., & Frank, J. (2000). Visualization of tRNA movements on the Escherichia coli 70S ribosome during the elongation cycle. *The Journal of Cell Biology*, 150(3), 447–460.
- Andersen, T. E., Porse, B. T., & Kirpekar, F. (2004). A novel partial modification at C2501 in Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(6), 907–913.
- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015). Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), E4707–16. <http://doi.org/10.1073/pnas.1506749112>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008. <http://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*, 289(5481), 905–920. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/289/5481/905.abstract>
- Bashan, A., Agmon, I., Zarivach, R., Schlunzen, F., Harms, J., Berisio, R., ... Yonath, A. (2003). Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Molecular Cell*, 11(1), 91–102.
- BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., ... Cate, J. H. D. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(8), 727–732. <http://doi.org/10.1038/nsmb1271>
- Brimacombe, R., Mitchell, P., Osswald, M., Stade, K., & Bochkariov, D. (1993). Clustering of modified nucleotides at the functional center of bacterial ribosomal RNA. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(1), 161–167.
- Bugl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., ... Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Molecular Cell*, 6(2), 349–360.

- Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G., & Steitz, T. A. (2010). Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17158–17163. <http://doi.org/10.1073/pnas.1008685107>
- Cabanas, M. J., Vazquez, D., & Modolell, J. (1978). Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *83*(3), 991–997.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., & Richarme, G. (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16414–16419. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001854200>
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., & Richarme, G. (2000). Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um(2552) 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *271*(3), 714–718. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2702>
- Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., ... Gutell, R. R. (2002). The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, *3*, 2.
- Cantara, W. A., Crain, P. F., Rozenski, J., McCloskey, J. A., Harris, K. A., Zhang, X., ... Agris, P. F. (2011). The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database issue), D195–201. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq1028>
- Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, *158*(1), 9–14.
- Chow, C. S., Lamichhane, T. N., & Mahto, S. K. (2007). Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chemical Biology*, *2*(9), 610–619. <http://doi.org/10.1021/cb7001494>
- Clementi, N., Chirkova, A., Puffer, B., Micura, R., & Polacek, N. (2010). Atomic mutagenesis reveals A2660 of 23S ribosomal RNA as key to EF-G GTPase activation. *Nature Chemical Biology*, *6*(5), 344–351. <http://doi.org/10.1038/nchembio.341>
- Clemons, W. M., May, J. L., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., & Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, *400* VN - (6747), 833–840. <http://doi.org/10.1038/23631>
- Conrad, J., Sun, D., Englund, N., & Ofengand, J. (1998). The rluC gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(29), 18562–18566.
- Crick, F. H. C. (1968). The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology*, *38*(3), 367–379. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90392-6](http://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90392-6)
- Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annual Review of Microbiology*, *43*, 207–233. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.001231>
- Davidovich, C., Belousoff, M., Bashan, A., & Yonath, A. (2009). The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery. *Research in Microbiology*, *160*(7), 487–492. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.004>
- Davies, J., & Davis, B. D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(12), 3312–3316.

- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 344–351. [http://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](http://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Del Campo, M., Kaya, Y., & Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), 1603–1615.
- Del Campo, M., Recinos, C., Yanez, G., Pomerantz, S. C., Guymon, R., Crain, P. F., ... Ofengand, J. (2005). Number, position, and significance of the pseudouridines in the large subunit ribosomal RNA of *Haloarcula marismortui* and *Deinococcus radiodurans*. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(2), 210–219. <http://doi.org/10.1261/rna.7209905>
- Dennis, P. P., Omer, A., & Lowe, T. (2001). A guided tour: small RNA function in Archaea. *Molecular Microbiology*, 40(3), 509–519.
- Doris, S. M., Smith, D. R., Beamesderfer, J. N., Raphael, B. J., Nathanson, J. A., & Gerbi, S. A. (2015). Universal and domain-specific sequences in 23S-28S ribosomal RNA identified by computational phylogenetics. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(10), 1719–1730. <http://doi.org/10.1261/rna.051144.115>
- Douthwaite, S., Fourmy, D., & Yoshizawa, S. (2005). Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. In H. Grosjean (Ed.), (pp. 285–307). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/b105586>
- Fan, Y., Wu, J., Ung, M. H., De Lay, N., Cheng, C., & Ling, J. (2015). Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1740–1748. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1404>
- Farewell, A., & Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4704–4710.
- Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., & Stark, H. (2015). Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, 520(7548), 567–570. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature14275>
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., ... Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 113(6), 789–801.
- Gehrke, C. W., & Kuo, K. C. (1989). Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 471, 3–36.
- Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., ... Kirpekar, F. (2009). Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(2), 327–336. <http://doi.org/10.1261/rna.1371409>
- Golovina, A. Y., Dzama, M. M., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2012). The last rRNA methyltransferase of *E. coli* revealed: the yhiR gene encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A2030 of 23S ribosomal RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(9), 1725–1734. <http://doi.org/10.1261/rna.034207.112>
- Green, R., & Noller, H. F. (1996). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(10), 1011–1021.
- Green, R., & Noller, H. F. (1999). Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry*, 38(6), 1772–1779. <http://doi.org/10.1021/bi982246a>

