

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

23S rRNA domeeni V modifikatsioonide tähtsus valgusünteesis

Magistritöö

Geenitehnoloogia eriala

30 EAP

Birgit Marjak

Juhendaja PhD Margus Leppik

TARTU 2017

INFOLEHT

23S rRNA domeeni V modifikatsioonide tähtsus valgusünteesis

Lühikokkuvõte: Ribosoomi funktsiooniks on valkude süntees aminohapetest. *Escherichia coli* ribosoom koosneb kahest subühikust - 30S ja 50S. Suure (50S) subühiku 23S rRNA domeenist V moodustub PTC, mis katalüüsib peptiidsideme teket sünteesitava peptiidahela ja aminohappe vahele. Enamus 23S rRNA-s asuvatest modifikatsioonidest on koondunud PTC-sse ning arvatakse, et nad on vajalikud ribosoomi peenhääletamiseks. Eraldiseisvalt pole ükski modifikatsioon eluks hädavajalik. Käesolevas töös iseloomustatakse 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise efekti valgu biosünteesile. Kõigi 11 modifikatsiooni kaotamine põhjustab suurenenud inaktiivsete 50S ja 30S subühikute hulga rakus ning väga madala valgu biosünteesi taseme. Võib spekuloida, et modifikatsioonid PTC-s on vajalikud nii subühikute assotsiatsiooniks kui ka 50S subühiku peptidüültransferaaseks aktiivsuseks.

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: ribosoom, valgusüntees, PTC, rRNA modifikatsioonid

23S rRNA domain V modified nucleotides importance in protein synthesis

Abstract: Ribosomes are the sites in a cell in which protein synthesis takes place. Prokaryotes have 70S ribosomes, each consisting of a small (30S) and a large (50S) subunit. Peptide bond is formed on the large subunit within the peptidyl transferase center (PTC), which is entirely made of 23S rRNA domain V. Most of the modifications in 23S rRNA are clustered in PTC and are thought to participate in the fine-tuning of the ribosome. So far no modification has been found to be essential for cells life. In present masters thesis I describe the effect of deleting all modification enzymes from *E.coli* genome that account for the modifications in 23S rRNA domain V on protein biosynthesis. Deletion of all 11 modifications from PTC causes an increase in the amount of inactive 50S and 30S subunits and also very low protein synthesis level. It can be speculated that modifications in PTC are necessary for 50S subunits peptidyl transferase activity and efficient subunits association into functional 70S ribosome.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: ribosome, protein synthesis, PTC, rRNA modifications

Sisukord

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Prokarüootse ribosoomi struktuur.....	7
1.2. Translatsioon.....	9
1.3. Ribosoomi peptidüültransferaasne tsester	12
1.4. Ribosomaalne RNA	13
1.4.1. Ribosomaalse RNA (rRNA) struktuur ja süntees.....	13
1.4.2. 23S rRNA domeenid	16
1.5. rRNA modifikatsioonid	19
1.5.1. Pseudouridiin (Ψ)	19
1.5.2. Metülatsioon	20
1.6. 23S rRNA domeeni V modifikatsioonientsüümid	21
1.6.1. Metüültransferaasid	21
1.6.2. Pseudouridiini süntaasid	22
2. Eksperimentaalne töö	24
2.1. Töö eesmärk.....	24
2.2. Materjal	25
2.2.1. Kasutatud bakteritüved, praimerid ja plasmiidid:.....	25
2.2.2. Kasutatud söötmed ja puhvrid:	27
2.3. Metoodika	28
2.3.1. <i>E.coli</i> tüvede konstrueerimine	28

2.3.2. Tüvede generatsioonaja määramine	31
2.3.3. Rakkude lüüsimine ja ribosoomide fraktsioneerimine	31
2.3.4. Ribosomaalse RNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC-ga.....	32
2.3.5. Praimerekstentsioon	33
2.3.6. Totaalse rRNA ja valgusüntees <i>in vivo</i>	33
2.3.7. Peptidüültransferaasse aktiivsuse määramine <i>in vitro</i>	34
2.4. Tulemused.....	35
2.4.1. Bakteritüvede konstrueerimine ja kontrollimine	35
2.4.3. Bakteritüvede kasvukõverad ja generatsiooniajad	37
2.4.4. Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendis	39
2.4.5. Totaalne valgusüntees <i>in vivo</i>	41
2.4.6. Peptidüültransferaasne (PT) aktiivsus <i>in vitro</i>	43
2.5. Arutelu	47
Kokkuvõte	51
Summary.....	52
Tänuõnad.....	53
5. Kirjanduse loetelu.....	54
6. Lisad	60
Lihtlitsents lõputöö avaldamiseks	64

Kasutatud lühendid

aa-tRNA - aminoatsüül-tRNA

Amp - ampitsilliin

A-sait - aminoatsüül-tRNA sait

bp - *basepair* (ing.kl aluspaar)

D - dihydrouridiin

E.coli - *Eschericia coli* ehk soolekepike

E-sait - *exit*-sait

H³U - triitiumuridiin

ho⁵C - 5-hüdoksüütidiin

HPLC - kõrgsurvevedelikkromatograafia (ing.kl. *high-pressure liquid chromatography*)

Km - kanamütsiin

LLP - lüüsilahjendus puhver

LP - lüüsipuhver

P-sait - peptidüül-tRNA sait

PT - peptidüültransferaas

PTC - peptidüültransferaasne tsenter

S - Svedbergi ühik, sedimentatsioonikoefitsient

SAM - S-adenosüülmetioniin

SD - Shine-Dalgarno järjestus valgusünteesi initsieerimiseks

SRL - sartsiin-ritsiin ling

TCA – trikloor äädikhape

U - unit (*ing.kl.* ühik)

Ψ – pseudouridiin

Sissejuhatus

Ribosoom on kõigi elusrakkude tsütoplasmas esinev ribonukleiinhappest (RNA) ja ribosomaalsetest valkudest koosnev kompleks, mille funktsiooniks rakus on valkude süntees aminohapetest. Ribosoom koosneb kahest subühikust. *Escherichia coli* väike (30S) subühik vastutab mRNA dekodeerimise eest ning suur (50S) subühik katalüüsib peptiidsideme teket. Väike subühik koosneb 16S ribosomaalsest RNA-st (rRNA) ning 21 ribosomaalsest valgust. Suur subühik koosneb 5S ja 23S rRNA-st ning 33 ribosomaalsest valgust.

rRNA-d on kõrgelt struktureeritud ja modifitseeritud molekulid. *E.coli* 70S ribosoomis on 36 modifitseeritud nukleotiidi, mis asuvad peamiselt funktsionaalselt tähtsates regioonides – peptidüültransferaases tsentris (PTC) ja dekodeerivas tsentris. PTC vastutab peptiidsideme katalüüsi eest kasvava peptiidahela ja aminohappe vahele. Ribosoomi 23S rRNA jaotatakse sekundaarstruktuuri alusel seitsmeks domeeniks. Domeenist V moodustub PTC. PTC-s asuvad enamuse 23S rRNA modifikatsioonidest ning spekulatsioonid, et need modifikatsioonid on vajalikud valgusünteesi peenhäälestamiseks. Varasemalt on näidatud, et eraldiseisvalt pole ükski modifikatsioon eluks hädavajalik. Kõikidest seni uuritud modifikatsiooniensüümidest omab kõige suuremat fenotüübilist efekti RlmE deletsioon ja vastava ensüümi sünteesitava modifikatsiooni Um2552 puudumine.

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade ribosoomi struktuurist ja funktsioonist, 23S rRNA-s asuvatest modifikatsioonidest ning modifikatsiooniensüümidest. Eksperimentaalses osas iseloomustatakse 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise mõju valgu biosünteesile.

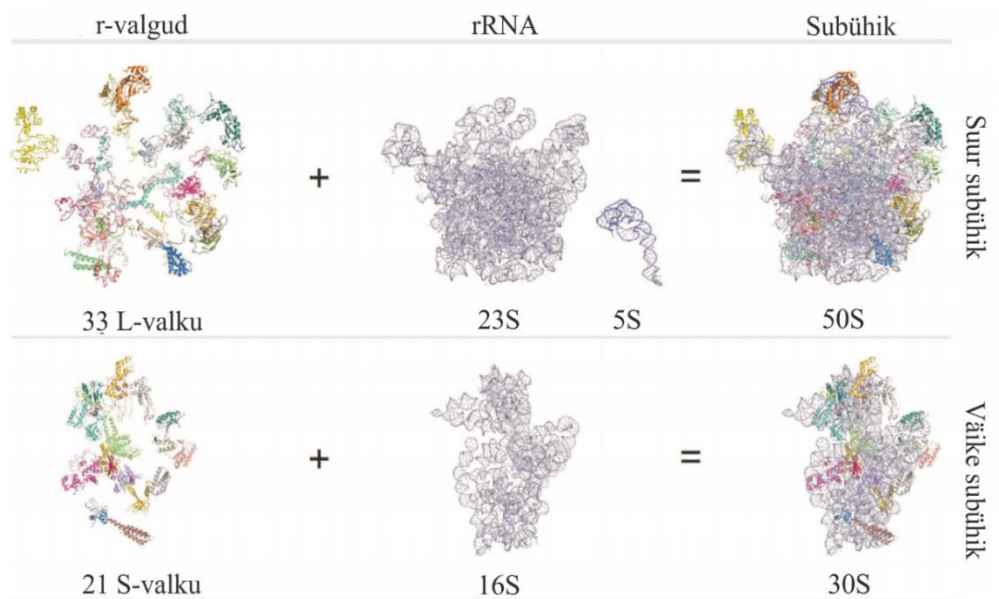
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Prokarüootse ribosoomi struktuur

Ribosoom on ribonukleoproteiin kompleks, mis vastutab rakus valkude biosünteesi ehk translatsiooni eest. Kogu katalüütilise funktsiooni eest vastutab ribosomaalne RNA (rRNA), seega on ribosoomi näol tegu ribosüümiga (Yusupov *et al.* 2001). Prokarüootses rakus koosneb ribosoom kahest subühikust: väiksemast 30S subühikust, mis vastutab mRNA dekodeerimise eest, ning suuremast 50S subühikust, mis katalüüsib peptiidsideme teket (Joonis 1) (VanLoock *et al.* 2000). Suur ja väike subühik ühinevad translatsiooni alustades funktsionaalseks 70S ribosoomiks.

E.coli-s moodustab ligikaudu $\frac{2}{3}$ ribosoomist ribosomaalne RNA: väikeses subühikus 16S rRNA, mis koosneb 1542 nukleotiidist, ning suures subühikus 23S rRNA ja 5S rRNA, mis koosnevad vastavalt 2904 ja 120 nukleotiidist (Wittmann 1976; Dunkle & Cate 2012). $\frac{1}{3}$ *E.coli* ribosoomist moodustavad ribosomaalsed valkud (r-valgud), mida on väikeses subühikus 21 (S-valgud, nimetustega S1-S21) ning suures subühikus 33 (L-valgud, nimetustega L1-L36) (Joonis 1) (Melnikov *et al.* 2012).

E.coli-s on 30S ja 50S subühikud ühendatud funktsionaalseks 70S ribosoomiks 12 subühikutevahelise silla abil, millest 6 on RNA-RNA interaktsiooniga sillad, 5 RNA-valk sillad ning 1 valk-valk interaktsiooniga sild (Yusupov *et al.* 2001). Bakterirakus on 70S ribosoomi tekkimisel olulised erinevad valgulised faktorid, kuid *in vitro* on subühikud võimelised ühinema ka ilma faktoriteta (Liu & Fredrick 2016).