- Gulen, B., Petrov, A. S., Okafor, C. D., Vander Wood, D., O'Neill, E. B., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2016). Ribosomal small subunit domains radiate from a central core. *Scientific Reports*, *6*, 20885. <http://doi.org/10.1038/srep20885>
- Gustafsson, C., & Persson, B. C. (1998). Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m1G745-deficient mutant. *Journal of Bacteriology*, *180*(2), 359–365.
- Hamma, T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & Biology*, *13*(11), 1125–35. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.009>
- Hansen, J. L., Schmeing, T. M., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2002). Structural insights into peptide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18), 11670–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.172404099>
- Hansen, L. H., & Vester, B. (2015). A cfr-like gene from *Clostridium difficile* confers multiple antibiotic resistance by the same mechanism as the cfr gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(9), 5841–5843. <http://doi.org/10.1128/AAC.01274-15>
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., ... Yonath, A. (2001). High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium. *Cell*, *107*. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00546-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00546-3)
- Havelund, J. F., Giessing, A. M. B., Hansen, T., Rasmussen, A., Scott, L. G., & Kirpekar, F. (2011). Identification of 5-hydroxycytidine at position 2501 concludes characterization of modified nucleotides in *E. coli* 23S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, *411*(3), 529–36. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.036>
- Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Research*, *34*(2), 721–733. <http://doi.org/10.1093/nar/gkj471>
- Ippolito, J. A., Kanyo, Z. F., Wang, D., Franceschi, F. J., Moore, P. B., Steitz, T. A., & Duffy, E. M. (2008). Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(12), 3353–3356. <http://doi.org/10.1021/jm800379d>
- Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., & Maddock, J. R. (2007). Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques. *Journal of Bacteriology*, *189*(9), 3434–3444. <http://doi.org/10.1128/JB.00090-07>
- Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ beta-galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *21*(12), 1792–1807. <http://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Kallia-Raftopoulos, S., Kalpaxis, D. L., & Coutsogeorgopoulos, C. (1994). New aspects of the kinetics of inhibition by lincomycin of peptide bond formation. *Molecular Pharmacology*, *46*(5), 1009–1014.
- Kannan, K., & Mankin, A. S. (2011). Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1241*, 33–47. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x>
- Kaya, Y., & Ofengand, J. (2003). A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *RNA (New York, N.Y.)*, *9*(6), 711–721.
- Khaitovich, P., Mankin, A. S., Green, R., Lancaster, L., & Noller, H. F. (1999). Characterization of functionally active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(1), 85–90.

- Kim, D. F., & Green, R. (1999). Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Molecular Cell*, 4(5), 859–864.
- Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2012). Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 4071–4085. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr1287>
- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal*, 20(14), 3617–3622. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., & Collins, J. J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135(4), 679–690. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.038>
- Koonin, E. V. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic Acids Research*, 24(12), 2411–2415.
- Kowalak, J. A., Bruenger, E., & McCloskey, J. A. (1995). Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in Escherichia coli 23 S ribosomal RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17758–17764.
- Kurland, C. G. (1992). Translational accuracy and the fitness of bacteria. *Annual Review of Genetics*, 26, 29–50. <http://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.000333>
- Leppik, M., Peil, L., Kipper, K., Liiv, A., & Remme, J. (2007). Substrate specificity of the pseudouridine synthase RluD in Escherichia coli. *The FEBS Journal*, 274(21), 5759–5766. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06101.x>
- Lesnyak, D. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2006). Identification of Escherichia coli m2G methyltransferases: I. the ycbY gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 364(1), 20–25. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.009>
- Liu, M., & Douthwaite, S. (2002). Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14658–14663. <http://doi.org/10.1073/pnas.232580599>
- Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., & Vester, B. (2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), 2500–2505. <http://doi.org/10.1128/AAC.00131-06>
- Long, K. S., & Vester, B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms, with an Emphasis on Those Related to the Ribosome. *EcoSal Plus*, 3(1). <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.2.5.7>
- Long, K. S., & Vester, B. (2012). Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 603–612. <http://doi.org/10.1128/AAC.05702-11>
- Lovgren, J. M., & Wikstrom, P. M. (2001). The rlmB gene is essential for formation of Gm2251 in 23S rRNA but not for ribosome maturation in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6957–6960. <http://doi.org/10.1128/JB.183.23.6957-6960.2001>
- Maden, B. E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 39, 241–303.
- Maden, B. E., & Hughes, J. M. (1997). Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the