Joonis 1. Bakteri ribosoomi komponendid. Ribosomaalsed valgud (erivärviliselt) ja rRNA-d (hallilt) on kujutatud eraldi suure subühiku ja väikese subühiku kontekstis. Suur ehk 50S subühik koosneb 33-st ribosomaalsest L-valgust („L“, ing.kl. *large*) ja 23S ning 5S ribosomaalsest RNA-st. Väike ehk 30S subühik koosneb 21-st ribosomaalsest S-valgust („S“, ing.kl. *small*) ning 16S ribosomaalsest RNA-st. Joonis kohandatud Rya Ero doktoritööst (Ero 2012).

Peale ribosomaalse RNA sisaldavad rakud veel kaht valgusünteesiks olulist RNA-d. mRNA (*messenger RNA*) kannab DNA-lt kopeeritud nukleotiidsel informatsiooni ribosoomi, kus see dekodeeritakse 3 nukleotiidi ehk 1 koodon korraga tRNA (*transport tRNA*) abil valgu aminohappeliseks järjestuseks (Brimacombe & Stiege 1985). tRNA-le on seondud aminohape, mis tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni interakteerumisel lisatakse kasvava peptiidahela otsa.

Ribosoomil on 3 peamist tRNA seondumiskohta, mida nimetatakse vastavalt selle järgi millist tRNA-d nad seovad - aminoatsüül-sait (A-sait), peptidüül-sait (P-sait) ning *exit*-sait (E-sait) (VanLoock *et al.* 2000). Translatsiooni alguses seondub P-saiti initsiaator-tRNA, mille järel A-saiti seondub aminoatsüül-tRNA. tRNA-d liiguvad translatsiooni käigus ribosoomi A- või P-saidist vastavalt P- ja E-saiti. Aminoatsüüleerimata tRNA väljub E-saidist (Agirrezabala & Frank 2009). P-saiti seondub vaid initsiaator-tRNA ning A-saiti seonduvad aminohappeid kandvad aa-tRNA-d, mis valgusünteesi käigus liiguvad läbi ribosoomi suunaga A→P→E-sait.

Kõik tRNA-d on tertsiaarstruktuuris sarnase L-kujulise ehitusega. tRNA antikoodon ling aluspaardub mRNA-ga, seega osaleb dekodeerimises, ning tRNA 3' ots kannab aminohapet (Agmon *et al.* 2005). Korrektselt tRNA 3' CCA ots asetub 50S subühiku

peptidüültransferaasesse tsentrisse ja interakteerub PTC-s G2251 ja G2252 nukleotiididega (Selmer *et al.* 2006). Selline interaktsioon on oluline peptiidahela ülekande võimaldamiseks.

1.2. Translatsioon

50S subühik sisaldab endas peptidüültransferaaset tsentrit (PTC), mis katalüüsib translatsiooni käigus peptiidahela ülekannet P-saidis oleva peptidüül-tRNA küljest A-saidis asuva aminoatsüül-tRNA külge. Selle tulemusel pikeneb sünteesitav valk ühe aminohappe võrra. Väikeses (30S) subühikus on dekodeeriv tsepter, mis dekodeerib mRNA-l oleva nukleotiidses järjestuses aminohappeliseks valgus järjestuseks (Gulen *et al.* 2016).

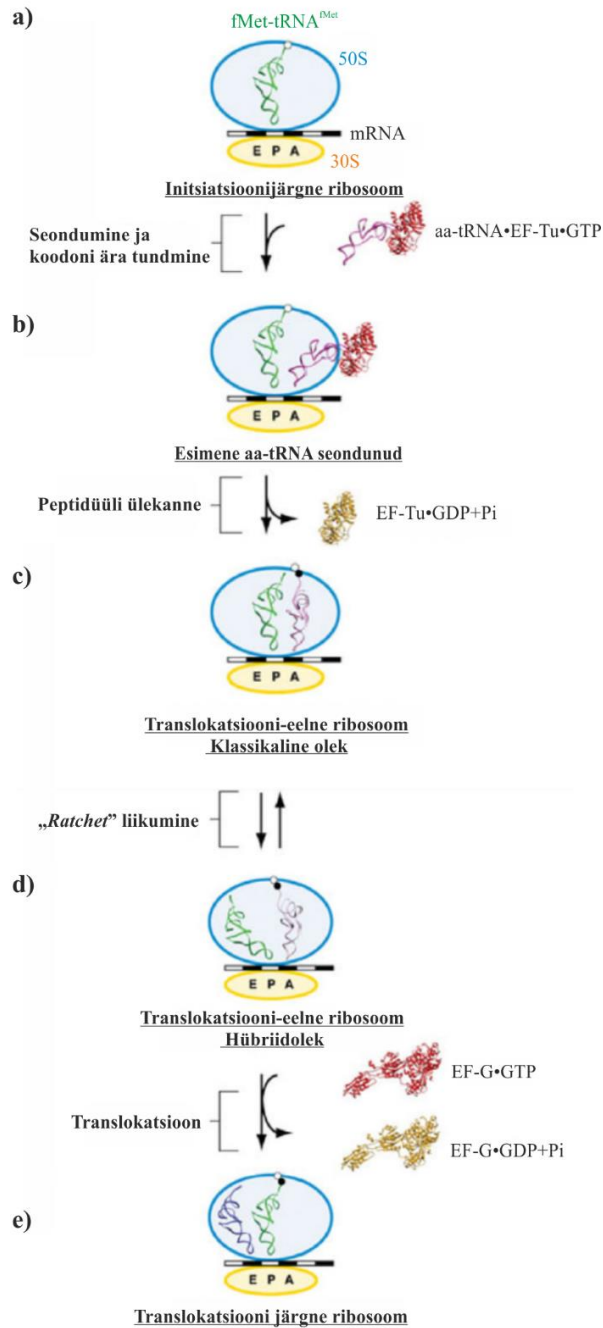
Translatsiooni initsiatsiooniks on vajalikud faktorid IF1, IF2 ja IF3. Initsiatsioonifaktor 1 (IF1) seondub 30S subühiku A-saiti ning takistab enneaegset aminoatsüül-tRNA seondumist. IF2 seondub initsiaator-tRNA-ga ning aitab selle seondada ribosoomi P-saiti. IF1 moduleerib ka initsiatsioonifaktor 2 (IF2) aktiivsust – IF2 affiinsus ribosoomi suhtes tõuseb kui IF1 on ribosoomiga seondunud (Brock *et al.* 1998). Initsiatsioonifaktor 3 (IF3) seondub 16S rRNA-le ning ei lase subühikutel enneaegselt 70S ribosoomiks ühineda (Brock *et al.* 1998).

Bakterirakus hõlmab valgusünteesi initsiatsioon endas interaktsiooni mRNA-l asuva Shine-Dalgarno (SD) järjestuse ja 16S rRNA-l asuva anti-SD vahel. Seega skanneerib 30S pre-initsiatsioonikompleks, mis koosneb 30S subühikust, kolmest initsiatsioonifaktorist ning mRNA-st, antud mRNA-d kuni leiab SD järjestuse (Ramakrishnan 2002). SD ja anti-SD interakteerumisel tuntakse ära valgusünteesi alguspunkt ning paigutatakse ribosoomi P-saiti initsiaator-tRNA fMet-tRNA^{fMet}. Seejärel eralduvad IF1 ja IF3, samas kui IF2 osaleb 50S subühiku õiges paigutumises kompleksile (Laursen *et al.* 2005). 50S subühiku seondumisel hüdrolyüsitakse IF2-l GTP, mis põhjustab IF2 konformatsiooni muutuse. Seejärel eraldub IF2 ribosoomilt, mille tulemuseks on 70S initsiatsioonikompleks.

Kui on moodustunud initsiatsioonikompleks, mis koosneb 50S-st, 30S-st, mRNA-st ja fMet-tRNA-st P-saidis (Joonis 2a), algab elongatsioonitsükkel koos esimese aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) seondumisega ribosoomi A-saiti (Joonis 2b). aa-tRNA seotakse ribosoomiga ternaarses kompleksis GTPaasiga EF-Tu ja GTP-ga. Kui on toimunud korrektne koodon-antikoodon paardumine, hüdrolyüsib EF-Tu GTP, põhjustades sellega iseenda dissotseerumise ribosoomilt. Järgnev tRNA 3'aktseptorõla suure subühiku PTC-sse paigutamine viib peptiidahela ülekandele – P-saidi tRNA-lt A-saidi tRNA-le (Joonis 2c) (Agirrezabala & Frank 2009).

Peale peptiidsideme teket asub P-saidis deatsetüleeritud tRNA ning A-saidis peptidüül-tRNA. Järgmise tRNA seondumiseks on tarvis vabastada A-sait. Vastavalt Moazed ja Nolleri translokatsiooni hübriidolekute mudelile toimub tRNA-de translokatsioon kahes etapis (Moazed & Noller 1989). Esimeses etapis liiguvad tRNA-de aktseptorotsad suure subühiku suhtes A- ja P-saidist vastavalt P- ja E-saiti, kuid tRNA-de antikoodon-otsad jäävad väikese subühiku A- ja P-saidiga esialgu endiselt seotuks. Sellist liikumist nimetatakse ribosoomi 30S subühiku „*ratchet*“ liikumiseks 50S subühiku suhtes. Selle tulemusena on tRNA-de antikoodon struktuurid vastavalt A- ja P-saitides väikeses subühikus, kuid tRNA aktseptorotsad suures subühikus interakteeruvad vastavalt P- ja E-saitidega (Joonis 2d). Esimene etapp toimub spontaaselt kohe peale peptiidsideme teket ja peptiidahela ülekannet A-saidi tRNA-le. Sellist tRNA-de positsiooni nimetatakse hübriidolekuks. Teises etapis seondub ribosoomiga elongatsioonifaktor EF-G. Elongatsioonifaktori EF-G GTP hüdroolüüs viib lõpliku tRNA translokatsioonini (Joonis 2e).

Kõiki kolme elongatsiooni etappi (dekodeerimine, peptiidahela ülekanne, translokatsioon) korraldatakse kuni kogu mRNA järjestus on loetud ning terminatsiooni määrav stopp koodon on väikese subühiku dekodeeriva tsentri poolt ära tuntud (Agirrezabala & Frank 2009). Bakteris on terminatsiooni koodoni ära tundmiseks kaks terminatsioonifaktorit – RF1 ja RF2. Mõlemad tunnevad ära koodoni UAA, kuid RF1 tunneb lisaks ära terminatsioonikoodoni UAG ning RF2 koodoni UGA. RF1 või RF2 seondumine A-saiti stop koodoni ära tundmisel viib peptiidahela hüdroolüüsini ja vabanemiseni P-saidi tRNA küljest (Ramakrishnan 2002). Vastsünteesitud peptiidahel väljub ribosoomist tunneli kaudu, mis algab PTC-s ja läbib 50S subühiku. Tunneli seinad koosnevad enamasti rRNA-st, kuid ka ribosomaalsete valkude mitteglobulaarsetest osadest. Tunneli seintes on enamasti hüdrofiilsed laenguta rühmad, mis võimaldavad kõikvõimalikele erinevatele peptiididele läbipääsu (Nissen *et al.* 2000).



Joonis 2. Translatsiooni elongatsiooni mudel. **a)** Initiatsioonijärgne ribosoom. Ribosoom on ära tundnud translatsiooni alguskoha, ribosomaalsed subühikud on ühinenud ja ribosoomi P-saidis on initiatsiaator tRNA ehk fMet-tRNA^{fMet}. **b)** Esimene aa-tRNA seondub ribosoomi A-saiti. Koodon-antikoodoni sobivuse korral viib EF-Tu GTP hüdrolüüsini, mis omakorda põhjustab EF-Tu vabanemise. **c)** Translokatsiooni-eelne ribosoom. aa-tRNA sobivuse korral järgneb tRNA akommodatsioon ja peptiidsideme ülekanne. **d)** Hübridoolek. 30S subühiku „ratchet“ liikumine viib tRNA-d A/P ja P/E hübridoolekusse, kus tRNA-de antikoodon „juuksenõel“ struktuurid on vastavalt A- ja P-saitides väikeses subühikus, kuid tRNA aktseptorotsad suures subühikus interakteeruvad vastavalt P- ja E-saitidega **e)** GTPaas EF-G katalüüsib lõpliku translokatsiooni, mis vabastab A-saidi järgneks aa-tRNA jaoks (joonis kohandatud artiklist Agirrezabala & Frank 2009).

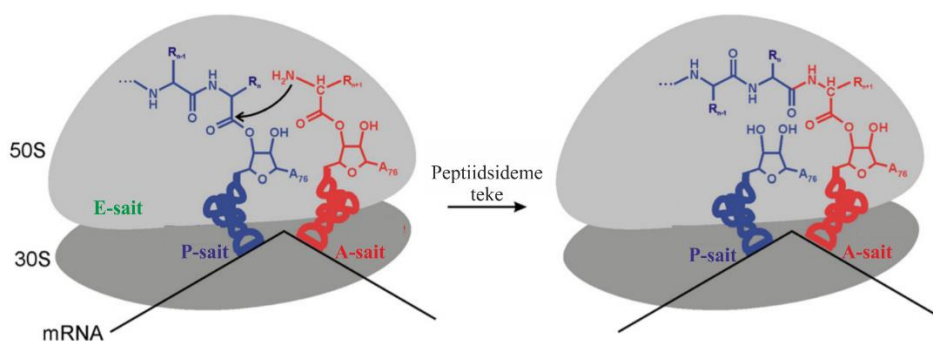
1.3. Ribosoomi peptidüültransferaasne tsenter

Ribosoomi peptidüültransferaasne tsenter (PTC) on ribosüüm, mis katalüüsib peptiidsideme sünteesi. PTC moodustub täielikult 23S rRNA domeenist V ning selle aktiivsaidis, kus nukleofiilne reaktsioon toimub, pole ~15Å raadiuses ribosomaalseid valke leitud (Noller 1991; Nissen *et al.* 2000).

Peptiidsideme tekkeks on vajalik peptidüül-tRNA ja aminoatsüül-tRNA õige paigutumine ribosoomi P- ja A-saiti. A- ja P-saidi tRNA-de 3' CCA aktseptor-otsi hoiavad õiges orientatsioonis interaktsioonid aktiivsaidi lähedal asuvate 23S rRNA nukleotiididega – tRNA nukleotiidid C74 ja C75 interakteeruvad P-saidis 23S rRNA nukleotiididega G2251 ja G2252 ning A-saidis interakteerub tRNA nukleotiid C75 23S rRNA nukleotiidiga C2553 (Nissen *et al.* 2000). Lisaks interakteerub tRNA 3' terminaalne nukleotiid A76 nii A- kui ka P-saidis vastavalt 23S rRNA nukleotiididega G2583 või A2450 (Nissen *et al.* 2000).

Peptiidahel on estersidemega seotud tRNA nukleotiidi A76 3'-O külge (Strobel & Cochrane 2007). Peptiidahela ülekanne hõlmab P-saidi tRNA ja peptiidahela vahel oleva estersideme aminolüüsi A-saidi tRNA-le kinnitunud aminohappe α -aminorühma poolt (Joonis 3). Nukleofiilne A-saidi α -aminorühm ründab P-saidi peptidüül-tRNA karbonüülsüsinikku. Reaktsiooni tulemusel kandub P-saidi peptiidahel A-saidi aminoatsüül-tRNA külge ning peptiidahel pikeneb ühe aminohappe võrra (Beringer & Rodnina 2007).

Erlacher *et al.* mudeli järgi on 23S rRNA domeeni V nukleotiidi A2451 2'-OH vajalik PTC katalüütilise reaktsiooni läbiviimiseks (Erlacher *et al.* 2006). Teised aktiivsaidis asuvad konserveerunud nukleotiidid nagu A2602, U2586 või U2506 ei ole kriitiliselt vajalikud peptidüültrasferaasse reaktsiooni toimumiseks. Lisaks on näidatud, et aminorühmaga võivad vesiniksidemeid anda ning seega aminorühma reaktiivsust tõsta ka P-saiti seondunud tRNA nukleotiid A76 ning 23S rRNA nukleotiidi A2451 lämmastikaluse N3 (Moore & Steitz 2003). Täpset mehhanismi ja positsiooni, mis reaktsiooni läbi aitavad viia, pole senini teada.



Joonis 3. Peptidüültransferaasne reaktsioon. Nukleofiilne A-saidi α -aminorühm (punaselt) atakeerib P-saidi peptidüül-tRNA (siniselt) karbonüülsüsinikku. Reaktsiooni tulemusel kandub P-saidi peptiidahel A-saidi aminoatsüül-tRNA külge ning peptiidahel pikeneb ühe aminohappe võrra. Roheliselt märgitud E-sait, tumehallilt 30S subühik, helehallilt 50S subühik ning musta joonena dekodeeritav mRNA (Beringer & Rodnina 2007).

1.4. Ribosomaalne RNA

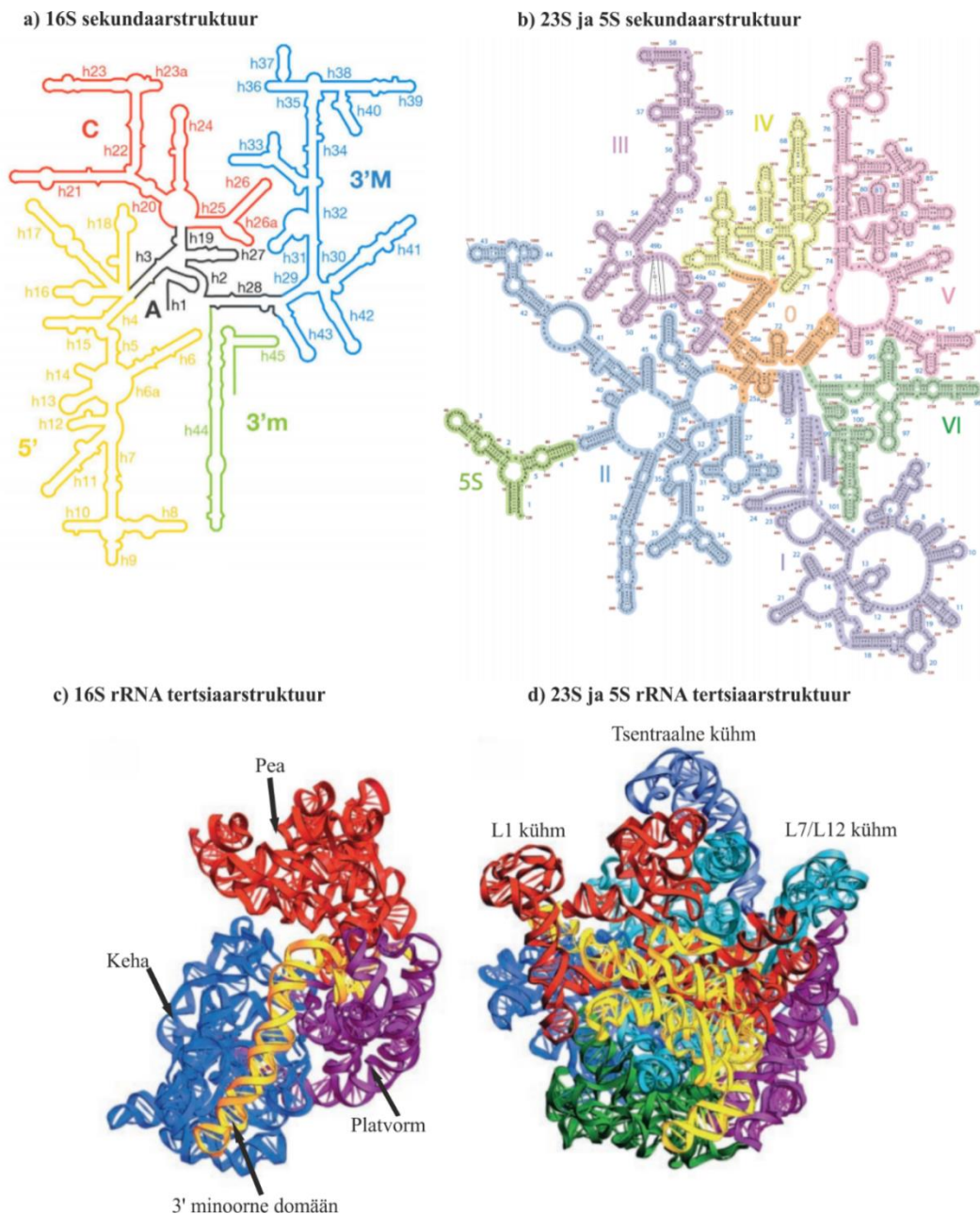
1.4.1. Ribosomaalse RNA (rRNA) struktuur ja süntees

rRNA-d on kõrgelt struktureeritud ja modifitseeritud molekulid. Ribosomaalse RNA sekundaarstruktuur koosneb lühikestest heeliksisarnastest elementidest, mis on ühendatud üheaheelaliste silmustega – „juuksenõel“ struktuuridega. Algselt arvati, et ribosomaalsed valgud vastutavad ribosoomi funktsionaalsuse eest ning rRNA-d on vaid „tellingud“, mis r-valgud õigesti paigutavad. Koos avastusega, et 16S rRNA 3' otsas asuv mRNA start koodonist 5' suunas asuva alaga komplementaarne ala on vajalik translatsiooni initsiatsiooniks (Shine & Dalgarno 1974), hakati uurima ribosomaalse RNA võimalikku katalüütilist funktsiooni.

16S rRNA jaotatakse sekundaarstruktuuri alusel viieks domeeniks: 5' domeen, tsentraalne (C), 3' mažoorne (3'M), 3' minoorne (3'm) ning neid kõiki perifeerseid domeene ühendavaks A domeeniks (Joonis 4a) (Gulen *et al.* 2016). 16S rRNA iga sekundaarstruktuuri domeen, v.a. 3' minoorne domeen, moodustab ribosoomi tertsiaarstruktuuris morfoloogilise elemendi: pea (16S rRNA 3' mažoorne domeen), keha (5' domeen), platvorm (tsentraalne domeen) (Joonis 3c) (Wimberly *et al.* 2000; Stagg *et al.* 2003). 16S rRNA 3' otsas asub anti Shine-Dalgarno (anti-SD) järjestus (5')A-C-C-U-C-C(3'), kus toimub 16S rRNA interaktsioon mRNA translatsiooni initsiatsiooni alguspunktist (AUG) 5' suunas asuva SD järjestusega (5')G-G-A-G-G-U(3') (Shine & Dalgarno 1974).