- nucleotide modification problem. *Chromosoma*, 105(7-8), 391–400.
- Madsen, C. T., Mengel-Jorgensen, J., Kirpekar, F., & Douthwaite, S. (2003). Identifying the methyltransferases for m(5)U747 and m(5)U1939 in 23S rRNA using MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 4738–4746.
- Martin, J. L., & McMillan, F. M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), 783–793.
- Melancon, P., & Brakier-Gingras, L. (1985). Cross-linking of streptomycin to the 50S subunit of *Escherichia coli* with phenyldiglyoxal. *Biochemistry*, 24(22), 6089–6095.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 560–567. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2313>
- Moazed, D., & 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.
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, 57(4), 585–597.
- Monro, R. E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 26(1), 147–151.
- Nakamura, Y., & Ito, K. (1998). How protein reads the stop codon and terminates translation. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(5), 265–278.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., & Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 736–747.
- Noeske, J., Wasserman, M. R., Terry, D. S., Altman, R. B., Blanchard, S. C., & Cate, J. H. D. (2015). High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(4), 336–341. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2994>
- Noller, H. F. (2004). The driving force for molecular evolution of translation. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(12), 1833–1837. <http://doi.org/10.1261/rna.7142404>
- Noller, H. F., Hoffarth, V., & Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5062), 1416–1419.
- Noller, H. F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R. R., Kopylov, A. M., ... Woese, C. R. (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 9 (22), 6167–6189. <http://doi.org/10.1093/nar/9.22.6167>
- O'Connor, M. (2001). Mutagenesis of the peptidyltransferase center of 23S rRNA: the invariant U2449 is dispensable. *Nucleic Acids Research*, 29(3), 710–715. <http://doi.org/10.1093/nar/29.3.710>
- O'Connor, M., & Dahlberg, A. E. (1993). Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), 9214–9218.
- Oehler, R., Polacek, N., Steiner, G., & Barta, A. (1997). Interaction of tetracycline with RNA: photoincorporation into ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 25(6), 1219–1224.
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Letters*, 514. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02305-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02305-0)

- Ofengand, J., & Del Campo, M. (2004). Modified Nucleosides of Escherichia coli Ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, 1(1). <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.4.6.1>
- Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutsell, N. S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., ... Kaya, Y. (2001). Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 66. <http://doi.org/10.1101/sqb.2001.66.147>
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., & Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the Ribosome Requires a Transition from an Open to a Closed Form. *Cell*, 111(5), 721–732. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01086-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01086-3)
- Peske, F., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2004). Conformational changes of the small ribosomal subunit during elongation factor G-dependent tRNA-mRNA translocation. *Journal of Molecular Biology*, 343(5), 1183–1194. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.097>
- Petropoulos, A. D., Xaplanteri, M. A., Dinos, G. P., Wilson, D. N., & Kalpaxis, D. L. (2004). Polyamines affect diversely the antibiotic potency: insight gained from kinetic studies of the blasticidin S AND spiramycin interactions with functional ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26518–26525. <http://doi.org/10.1074/jbc.M313634200>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., ... Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 41(15), 7522–35. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt513>
- Petrov, A. S., Gulen, B., Norris, A. M., Kovacs, N. A., Bernier, C. R., Lanier, K. A., ... Williams, L. D. (2015). History of the ribosome and the origin of translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), 15396–15401. <http://doi.org/10.1073/pnas.1509761112>
- Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, M., Avila, H., ... Franceschi, F. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, 20(8), 1829–1839. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1829>
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2009). YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Molecular Microbiology*, 72(5), 1147–1158. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06709.x>
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell*, 108(4), 557–572. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00619-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00619-0)
- Raychaudhuri, S., Niu, L., Conrad, J., Lane, B. G., & Ofengand, J. (1999). Functional effect of deletion and mutation of the Escherichia coli ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 18880–18886.
- Rozenki, J., Crain, P. F., & McCloskey, J. A. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 196–197.
- Samaha, R. R., Green, R., & Noller, H. F. (1995). A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature*, 377(6547), 309–314. <http://doi.org/10.1038/377309a0>
- Scheunemann, A. E., Graham, W. D., Vendeix, F. A. P., & Agris, P. F. (2010). Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 38(9), 3094–3105. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp1253>
- Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., ... Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413(6858), 814–821. <http://doi.org/10.1038/35101544>