23S rRNA jaotatakse sekundaarstruktuuri alusel seitsmeks domeeniks: I, II, III, IV, V, VI ning neid kõiki ühendavaks tsentraalseks 0 domeeniks (Joonis 4b) (Petrov *et al.* 2013). Kontrastiks

30S subühikule on suure subühiku (23S rRNA) ribosoomi tertsiaarstruktuuris omavahel tihedalt interakteerunud. 23S rRNA moodustab tertsiaarstruktuuris ühe suure gloobuli, millel on kolm kühmu – L1 kühm, tsentraalne ja L7/L12 kühm (Joonis 4d) (Yusupov *et al.* 2001). Erinevalt väikese subühiku struktuursetest elementidest on suure subühiku elemendid võrdlemisi liikumatud. Vaid nimetatud kühmud liiguvad 3Å ulatuses (Gao *et al.* 2003). 5S rRNA-d võib tinglikult pidada ribosoomi suure subühiku kaheksandaks domeeniks, kuna see on funktsionaalse 50S subühiku oluline komponent ja moodustab 50S tertsiaarstruktuuris suure osa subühiku tsentraalsest kühmust. 5S rRNA interakteerub 23S rRNA domeenidega II ja V ning osaleb peptidüültransferaasse tsentri korrektse voltumises 50S subühiku assambleerimise käigus (Khaitovich & Mankin 1999).



Joonis 4. 16S, 23S ja 5S rRNA sekundaarstruktuurid (a & b) ja tertsiaarstruktuurid (c & d). a) 16S rRNA 5' domeen märgitud kollaselt, tsentraalne (C) punaselt, 3' mažoorne (3'M) siniselt, 3' minoorne (3'm) roheliselt ning domeene ühendav A domeen märgitud mustalt (Gulen *et al.* 2016). **b)** 23S ja 5S rRNA sekundaarstruktuurid. Joonisel on märgitud domeenid I (lilla), II (sinine), III (tumeroosa), IV (kollane), V (helerooa), VI (tumeroheline) ja 5S rRNA (heleroheline) ja tsentraalne domeen 0 (oranž) (Petrov *et al.* 2013). **c)** 16S rRNA tertsiaarstruktuur. Joonisel märgitud 3' mažoorsest domeenist tekkiv pea punaselt, 5' domeenist tekkiv keha siniselt, tsentraalsest domeenist tekkiv platvorm lillalt ning 3' minoorne domeen kollaselt. **d)** 23S ja 5S rRNA tertsiaarstruktuur. Domeen I on kujutatud siniselt, domeen II ja 5S rRNA sinakasroheliselt, domeen III roheliselt, domeen IV kollaselt, domeen V punaselt, domeen VI lillalt (Yusupov *et al.* 2001).

Bakterirakk optimiseerib oma kasvukiirust vastusena keskkonnatingimustest. Kasvukiirus on suuresti mõjutatud ribosoomide arvust rakus, mis eksponentsiaalselt kasvavas rakus on ligikaudu 70 000 ning aeglaselt kasvavas rakus vähem kui 20 000 ribosoomi raku kohta (Maeda *et al.* 2015). *E.coli* genoom sisaldab 7 ribosomaalse RNA operoni. Operoni alguses on kaks promootorit (P1 ja P2), millest P1 võimaldab ribosomaalset RNA-d kodeeriva DNA kiire sünteesi eksponentsiaalses faasis ning P2 vastutab sünteesi eest statsionaarses faasis (Maeda *et al.* 2015). Kõik 7 *E.coli* rRNA operoni sisaldavad kolme rRNA geeni (16S, 23S ja 5S rRNA) ning vähemalt üht tRNA geeni (Paul *et al.* 2004). *E.coli*-s sünteesitakse kõik 3 rRNA-d ühe primaarse transkriptina, mille küpsemine hakkab juba enne kui kogu transkripti sünteesimine on lõpetatud ning RNA sekundaarstruktuur tekib kohe kui vastav RNA osa on transkribeeritud (Williamson 2003). Selleks, et tekiks kaks subühikut peab sünteesitud rRNA transkript läbima mitmeid posttranskriptsioonilisi sündmusi nagu primaarsest transkriptist erinevate RNA-de lõikamine ning nende RNA-de 5' ja 3' otste lõikamine, nukleotiidide modifitseerimine ja korrektne voltumine.

Ribosomaalse RNA modifitseeritud nukleotiidid sünteesitakse modifikatsiooniensüümide poolt. Modifikatsioonid ei teki ribosoomi biogeneesi käigus üheaegselt, vaid neid sünteesitakse erinevates ribosoomi küpsemise etappides. Tuginedes sellele, millises ribosoomi assambleerumise etapis vastavad modifikatsioonid sünteesitakse, saab tinglikult modifikatsioonid jagada varasteks, keskmisteks ja hilisteks. Varajaste puhul tunneb modifikatsiooniensüüm ära vastasünteesitud RNA ning hiliste puhul peaaegu täielikult assambleeritud subühiku – ehk ühel juhul tunneb ensüüm ära primaarjärjestuse, teisel juhul ruumilise struktuuri (Siibak & Remme 2010).

1.4.2. 23S rRNA domeenid

Escherichia coli 23S ribosomaalne RNA koosneb 2904 nukleotiidist, mis moodustavad sekundaarstruktuuris eristuvad 7 domeeni. Kaheksandaks domeeniks võib tinglikult pidada 5S rRNA-d. Järgnevas peatükis antakse ülevaade 23S rRNA domeenidest, keskendudes enim töö temaatikas tähtsal kohal olevale domeenile V.

Domeen 0 asub 23S rRNA sekundaarstruktuuri keskmises ja ühendab omavahel kõiki 23S rRNA domeene (Joonis 4b). Domeen 0 koosneb 23S rRNA nukleotiididest 562–586, 1251–1270, 1648–1678, 1990–2057 ja 2611–2625 (Petrov *et al.* 2013). Domeen 0 peamiseks funktsiooniks on teiste 23S rRNA domeenide ühendamine ja peptidüültransferaasse tsentri A- ning P-saidi

regiooni õiges orientatsioonis hoidmine. Lisaks moodustub 23S rRNA domeenist 0 osa peptiidahela väljutamistunnelist (Petrov *et al.* 2013).

Domeen I koosneb nukleotiididest 1–561 ja 2895–2904 (Petrov *et al.* 2013). Tertsiaarstruktuuris asub domeen I bakteriaalse suure subühiku tagaküljes, L1 kühmu all (Ban *et al.* 2000). Tertsiaarstruktuuris interakteeruvad domeeniga I ribosomaalsed valgud L4, L15e, L22, L24 ja L29. On teada, et valk L24 mängib olulist rolli ribosoomi assambleerimises – L24 ning ka L3 on teadaolevalt ainsad valgud, mis on võimelised initsieerima 50S subühiku assambleerimise (Nierhaus 1980; Klein *et al.* 2004).

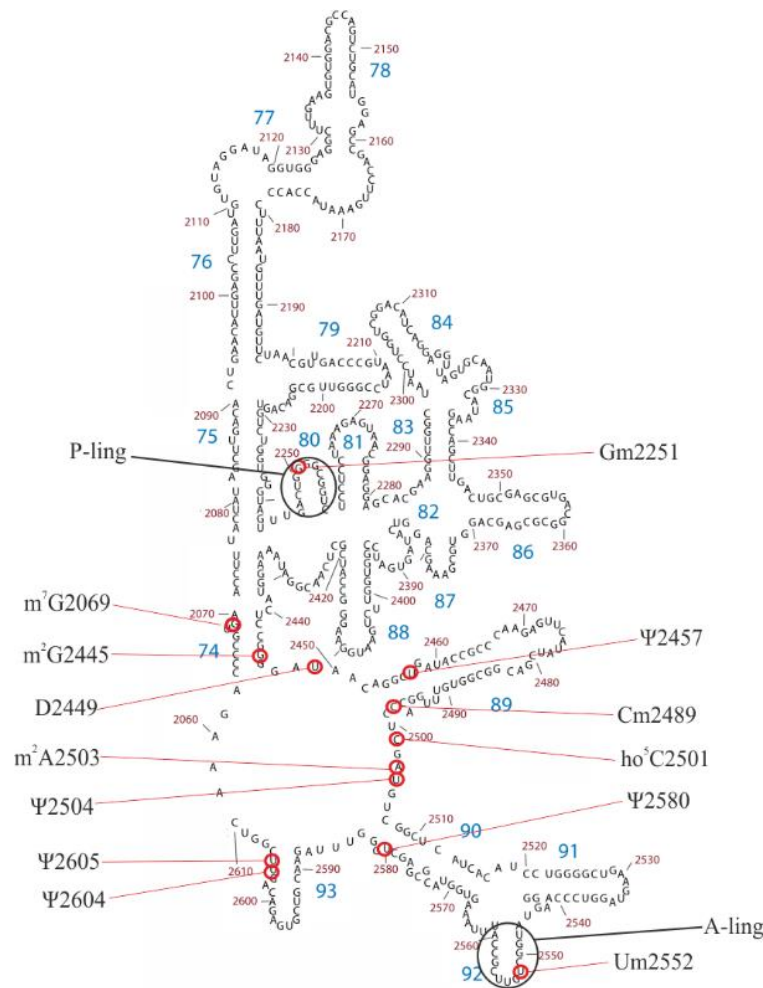
Domeen II koosneb nukleotiididest 587–1250 (Petrov *et al.* 2013). Domeen II on 23S rRNA domeenidest suurim ning moodustab tertsiaarstruktuuris 50S subühiku tagakülje. Sellel on tertsiaarstruktuuris 3 väljaulatuvat osa: üks on L7/L12 kühmu rRNA osa, mis interakteerub translatsiooni elongatsioonifaktoritega; teine on heeliks 38, mis on kõige pikem harudeta element 23S rRNA-s; kolmas osa moodustub heeliksitest 32–35 ja interakteerub otseselt väikese ribosomaalse subühikuga (Ban *et al.* 2000) ning moodustab 70S ribosoomi stabiliseeriva subühikutevahelise silla B4 (Maivali & Remme 2004).

Domeen III moodustub nukleotiididest 1271–1647 (Petrov *et al.* 2013). Tegu on kompaktsel globulaarse domeeniga, mis moodustab vaatega subühikutevahelise kontaktpinna poolt 50S subühiku tertsiaarstruktuuris (Joonis 4d) kõige alumise osa. Kõige rohkem interakteerub domeen III tertsiaarstruktuuris domeeniga II ning erinevalt kõigist teistest domeenidest ei oma ühtki interaktsiooni domeeniga V (Ban *et al.* 2000).

Domeen IV, nukleotiidid 1679–1989 (Petrov *et al.* 2013), moodustab 50S-i kokkupuute pinna 30S-iga. Selles domeenis asub heeliks 69, mis interakteerub 16S rRNA-ga moodustades subühikutevahelise silla B2a (Ban *et al.* 2000). Selles heeliksis asuvad pseudouridiinid positsioonides 1911, 1915 ja 1917, mis sünteesitakse pseudouridiini süntaasi RluD poolt. RluD poolt sünteesitavate pseudouridiinide puudumisel on rakkudel pikenenud generatsiooniaeg ja esineb subühikute assambleerimise defekt (Gutgsell *et al.* 2005).