- Schmeing, T. M., Voorhees, R. M., Kelley, A. C., Gao, Y.-G., Murphy, F. V., Weir, J. R., & Ramakrishnan, V. (2009). The Crystal Structure of the Ribosome Bound to EF-Tu and Aminoacyl-tRNA. *Science*, 326(5953), 688–694. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/326/5953/688.abstract>
- Schumacher, A., Trittler, R., Bohnert, J. A., Kummerer, K., Pages, J.-M., & Kern, W. V. (2007). Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1261–1264. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl380>
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., & Cate, J. H. D. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5749), 827–834. <http://doi.org/10.1126/science.1117230>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Sergiev, P. V., Lesnyak, D. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2006). Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: II. The *ygjO* gene encodes a methyltransferase specific for G1835 of the 23 S rRNA. *Journal of Molecular Biology*, 364(1), 26–31. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.008>
- Sergiev, P. V., Serebryakova, M. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2008). The *ybiN* gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23 S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), 291–300. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.051>
- Siibak, T., & Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(10), 2023–2032. <http://doi.org/10.1261/rna.2160010>
- Sirum-Connolly, K., & Mason, T. L. (1993). Functional requirement of a site-specific ribose methylation in ribosomal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5141), 1886–1889.
- Sloof, P., Van den Burg, J., Voogd, A., Benne, R., Agostinelli, M., Borst, P., ... Noller, H. (1985). Further characterization of the extremely small mitochondrial ribosomal RNAs from trypanosomes: a detailed comparison of the 9S and 12S RNAs from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* with rRNAs from other organisms. *Nucleic Acids Research*, 13(11), 4171–4190.
- Smith, T. F., Lee, J. C., Gutell, R. R., & Hartman, H. (2008). The origin and evolution of the ribosome. *Biology Direct*, 3(1), 16. <http://doi.org/10.1186/1745-6150-3-16>
- Steiner, G., Kuechler, E., & Barta, A. (1988). Photo-affinity labelling at the peptidyl transferase centre reveals two different positions for the A- and P-sites in domain V of 23S rRNA. *The EMBO Journal*, 7(12), 3949–3955.
- Sternberg, N. (1990). Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1), 103–107.
- Subramanian, A. R., & Dabbs, E. R. (1980). Functional studies on ribosomes lacking protein L1 from mutant *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 112(2), 425–430.
- Zhang, B., & Cech, T. R. (1998). Peptidyl-transferase ribozymes: trans reactions, structural characterization and ribosomal RNA-like features. *Chemistry & Biology*, 5(10), 539–553. [http://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90113-2](http://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90113-2)
- Zhou, J., & Rudd, K. E. (2013). EcoGene 3.0. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D613–24.

<http://doi.org/10.1093/nar/gks1235>

- Tan, J., Jakob, U., & Bardwell, J. C. A. (2002). Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *Journal of Bacteriology*, *184*(10), 2692–2698.
- Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, *330*(5), 1005–1014.
- Toh, S.-M., & Mankin, A. S. (2008). An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, *380*(4), 593–597. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.027>
- Toh, S.-M., Xiong, L., Bae, T., & Mankin, A. S. (2008). The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(1), 98–106. <http://doi.org/10.1261/rna.814408>
- Wachino, J., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, *15*(3), 133–148. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2012.05.001>
- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews. Microbiology*, *1*(1), 65–70. <http://doi.org/10.1038/nrmicro727>
- Wang, K.-T., Desmolaize, B., Nan, J., Zhang, X.-W., Li, L.-F., Douthwaite, S., & Su, X.-D. (2012). Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m7G2069 and m2G2445 modifications in Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Research*, *40*(11), 5138–5148. <http://doi.org/10.1093/nar/gks160>
- Wendlandt, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Li, B., Zhang, W.-J., ... Schwarz, S. (2015). Multidrug resistance genes in staphylococci from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. *Trends in Microbiology*, *23*(1), 44–54. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.002>
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(1), 35–48. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Wilson, D. N., Schluenzen, F., Harms, J. M., Starosta, A. L., Connell, S. R., & Fucini, P. (2008). The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13339–13344. <http://doi.org/10.1073/pnas.0804276105>
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. J., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., ... Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, *407*(6802), 327–339. <http://doi.org/10.1038/35030006>
- WITTMANN, H.-G. (1976). Structure, Function and Evolution of Ribosomes. *European Journal of Biochemistry*, *61*(1), 1–13. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb09992.x>
- Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B. G., & Ofengand, J. (1995). A dual-specificity pseudouridine synthase: an Escherichia coli synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *RNA (New York, N.Y.)*, *1*(4), 437–448.
- Yarian, C. S., Basti, M. M., Cain, R. J., Ansari, G., Guenther, R. H., Sochacka, E., ... Agris, P. F. (1999). Structural and functional roles of the N1- and N3-protons of psi at tRNA's position 39. *Nucleic Acids Research*, *27*(17), 3543–3549.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883–896. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/292/5518/883.abstract>

Raamatud

Ofengand, J., Del Campo, M. 2004. Modified nucleosides in *Escherichia coli* ribosomal RNA in EcoSal—*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC. doi:10.1128/ecosal.4.6.1.

Sergiev, P. V., Golovina, A. Y., Prokhorova, I. V., Sergeeva, O. V., Osterman, I. A., Nesterchuk, M. V., Burakovsky, D. E., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A. 2011. Modifications of ribosomal RNA: From enzyme to function In M. V. Rodnina, W. Wintermeyer and R. Green (ed.), *Ribosomes*, Springer, Austria, Wien.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and T. Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

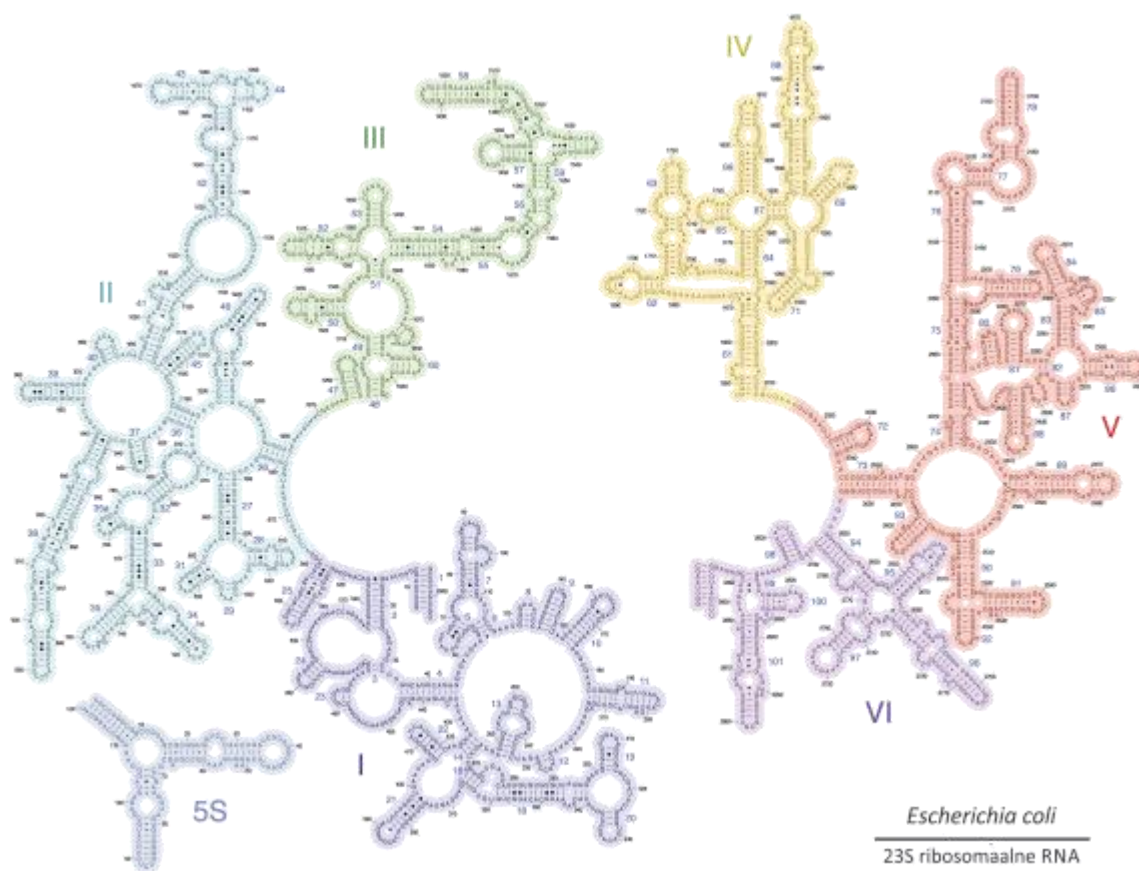
Ero, R. 2012. Modifier view of the bacterial ribosome. p. 11. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.