Domeen V, nukleotiidid 2058–2610 (Petrov *et al.* 2013), moodustab ribosoomis peptidüültransferaasse tsentri. See asub tertsiaarstruktuuris domeenide II ja IV vahel ning sisaldab endas mitmeid konserveerunud modifitseeritud nukleotide. Domeeni V saab tertsiaarstruktuuris jagada kolmeks peamiseks osaks: esimene algab heeliksiga 75 ja moodustab ribosomaalsele valgule L1 seondumiskoha; teine koosneb heeliksitest 80–88 ja moodustab

tsentraalse kühmu RNA-st koosneva põhiosa; kolmas sisaldab heelikseid 89-93, küündib ettepoole domeenini VI ja aitab stabiliseerida elongatsioonifaktorite seondumiskohta ribosoomis (Ban *et al.* 2000). On näidatud, et *E.coli* domeeni V mõned nukleotiidid interakteeruvad sünteesitavate valkudega ja aitavad kaasa valkude korrektse struktuuri moodustumisele (Samanta *et al.* 2008). Domeenis V asub A-ling (Joonis 5), mis interakteerub aa-tRNA-ga A-saidis. A-ling on kõrgelt konserveerunud ning sisaldab modifikatsiooni Um2552 (Blanchard & Puglisi 2001). Lisaks asub domeenis P-ling (Joonis 5), mis seondub P-saidis oleva tRNA 3' otsas asuva CCA järjestusega. P-ling sisaldab modifikatsiooni positsioonis G2251 (Blanchard & Puglisi 2001). Domeenis V asub 25-st 23S rRNA-s asuvast modifikatsioonist 13 modifikatsiooni (Joonis 5).



Joonis 5. Domeeni V modifikatsioonid. Punaste ringidega märgitud modifikatsioonid 23S rRNA domeenis V, märgitud ka modifikatsiooni tüüp antud positsioonis. Siniste numbritega märgitud heeliksid. Lisaks märgitud A- ja P-lingud (Petrov *et al.* 2013).

Domeen VI, nukleotiidid 2626–2894, on 23S rRNA kõige väiksem domeen (Ban *et al.* 2000). Selle domeeni kõige olulisem osa on sartsiin-ritsiin ling (SRL), mis on vajalik translatsioonifaktorite seondumiseks ja faktorite GTP hüdrolüüsiks. SRL on sihtmärgiks tsütotoksiinidele α -sartsiin ja ritsiin - α -sartsiin hüdrolüüsib fosfodiesterideme nukleotiidide G2661 ja A2662 vahel ning ritsiin eemaldab puriini nukleotiidilt A2660 (Shi *et al.* 2012). Lisaks on näidatud, et SRL on oluline element 50S subühiku assambleerimises (Lancaster *et al.* 2008).

1.5. rRNA modifikatsioonid

Ribosomaalse RNA modifitseerimine on üldlevinud kõigi elus organismide seas ja modifitseeritud nukleotiidide osakaal RNA-s on seotud organismi kompleksusega (Sergiev *et al.* 2012). *Escherichia coli* 70S ribosoomis on 36 modifitseeritud nukleotiidi, mis asuvad peamiselt kahe subühiku kokkupuutepinnal tRNA seondumis-saitides, seega funktsionaalselt tähtsates regioonides – PTC-s ja dekodeerivas tsentris (Jiang *et al.* 2016).

Bakteris on kolm peamist rRNA modifikatsioonitüüpi: pseudouridiinide (Ψ) sünteesimine uridiinist (U), riboosi 2'-hüdoksüülrühma metülatsioonid ja lämmastikaluse metülatsioonid (Decatur & Fournier 2002). Lisaks on leitud ka dihydrouridiin (D), mis tekib uratsiilaluse redutseerimisel (Yu *et al.* 2011), ja 5-hüdoksütsütidiin (ho^5C), mis on tsütosiini stabiilne oksüdatsiooniprodukt (Zahn *et al.* 2011). *E.coli* 16S rRNA-s on 1 pseudouridiin ja 10 metüleeritud nukleotiidi, 23S rRNA-s on 10 pseudouridiini ja 14 metülatsiooni. 23S rRNA-s on lisaks veel 5-hüdoksütsütidiin ning dihydrouridiin (Ofengand & Del Campo 2004).

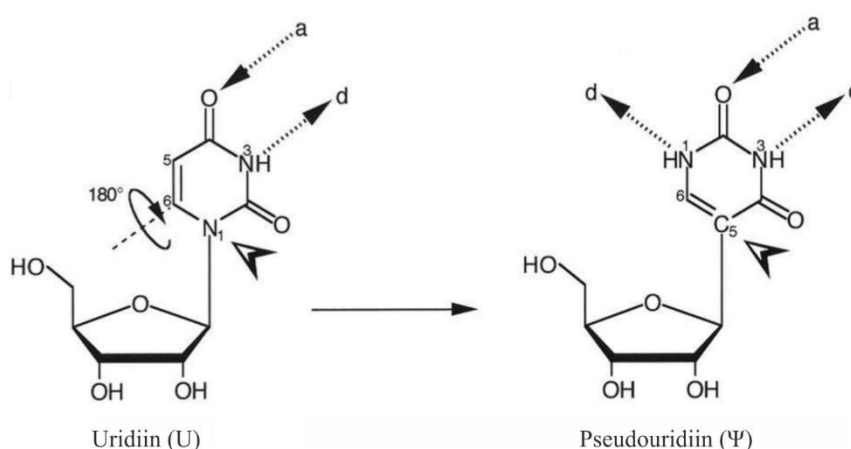
E.coli rRNA modifikatsioonidest pole ükski eraldi eluks hädavajalik, kuid on vajalikud ribosoomi funktsiooni ja struktuuri peenhäälestamiseks (Sergiev *et al.* 2012). On näidatud, et mõne teatud rRNA modifikatsioonid on seotud antibiootikumide resistentsuse või resistentsuse kadumisega (Polikanov *et al.* 2015). 23S rRNA enamus modifikatsioone on klasterdunud PTC-sse, kus arvatakse, et aitavad aminoatsüül-tRNA aminohapet kandvat aktseptor-lingu suure subühiku A-, P- või E-saiti siduda (Ofengand & Del Campo 2004; Jiang *et al.* 2016).

1.5.1. Pseudouridiin (Ψ)

Pseudouridiin ehk 5-ribosüüluratsiil on struktuursetes RNA-des (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA) kõige sagedasemalt esinev modifikatsioon. Eukarüootides on pseudouridiini leitud ka mRNA-st (Schwartz *et al.* 2014). Ψ erineb teistest nukleotiididest eelkõige selle poolest, et

omab C-C glükosiidset sidet tavapärase C-N sideme asemel aluse ja riboosi vahel. C-C side on oma loomult paidlikum kui C-N side ja arvatakse, et see lubab suuremat konformatsioonilist painduvust kui uridiin (Charette & Gray 2000).

Pseudouridiini sünteesimise käigus katkeb uridiini N1-C1' glükosiidne side, lämmastikalus keeratakse 180° üle kujutletava N3-C6 telje, mille tagajärjel uratsiili C5 positsioon moodustab sideme riboosi C1'-ga ning uratsiili N1 positsioonist tekib uus vesiniksideme doonor (Joonis 6) (Charette & Gray 2000). Ψ on võimeline andma vesiniksidemeid enda N1 positsiooni ja nii enda kui ka naabernukleotiidi suhkurfosfaatrühmadega läbi veemolekuli (Davis 1995). See võimaldab stabiliseerida rRNA tertsiaarstruktuuri.



Joonis 6. Pseudouriidiini süntees. Uratsiilaluse (vasakul) N1 positsioon (noolega märgitud) on riboosi C1' positsiooniga seotud läbi glükosiidsideme. Isomeerimise käigus keeratakse alus üle N3-C6 kujutletava telje 180° (märgitud vasakul ringikujulise noolega). Pseudouridiini puhul (paremal) on uratsiilaluse positsioon C5 (noolega tähistatud) seotud glükosiidsidemega riboosi C1'-ga. Sellega tõuseb nukleotiidi vesiniksideme andmise võime – pseudouridiinil on 2 vesiniksideme doonorit, uridiinil aga 1 (Charette & Gray 2000).

1.5.2. Metülatsioon

Ribosomaalse RNA metülatsioonide peamised rollid on näiteks rRNA valmimise moduleerimine, rRNA struktuuri stabiliseerimine ja translatsiooni kiiruse moduleerimine. On näidatud, et *E.coli* rakkudel, millest on deleteeritud 16S rRNA spetsiifiline metülaas KsgA (RsmA), on suurenenud raaminihete esinemine ning dekodeerimise täpsus vähenenud (O'Connor *et al.* 1997). Metülatsioonid suurendavad alustevahelist *stacking*-ut oma hüdrofoobsuse tõttu ning lisaks võivad tekitada RNA-s struktuurseid muutusi – näiteks blokeerides vesiniksidemeid (Helm 2006). On näidatud, et metülatsioonid võivad olla seotud ka antibiootikumi resistentusega (Long & Vester 2008; Stojkovic *et al.* 2016).

1.6. 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümid

Järgnevas peatükis antakse ülevaade teadaolevate 23S ribosomaalse RNA domeenis V asuvate modifikatsioonide sünteesivate ensüümide kohta.

1.6.1. Metüültransferaasid

E.coli 23S rRNA domeeni V metüülatsioone sünteesivad 5 metüültransferaasi: RlmKL (m^2G2445 ja m^7G2069), RlmB (Gm2251), RlmM (Cm2498), RlmN (m^2A2503), RlmE (Um2552) (Lovgren & Wikstrom 2001; Toh *et al.* 2008; Puneekar *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Arai *et al.* 2015).

E.coli metüülatsiooni reaktsioonid on katalüüsitud S-adenosüülmetsiooniin (SAM) sõltuvate metüültransferaaside poolt, seega kasutatakse metüülrühma doonorina SAM-i (Martin & McMillan 2002).

RlmKL

E.coli geen *ycbY* kodeerib dimeerset metüültransferaasi RlmKL, mis sünteesib 23S rRNA modifikatsioonid m^2G2445 ja m^7G2069 (Wang *et al.* 2012). N-terminus vastutab m^2G sünteesi eest, C-terminus m^7G metüülatsiooni eest. RlmKL ko-sedimenteerub koos varajases assambleerumise faasis oleva 50S subühikuga (Kimura *et al.* 2012). Seega võib arvata, et tegu on oluliste modifikatsioonidega, mis võtavad osa 50S biogeneesis varajases faasis. Siiski ei teki $\Delta rlmKL$ rakkudel pikenenud generatsiooniga (ka madalal temperatuuril) ega pole näha ribosoomi assambleerumise defekte (Kimura *et al.* 2012).

RlmB

Metüültransferaas RlmB sünteesib modifikatsiooni Gm2251 (Lovgren & Wikstrom 2001), mis asub 23S rRNA kõrgelt konserveerunud P-lingi piirkonnas. $\Delta rlmB$ mutandil ei erine kasvukiirus *rlmB*⁺ tüvest ning ribosoomi assambleerumise defekti pole täheldatud (Lovgren & Wikstrom 2001). RlmB-l pole seni leitud ribosoomi biogeneesis ega funktsioonis olulist rolli.

RlmM

RlmM katalüüsib 2'O metüülatsiooni 23S rRNA postisioonis 2498 (Cm2498) (Puneekar *et al.* 2012). $\Delta rlmM$ tüvi on veidi nõrgema elumusega kui metsiktüüpi tüvi. On näidatud, et RlmM on aktiivne valguvabal 23S rRNA-l, kuid mitte täielikult assambleerunud 50S subühikul või

70S ribosoomil. See viitab, et tegu on ribosoomi assambleerimise varajase etapi modifikatsiooniga (Siibak & Remme 2010; Punekar *et al.* 2012).

RlmN

E.coli 23S rRNA nukleotiidi A2503 metüleerib metüültransferaas RlmN (Toh *et al.* 2008). Modifitseeritud nukleotiid m²A asub funktsionaalselt olulises piirkonnas – vastsünteesitud peptiidahela väljutamistunneli alguses. RlmN *knockout* tüvi on nõrgema elumusega kui metsiktüüpi tüvi (Toh *et al.* 2008).