Bakalaureusetöö

Truu, T. *Escherichia coli* 23S rRNA domeeni V domeenide tähtsusest. 2014. Tartu Ülikool.

LISAD

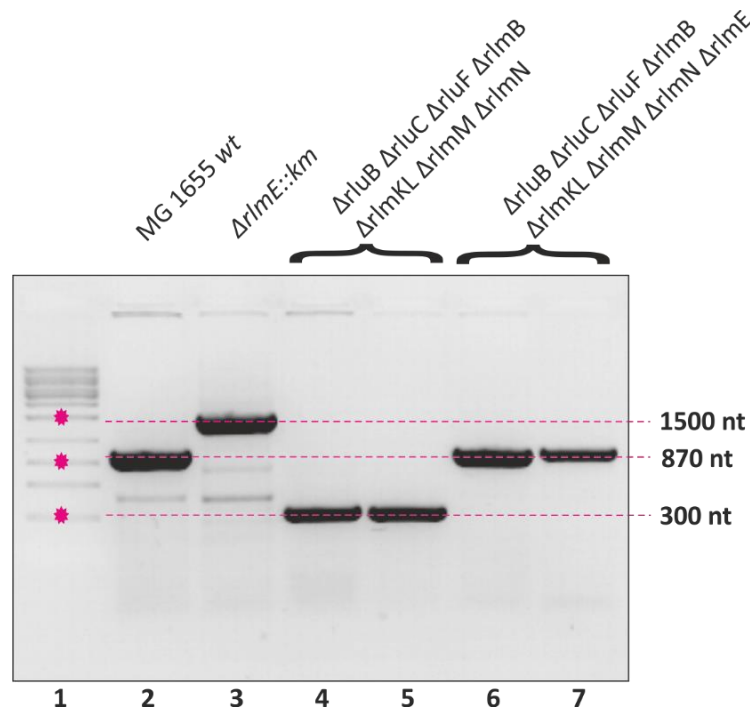
LISA 1



Joonis 18. *E. coli* fülogeneesi järgi tuletatud 23S rRNA sekundaarstruktuur (Noller *et al.*, 1981). Erinevate värvidega on kujutatud domeenid I, II, III, IV, V, VI ja 5S rRNA. Joonis kohandatud (Petrov *et al.*, 2013).