RlmE

RlmE katalüüsib uridiini 2'-O-metülatsiooni (Um2552) 23S rRNA A-lingus positsioonis 2552 (Arai *et al.* 2015). Metüültransferaas RlmE on kõrgelt konserveerunud kõigis eludomeenides ning seega võib arvata, et on tegu funktsionaalselt olulise ensüümiga. 2'-O-metülatsiooni puudumine positsioonis 2552 viib 2 korda pikenenud generatsiooniajani nii optimaalsel temperatuuril +37°C kui ka +30°C ja +42°C juures (Caldas *et al.* 2000), suurenenud stopkoodoni läbilugemiseni ja vähenenud programmeeritud +1 ja -1 raamivahetuseni (Widerak *et al.* 2005). Seega on Um2552 vajalik translatsiooni täpsuse optimeerimiseks. Lisaks viib metülatsiooni puudumine vabade 30S ja 50S subühikute akumulatsioonile ning 70S funktsionaalsete ribosoomide fraktsiooni vähenemiseni (Caldas *et al.* 2000). Küll aga on näidatud, et kahe väikese GTPaasi Ogb ja EngA üleekspressioon RlmE deletsioonitüves taastab 70S ribosoomide stabiilsuse ning ühtlasi kompenseerib deletsioonist põhjustatud kasvudefekti (Tan *et al.* 2002).

1.6.2. Pseudouridiini süntaasid

Pseudouridiini süntaasid vastutavad RNA-s kõige tihedamalt esineva posttranskriptsioonilise modifikatsiooni katalüüsimisest. Need ensüümid katalüüsivad kohtspetsiifilist uridiini isomeriseerimist ning tunnevad oma märklaud nukleotiidid ära nii järjestus- kui ka struktuurpõhiselt (Hamma & Ferre-D'Amare 2006). Lisaks on leitud, et bakterirakus ei vaja pseudouridiini süntaasid katalüüsi läbi viimiseks kofaktoreid ega energiat, kuigi on vastutavad nii sihtmärgi ära tundmise kui ka Ψ katalüüsi eest (Arluison *et al.* 1998).

RluE

Pseudouridiini süntaas RluE modifitseerib 23S rRNA nukleotiidi U2457 pseudouridiiniks (Pan *et al.* 2007). Selle modifikatsiooni deleteerimisel pole nähtud efekti raku fenotüübile (Del Campo *et al.* 2001).

RluC

Erinevalt teistest mainitud pseudouridiini süntaasidest on RluC-l 23S rRNA-s 3 sihtmärki – nendeks on U955, U2504 ja U2580 (Conrad *et al.* 1998). Conrad *et al.* näitasid oma töös, et antud ensüümi geeni deleteerimine ei mõjuta raku generatsiooniga rikkas ega ka minimaalsöötmel (Conrad *et al.* 1998).

RluB

Pseudouridiini süntaas RluB katalüüsib pseudouridiini *E.coli* 23S rRNA postitsiooni 2605 (Del Campo *et al.* 2001). Ψ2605 pole hädavajalik ning selle puudumine ei mõjuta raku generatsiooniga rikkas söötmes (Del Campo *et al.* 2001).

RluF

RluF modifitseerib pseudouridiiniks 23S rRNA uridiini positsioonis 2604 (Alian *et al.* 2009). *rluF* geeni muteerimine ja deletsioon ei mõjuta *E.coli* raku kasvu, kuigi RluF ensüümi poolt sünteesitav modifikatsioon on konserveerunud ning seega arvatavasti omab valgusünteesis olulist seniteadmata rolli (Sunita *et al.* 2006).

Eelnevalt mainitud pseudouridiini süntaas RluB modifitseerib spetsiifiliselt U2605, kuid on leitud, et RluF on võimeline vähesel määral modifitseerima ka oma primaarse sihtmärgi U2604 kõrval olevat nukleotiidi U2605 (Alian *et al.* 2009). RluB ja RluF-i näol on tegu homoloogidega ja nende domeenide struktuurid on indentsed. Czudnochowski *et al.* näitasid, et RluF seondumine sihtmärk-lingule kutsus esile RNA lingu ümberpaigutamise nii, et tekib raaminihe ja aktiivsaiti liigub U2604 (Czudnochowski *et al.* 2014). RluB puhul ei teki sellist ümberkorraldust ning aktiivsaiti jääb U2605.

2. Eksperimentaalne töö

2.1. Töö eesmärk

Kuna 23S rRNA enamus modifitseeritud nukleotiidide asuvad domeenis V, millest moodustub peptiidsidet katalüüsiv PTC, sai käesoleva magistr töö eesmärgiks välja selgitada nende modifikatsioonide puudumise mõju valgu biosünteesile. Püstitati hüpotees, et 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid on olulised ribosoomi peenhääletamiseks.

Püstitatud hüpoteesi testimiseks konstrueeriti kolm *E.coli* tüve: Δ RlmE, mille genoomist puudub modifikatsiooniensüüm RlmE ja ensüümi poolt sünteesitav modifikatsioon Um2552; Δ 8, milles puuduvad modifikatsiooniensüümid RluB, RluC, RluF, RluE, RlmB, RlmKL, RlmM, RlmN, mis kollektiivselt sünteesivad 23S rRNA domeeni V 10 modifikatsiooni; ning tüvi Δ 9, kus lisaks eelnevalt mainitule 8-le ensüümile on puudu ka modifikatsiooniensüüm RlmE. Deletsioonitüvedest eemaldatud modifikatsioonienüümid ning nende sünteesitud modifikatsioonid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Käesoleva töö raames deleteeritud *E.coli* 23S rRNA domeeni V modifikatsioone sünteesivad ensüümid koos modifitseeritava nukleotiidi positsiooniga. Δ 8 tüve puhul on genoomist puudu tabelis esitatud esimese 8 modifikatsiooniensüümi geen, Δ 9 puhul kõik nimetatud.

Modifikatsiooniensüüm	Modifikatsioon koos positsiooniga
RluB	Ψ 2605
RluC	Ψ 2504, Ψ 2580
RluF	Ψ 2604
RluE	Ψ 2457
RlmB	Gm2251
RlmKL	m ⁷ G2069, m ² G2445
RlmM	Cm2498
RlmN	m ² A2503
RlmE	Um2552

2.2. Materjal

2.2.1. Kasutatud bakteritüved, praimerid ja plasmiidid:

Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüved

Tüvi	Genotüüp	Allikas
MG1655	F-, λ - <i>ilvG</i> -, <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
JW3146-2	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ -, <i>ArrmJ786::kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(Baba <i>et al.</i> 2006)
MG1655 Δ 7 (<i>ArluB</i> <i>ArluC</i> <i>ArluF</i> <i>ArlmB</i> <i>ArlmKL</i> <i>ArlmM</i> <i>ArlmN</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1, <i>ArluB</i> 777, <i>ArluC</i> 753, <i>ArluF</i> 789, <i>ArlmB</i> 730, <i>ArlmL</i> 764, Δ <i>ygdE</i> 733, Δ <i>yfgB</i> 763	(Truu 2016)
<i>E.coli</i> DH5 α <i>pir</i>	F- <i>endA</i> 1 <i>hsdR</i> 17 (<i>rm</i> +) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>nupG</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> AM15 <i>pir</i>	(Martinez-Garcia & de Lorenzo 2011)
Δ 8	F-, λ - <i>ilvG</i> -, <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1, <i>ArluB</i> 777, <i>ArluC</i> 753, <i>ArluF</i> 789, <i>ArlmB</i> 730, <i>ArlmL</i> 764, Δ <i>ygdE</i> 733, Δ <i>yfgB</i> 763, <i>ArluE</i> 723	Käesolev töö
Δ 9	F-, λ - <i>ilvG</i> -, <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1, <i>ArluB</i> 777, <i>ArluC</i> 753, <i>ArluF</i> 789, <i>ArlmB</i> 730, <i>ArlmL</i> 764, Δ <i>ygdE</i> 733, Δ <i>yfgB</i> 763, <i>ArluE</i> 723, <i>ArrmJ786</i>	Käesolev töö
Δ RlmE	F-, λ - <i>ilvG</i> -, <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1, <i>ArrmJ786::kan</i>	Käesolev töö

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid

Praimer	5'-3' järjestus
RluB dir	GAGTCGTTTACT
RluB rev	GAAGTGGCACAT
RluC dir	GGATGGACACGGAAACGGC
RluC rev	CGCTAATCGCGCTGTGTCAG
RluE dir	GTTTGCGTCCTGCGATACGG
RluE rev	GGTTTCATCGGCTTCCAGATG
RluF dir	GCACATTGCTTCTGGAAAGTG
RluF rev	CAATCAACGCCTGAGATTTTC
RlmB dir	CCCTCTTTAAAA
RlmB rev	TCATATATTATT
RlmE dir	GCTTGAGCGGATGTGCCAGAC
RlmE rev	GCACAACGGCAATGACCAGC
RlmKL dir	GTTTGGCCCTGGGTTATGCTCG
RlmKL rev	GCCGTTGCGGCCACACAGAC
RlmM dir	CTTTATTGCCTGGCGCTGTCC
RlmM rev	GGAAGCCCGCATCGGGCATC
RlmN dir	CAAACGTGGCATCCGTGCGCC
RlmN rev	TTGCATCGTTACATACTGCC
pEMG dir	GTAAAACGACGGCCAGT
pEMG rev	AACAGCTATGACCATG
P1f	AGGGATCCCCGCCACCAACCGGAGTGG
P1r	CTTCTCGCCGCATTATAGCCTAATAACGCG
P2f	GGCGAGAAGTGACAGATTAAGG
P2r	TGTCTAGACAAGGCGGCGTATTCTATC
C6	CTTGGGCGGTATCAGCCTG

Tabel 4. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
pSW (I-SceI)	I-SceI restriktiooni ekspresseeriv <i>helper</i> plasmiid, Amp resistentsus	(Martinez-Garcia & de Lorenzo 2011)
pEMG (pJP5603ISceIv2)	<i>lacZα</i> geeni, multikloneerimis-saiti ja I-SceI restriksioonisaite sisaldav Km resistentne suitsiidplasmiid	(Martinez-Garcia & de Lorenzo 2011)
pBAD	pBADMycHisC, Amp ^R	Invitrogen
pEMG-ΔRluE	pEMG (pJP5603ISceIv2) plasmidi I-SceI lõikesaitide vahele kloneeritud <i>rluE</i> geeni flankeerivad alad	Käesolev töö

2.2.2. Kasutatud söötmed ja puhvrid:

Tabel 5. Töös kasutatud söötmed

Sööde	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	1,6% trüptoon; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl	(Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989)
Luria-Bertani (LB) agarsööde	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl; 1,5% agar	(Bertani 1951)
Isotoop-märgimise sööde	1% trüptoon; 0,1% pärmiekstrakt; 1% NaCl	(Siibak <i>et al.</i> 2009)
MOPS + 0,5% glükoos vedelsööde	1xMOPS soolad; 0,2 % sorbitool; 1,32 mM K ₂ HPO ₄ , 0,2 µg/ml tiamiin; 0,5% glükoos	(Neidhardt <i>et al.</i> 1974)