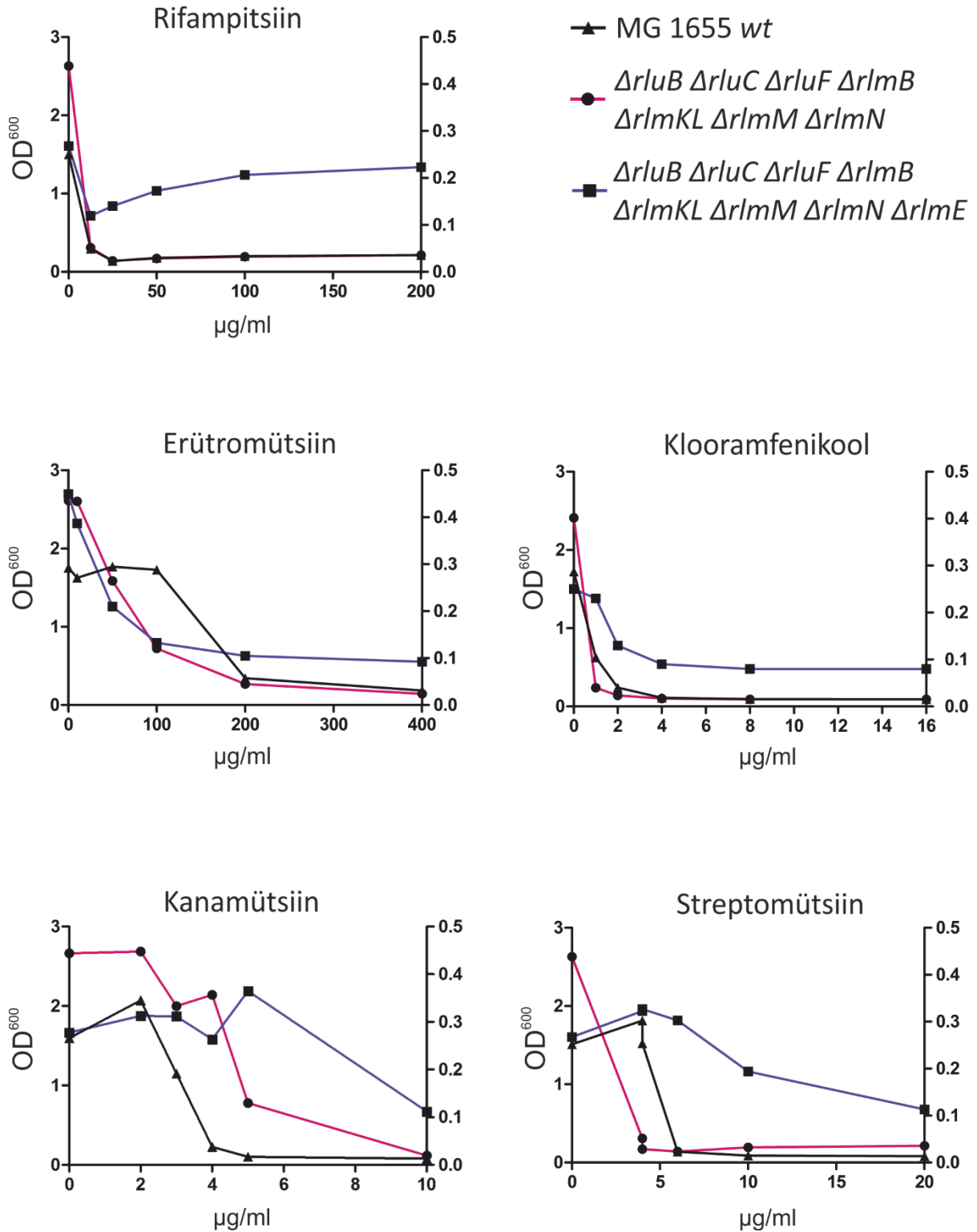
LISA 2

Konstrueeritud tüve valideerimine. Näide PCR reaktsioonil tekkinud fragmentidest.