Tabel 6. Töös kasutatud puhvrid

Puhver	Koostis
10x PCR puhver	750mM TrisHCl pH 8,8; 200mM NH ₂ SO ₄ ; 0.1% tritonX 100; 5% ficoll 400; 10mM tartasiin
HPLC puhver A	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 2,5% metanool; pH 5,3
HPLC puhver B	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 20% metanool; pH 5,1
HPLC puhver C	0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 35% atsetonitril; pH 4,9
1x LP	60mM KCl; 60mM NH ₄ Cl; 50mM Tris HCl pH 8; 6mM MgOAc; 6mM β-merkaptotetanool; 16% sahharoos
1x LLP (1mM Mg)	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10mM Tris HCl pH 8; 1mM MgOAc; 6mM β-merkaptotetanool
1x LLP (6mM Mg)	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10mM Tris HCl pH 8; 6mM MgOAc; 6mM β-merkaptotetanool
1x LLP (12mM Mg)	60 mM KCl; 60 mM NH ₄ Cl; 10mM Tris HCl pH 8; 12mM MgOAc; 6mM β-merkaptotetanool
5X RT-HB	225 mM K-HEPES pH 7; 450 mM KCl
10X RT-RB	1,3 M Tris pH 8,5; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT
RT-STOP	75 mM Na-atsetaat; 70% etanool
dNTP (-C)	110 µM dATP; 110 µM dGTP; 110 µM dTTP; 6 µM dCTP

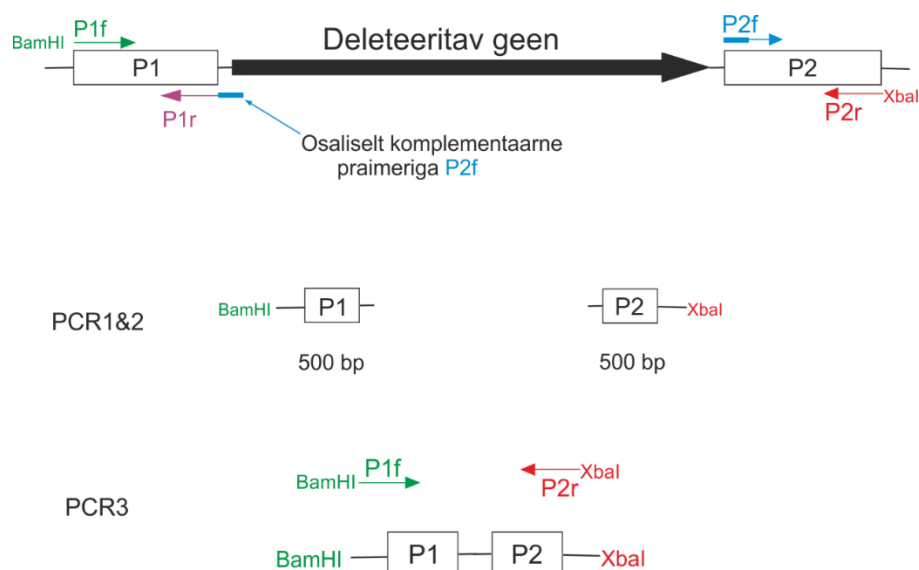
2.3. Metoodika

2.3.1. *E.coli* tüvede konstrueerimine

E.coli tüvede konstrueerimiseks kasutati Victor de Lorenzo laboris välja töötatud protokoll (Martinez-Garcia & de Lorenzo 2011) ning bakteriofaagi P1 transduktsiooni (Sternberg 1990).

2.3.1.1. $\Delta 8$ tüve konstrueerimine de Lorenzo meetodil

rluE geeni deleteerimiseks genoomist viidi läbi kolm PCR reaktsiooni. PCR1 ja PCR2 viidi läbi paralleelselt, mille käigus amplifitseeriti praimeripaare P1f ja P1r ning P2f ja P2r kasutades *E.coli* MG1655 genoomist kaks 500bp pikkust ala (Joonis 6, PCR1&2). Saadud 500bp pikkused geeni flankeerivad alad on võimalik „kokku kleepida“ PCR3 reaktsioonis ehk *sewing* PCR-is. Selleks kasutati eelnevas etapis saadud fragmente, mis on osaliselt komplementaarsed, ning praimereid P1f ja P2r (Joonis 6, PCR3). Kõik nimetatud PCR-i reaktsioonisegud sisaldasid 1x Phusion Master Mix-i (Thermo Scientific), 2U Phusion DNA polümeraasi (2U/ μ l) (Thermo Scientific), 30pmol praimereid (dir ja rev) ning maatriksina kas MG1655 genoomset DNA-d (PCR1&2 puhul) või PCR1-st saadud deleteeritavat geeni flankeerivaid fragmente (*sewing* PCR). Reaktsioonimaht viidi 50 μ l-ni mQ veega. PCR1, PCR2 ja PCR3 tingimused on toodud lisas 1.



Joonis 6. Knockout fragmendi kloneerimine. Praimeritega P1f, P1r, P2f ja P2r amplifitseeriti *E.coli* MG1655 genoomist kaks 500bp pikkust ala (PCR1&2). Saadud 500bp pikkused geeni flankeerivad alad on võimalik „kokku kleepida“ PCR3 reaktsioonis ehk *sewing* PCR-is kasutades primereid P1f ja P2r. Praimerid P1f ja P2r sisaldavad vastavalt BamHI ja XbaI restriksioonisaitide järjestusi, mis võimaldas PCR-is sünteesida soovitud DNA lõigu, mille otstes olid plasmidi kloneerimiseks vajalikud restriksioonisaadid. Saadakse deleteeritavat geeni flankeerivatest aladest koosnev restriksioonisaitidega fragment.

Sewing PCR-i tulemusena saadakse deleteeritavat geeni ümbritsevadest aladest koosnev fragment, millel on otstes restriksioonisaadid. Saadud fragment töödeldi restriktasidiga BamHI ja XbaI, lüües suitsiidvektoris pEMG (Km^R) ja transformeeriti plasmidi paljundamiseks *E.coli* tüvesse DH5α*pir*. Korrekse plasmidi olemasolu kontrolliti koloonia PCR-iga praimeritega pEMG rev ja dir. Selleks suspendeeriti 10µl mQ vees 1 koloonia ning lüüsi 5min jooksul +95°C juures. Seejärel lisati 15µl reaktsioonisegu, mis on toodud lisas 2. Koloonia PCR tingimused on toodud lisas 3. pEMG-ΔRluE plasmid eraldati koloonia PCR-i järgi positiivseks osutunud DH5α*pir* rakkudest *FavorPrep*TM *Plasmid Extraction Mini Kit*-iga.

Triin Truu magistritöös konstrueeritud Δ7 (Δ*rluB* Δ*rluC* Δ*rluF* Δ*rlmB* Δ*rlmKL* Δ*rlmM* Δ*rlmN*) rakud muudeti kompetentseteks RbCl meetodil (Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989) ning transformeeriti pEMG-ΔRluE plasmiidiga. Rakke kasvatati 2xYT vedelsöötmes +37°C juures 3h ning seejärel plaaditi Km (25µg/ml) sisaldavale agarsöötmele. Antud rakkudes ei ole pEMG-ΔRluE plasmid võimeline replitseeruma ning inserteerub bakteri genoomi homoloogilise rekombinatsiooni teel – tulemuseks saadi kointegraatsed rakud, millel kontrolliti korrektset insertiooni asukohta koloonia PCR-iga.

Saadud kointegraat-rakud muudeti RbCl meetodil kompetentseks ning transformeeriti pSW (I-SceI) plasmiidiga (Amp^R). Ampitsilliini resistentseid kolooniaid kasvatati üleöö 2xYT vedelsöötmes +37°C ampitsilliini juuresolekul (200µg/ml) ning I-SceI nukleaasi ekspressioon plasmiidilt pSW (I-SceI) indutseeriti 1,5mM 3-metüülbensoaadi lisamisega. Genoomi integreerunud pEMG-ΔRluE plasmidi kadumist I-SceI nukleaasi mõjul kontrolliti Km (25µg/ml) sisaldaval agarsöötmele.

pSW (I-SceI) plasmidi eemaldamiseks rakkudest passeeriti +37°C juures kasvanud üleöö kultuuri 3 korda edasi 2xYT vedelsöötmesse. pSW plasmidi kadumist kontrolliti Amp agarsöötmele. Amp tundlikutele kolooniaid kontrolliti koloonia PCR-iga, kus kontrolliti järgmiste geenide puudumist *E.coli* genoomist – *rluB*, *rluC*, *rluF*, *rlmB*, *rlmKL*, *rlmM*, *rlmN*, *rluE* vastavate praimeritega.

2.3.1.2. Δ9 bakteritüve konstoreerimine P1 transduktsiooniga

Värske P1 viiruslisaadi saamiseks kasutati MG1655 bakteritüve. Selleks tehti 20-kordne lahjendus üleöö +37°C juures 2ml 2xYT vedelsöötmes kasvanud MG1655 kultuurist uute 2ml 2xYT-sse, mis sisaldas transduktsiooni efektiivsuse tõstmiseks CaCl₂ (lõppkontsentratsioonis 5mM). Rakke kasvatati +37°C juures kuni OD₆₀₀~0,5 ning seejärel inokuleeriti 100µl P1 lisaadiga. Rakke kasvatati +37°C juures 4h, peale mida lisati rakkude lüüsimiseks kloroformi: lisati 200µl kloroformi, segati intensiivselt 10min ning kasutati lauatsentrifuugi 13000rpm 3min, et lüüsunud rakud koos kloroformiga sadestada. Kloroformtöötlust korraldati 2 korda. Värske viiruslisaat säilitati +4°C juures.

Doorortüvena kasutati KEIO kollektsiooni tüve JW3146-2 (Δ*rlmE*::Km), milles oli *rlmE* geen asendatud Km resistentsuskassetiga, ning retsipienttüvena eelnevalt de Lorenzo meetodikaga saadud Δ8 tüve. Retsipienttüve kasvatamisel lisati söötmesse lisaks CaCl₂ ja MgCl₂ (lõppkontsentratsioonis 10mM). Restipiendi nakatamisel doonortüves saadud bakteriofaagiga kasvatati bakterikultuuri P1 bakteriofaagiga vaid 30min eelnevalt kirjeldatud 4h asemel ning edasine rakkude nakatamine peatati 0,3M naatriumtsitraadi lisamisega.

Rakud, millel transduktsiooni käigus oli *rlmE* modifikatsiooniensüümi geen asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga, selekteeriti Km sisaldaval agarsöötmele. Õige tüve olemasolu ehk 9 ensüümi geeni (*rluB*, *rluC*, *rluF*, *rlmB*, *rlmKL*, *rlmM*, *rlmN*, *rluE*, *rlmE*) puudumist genoomist kontrolliti koloonia PCR-iga.

2.3.1.3. $\Delta RlmE$ tüve konstrueerimine P1 transduktiooniga

$\Delta RlmE$ üksikmutandi konstrueerimiseks kasutati P1 transduktsiooni nagu kirjeldatud eelnevalt. Doonorüvena kasutati KEIO kollektsiooni $\Delta rlmE::Km$ tüve JW3146-2 ning retsipienttüvena metsiktüüpi tüve MG1655. Õige tüve olemasolu kontrolliti koloonia PCR-iga praimeritega RlmE dir ja rev.

2.3.2. Tüvede generatsiooniaja määramine

E.coli tüved kasvatati +37°C juures 2ml MOPS vedelsöötmes üleöö. Kultuurist tehti 20-kordne lahjendus 2ml MOPS vedelsöötmesse, millest 200µl kanti 96 kaevuga mikroplaadile. Rakukultuuride OD₆₀₀ mõõdeti mikroplaadilugejas *BMG Labtech POLARstar Omega* ja generatsiooniajad arvutati kasvukõverate eksponentsiaalselt kasvavast osast valemiga 1.