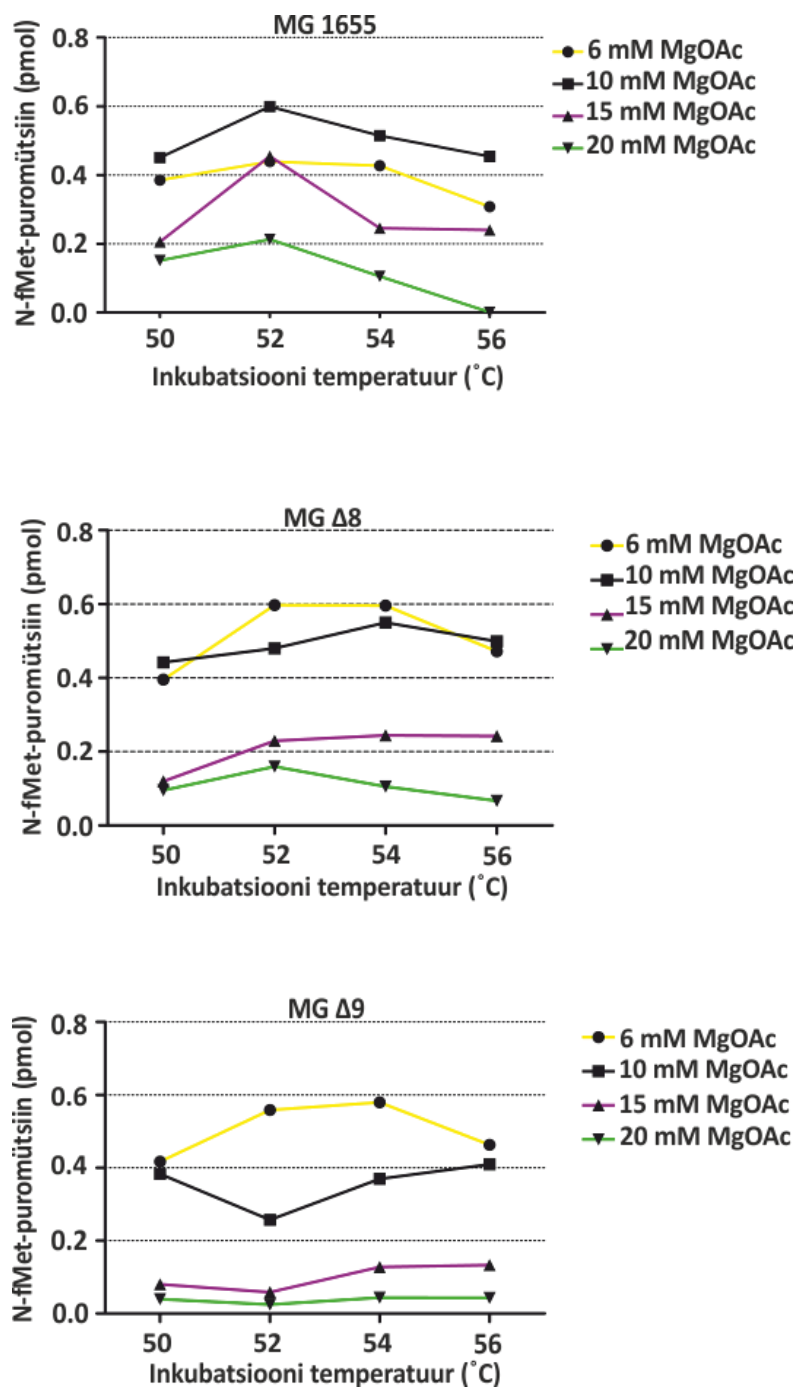
Joonis 19. Konstrueeritud tüvede MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmE \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$) ja MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN$) valideerimine. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (1 kb DNA Ladder), mille rajal 1 on ülevalt alla märgitud fuksiaroosa tärniga DNA fragmendid pikkustega 1500 nt, 700 nt ja 300 nt. Radadel 2-7 on PCR reaktsiooni läbiviimiseks kasutatud *rlmE* primereid. Kontrolltüvedena on kasutatud vastavalt radadel 2 ja 3 *E. coli* MG 1655 *wt*, mis sisaldab *wt rlmE* geeni (870 nt), ning JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$), mis sisaldab *rlmE* geeni asemel Km^R -kasseti (1500 nt). Radadel 4 ja 5 on kontrollitud *E. coli* tüve MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$) kaks erinevat kolooniat, mis ei sisalda *rlmE* geeni (300 nt). Radadel 6 ja 7 on kontrollitud *E. coli* tüve MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN$) kaks erinevat kolooniat, mis sisaldavad *rlmE* geeni 870 nt).

LISA 3



Joonis 20. Bakterikultuuride inhibitsioonikõverad. *wild type* tüve ja MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN$) ning MG1655 ($\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmE \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rlmE$) tüvede kasvu inhibitsioon valgusünteesi inhibiitoritega. Üleöökuultuurid lahjendati optilise tiheduseni $OD_{600}=0.02$. Antibiootikumid lisati vastavalt x-teljel näidatud kontsentratsioonidele. Kultuure inkubeeriti 15h ning mõõdeti OD_{600} .

LISA 4



Joonis 21. PTC reaktsiooni sõltuvused inkubatsioonitemperatuuridest. X-teljel on inkubatsiooni temperatuurid, y-teljel fMet-puromütsiini produkti kontsentratsioonid (pmol). Välja on toodud MG1655, MG Δ8 ja MG Δ9 PTC aktiivsused erinevatel temperatuuridel 50, 52, 54 ja 56°C.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Triin Truu**,
(sünnikuupäev: 11.10.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„23S rRNA modifikatsioonide roll valgusünteesis“,
mille juhendaja on Margus Leppik PhD,
 - 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, 27.05.2016