Valem 1. Generatsiooniaja arvutamise valem. k = keskmise kasvukiiruse konstant; x_1 = algne populatsiooni suurus; x_2 = populatsiooni suurus ajahetkel t ; $t = x_1$ ja x_2 vaheline aeg; t (gen) = generatsiooniaeg

$$k = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{0,301 \times t}$$

$$t \text{ (gen)} = \frac{1}{k}$$

2.3.3. Rakkude lüüsimine ja ribosoomide fraktsioneerimine

2.3.3.1. *E.coli* rakkude kasvatamine ja lüüsimine

Üks koloonia inokuleeriti 2ml 2xYT vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö loksutis +37°C juures. Üleöö kasvanud kultuur lahjendati 500ml 2xYT söötmesse ning kasvatati kuni OD₆₀₀~1,0-1,5. Rakud koguti tsentrifuugis *Sorvall RC5B Plus* 6min jooksul 4000rpm juures ning resuspendeeriti 1ml 1x lüüsipuhvris (LP), millele lisati lüsotsüüm ja DNaas I (lõppkontsentratsioonid vastavalt 2mg/ml ja 40U/ml). Rakud lüüsi mehaaniliselt 0,1mm klaaskuulidega *Bertin Precellys24* homogeniseerijas tootja poolt ette nähtud protokoll järgi (6000rpm; 3x60 sek). Lüüsunud rakukestad ja klaaskuulid sadestati lauatsentrifuugis 13000rpm 15min ning saadud supernatandi nukleiinhappe sisaldus mõõdeti *Nanodrop* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*) lainepikkusel 260nm.

2.3.3.2. Subühikute lahutamine sahharoosgradiendis ja dissotsieeritud subühikute puhastamine

Eelmises punktis saadud rakulüsaadist kanti ~80U (A_{260}) 15%-40% sahharoosgradiendile (1x LLP 12mM Mg) ning ultratsentrifuugiti ultratsentrifuugis *Beckman Coulter L90K* rootoriga SW28 (20h, $\omega^2t=3,2 \times 10^{11} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 20000rpm). Ribosoomi fraktsioonid visualiseeriti nukleiinhappe sisalduse järgi läbivoolu-spektrofotomeetriga (*GE Healthcare Monitor UVIS-920*) lainepikkusel 260nm, peristaatilise pumbaga ning isekirjutajaga (*LKB Bromma 2210 recorder*).

70S ribosoomist 50S ja 30S subühikute dissotsieerimiseks aga formeeriti 22% sahharoosgradient külmutus-sulatus meetodil ja ultratsentrifuugiti nagu kirjeldatud eelnevalt. Sahharoosgradiendist (12mM Mg) korjati 70S fraktsioon ning sadestati ultratsentrifuugimise teel rootoriga Ti45 1x LLP-s (1mM Mg) 24h jooksul ($\omega^2t=1,0 \times 10^{12} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 32000rpm). Seejärel resuspendeeriti sadestatud 70S subühikud 1x LLP-s (1mM Mg) ning eraldati 50S ja 30S subühikud külmutus-sulatus sahharoosgradiendis (1mM Mg). Gradiendilt korjati 50S subühikute fraktsioon, mis omakorda sadestati ultratsentrifuugi rootoris Ti45 (12mM Mg) 24h jooksul tingimustel $\omega^2t=1,0 \times 10^{12} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 32000rpm. Dissotsieeritud 50S subühikud resuspendeeriti 1x LLP-s (12mM Mg), külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

2.3.4. Ribosomaalse RNA nukleosiidse koostise analüüs HPLC-ga

2.3.4.1. rRNA puhastamine ribosoomisdest

Ribosomaalse RNA puhastamiseks 3U-st (A_{260}) 50S dissotsieeritud subühikutest lisati proovile võrdne maht fenooli (pH 5.5) ning segati toatemperatuuril vortexil 3min. Valkude sade tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga fenoolfaasi 13000rpm 3min. Vesifaas kanti uute reaktsioonituubi ning fenooltöötlust korrati 2 korda. Peale kolme fenooltöötlust lisati vesifaasile võrdne maht kloroformi, tehti vortex 3min, tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13000rpm 3min ning vesifaas kanti uute reaktsioonituubi. rRNA sadestati 70% etanoolis -20°C üleöö, misjärel sadestati tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugis 13000rpm 15min. RNA sade kuivatati +37°C juures ning resuspendeeriti mQ vees. RNA kontsentratsioon mõõdeti A_{260} *Nanodrop*-il.

2.3.4.2. Proovide HPLC-ks ettevalmistamine ja HPLC tingimused

~2U (A_{260}) puhastatud rRNAd hüdrolüüsiti ensümaatilisel nukleosiid-5'-monofosfaatideks 10µl P1 nukleaasiga (200U/ml) 0,6mM ZnSO₄ lahuses üleöö +37°C juures. Nukleotiidi fosfaatrühmad eemaldati peale P1 nukleaasi töötlust 1U aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) 1-kordses FastAP puhvril (*Thermo Scientific*) 3h jooksul temperatuuril +37°C.

RNA nukleosiidide koostise määramiseks kasutati Gehrke ja Kuo meetodit, *Shimadzu Prominence HPLC* süsteemi, kolonni *Supelcosil LC-18-S* (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m) ning Gerhke ja Kuo meetodil (Gehrke & Kuo 1989). Nukleosiidide kogus määrati neelduvuse järgi lainepikkustel 260 ja 280nm.

2.3.5. Praimerekstensioon

Kuna 23S rRNA-s on kaks m^2G nuklotiidi, siis kontrolliti kas puuduolev üks m^2G on ikka metüültransferaas RlmKL poolt sünteesitav m^2G . Kontrollimiseks kasutati praimeri pikendamise reaktsiooni, kuna m^2G modifikatsioon tekitab sünteesil pöördtranskriptaasi peatumise.

Esimeses etapis segati kokku *annealing mix* lõppmahus 9 μ l. See sisaldas 2pmol 23S rRNA praimerit C6, 2 μ l 5X HB puhvrit, 2pmol puhastatud rRNA-d. Proovid kuumutati 90°C-ni, misjärel jahutati see aeglaselt 47°C-ni, et võimaldada praimeril seonduda. Seejärel lisati 1,2 μ l 10X RB puhvrit; 0,8 μ l dNTP(-C)-d; 0,2 μ l $\alpha^{32}P$ dCTP-d ning 0,2 μ l *Promega* pöördtranskriptaasi. Sünteesitava cDNA märgistamine radioaktiivsete nukleotiididega viidi läbi 42°C juures 30min jooksul lõppruumalas 12 ul. DNA ahela pikendamiseks lisati 2 μ l *chase mix*-i (1mM dNTP) ning inkubeeriti 42°C 15min. Reaktsioon peatati 120 μ l RT *STOP-mix*-i lisamisega, mille järel sadestati DNA -20°C juures üleöö ja tsentrifuugides 4°C juures 13 000rpm 15 min. Supernatant eemaldati ning nukleiinhappe sade kuivatati 37°C juures 10min ning lahustati 10 μ l formamiid stop (FS) puhvris. Proovid denatureeriti +95°C ning fragmentide lahutamiseks kanti 1 μ l praimerekstensioonil saadud materjali 7% UUREA-PAA geelile ja elektroforeesiti 2000V. Geel eksponeeriti Imageri kassetis ja pilt skaneeriti Taiphon Scanneriga. Geelelektroforeesiks valmistati 100 ml 7% polüakrüülamiidgeeli lahust, mis sisaldas nukleiinhappe denatureerimiseks 8M ureat.

Antud katse viis läbi Margus Leppik.

2.3.6. Totaalse rRNA ja valgusüntees *in vivo*

Rakke kasvatati 2ml isotoop-märgimise söötmes +37°C juures üleöö. Seejärel tehti bakterikultuuri 20-kordne lahjendus uuesti 2ml samasse söötmesse ning kasvatati +37°C juures kuni OD₆₀₀~0,4. Seejärel lisati valgusünteesi uurimiseks proovidele 2 μ l *EasyTag*TM [³⁵S]-metioniini (1175Ci/mmol; 43,48TBq/mmol) (Perkin Elmer) ning RNA sünteesi analüüsimiseks 10 μ l 1mM UTP-d ja 2 μ l H³U (30Ci/mmol) (Hartmann Analytic). 10min, 20min, 40min, 60min ja 80min möödudes tõsteti 100 μ l vastava isotoobiga bakterikultuurist 1ml 5% TCA sisse, mis

lõusib rakud ja sadestab valgud ning RNA. [³⁵S]-metioniini proovid kuumutati 95°C juures 5min, et hüdrolüüsida tRNA-d ning vabastada tRNA-de küljest peptiidahelad. Sadestunud valk ja RNA koguti klaasifiibril filtrile vaakumfiltreerimise teel. Filtritele lisati 5ml sintillatsioonivedelikku *Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer)* ning proovide radioaktiivsus mõõdeti *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer* sintillatsiooni analüsaatoriga.

2.3.7. Peptidüültransferaase aktiivsuse määramine *in vitro*

Peptidüültransferaase tsentri aktiivsuse määramiseks *in vitro* võeti 20pmol (A₂₆₀) dissotsieeritud 50S subühikuid, 40pmol [³⁵S]f-Met-tRNA^{Met} ja viidi reaktsioonimaht 200µl-ni 1x LLP-ga (6mM Mg). Subühikud aktiveeriti 20min jooksul +37°C juures. Reaktsiooni läbiviimiseks temperatuuridel +30°C või +42°C inkubeeriti proovi antud temperatuuril enne reaktsiooni initsieerimist veel 5min.

Reaktsioon initsieeriti 30% metanooli ning 1,6mM puromütsiini lisamisega. Initsieerimise järel tõsteti 3,6pmol subühikuid sisaldavat proovi 1M KOH sisse 20sek, 40sek ja 60sek möödumisel initsieerimisest. Reageerimata [³⁵S]f-Met-tRNA^{Met} hüdrolüüsiti 1M KOH-s inkubeerides +37°C juures 20min. pH neutraliseerimiseks lisati 200µl 1M HEPES (pH 7,0) puhvrit. N-formüül-metionüül-puromütsiin kompleksi ekstraheerimiseks lisati reaktsioonisegule 1ml etüülatsetaati (*AppliChem*). 5ml sintillatsioonisegusse *Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer)* kanti etüülatsetaadi faasist 500µl. Proovide radioaktiivsus mõõdeti *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer* sintillatsiooni analüsaatoriga.

2.4. Tulemused

2.4.1. Bakteritüvede konstrueerimine ja kontrollimine

Antud töö eesmärgiks oli kirjeldada *E.coli* 23S ribosomaalse RNA domeenis V asuvate modifitseeritud nukleotiidide puudumise mõju translatsioonile. Selleks konstrueeriti tüvi $\Delta 8$ (*ArлуB ArлуC ArлуF ArlmB ArlmKL ArlmM ArlmN ArлуE*), kust metsiktüüpi bakteritüve MG1655 genoomist on deleteeritud 4 pseudouridiini süntaasi ning 4 metüültransferaasi (Tabel 1). Algtüvena kasutati Triin Truu magistritöö raames konstrueeritud $\Delta 7$ tüve, kust on genoomist deleteeritud 7 ensüümi (Truu 2016) – *ArлуB, ArлуC, ArлуF, ArlmB, ArlmKL, ArlmM* ja *ArlmN*. Triin Truu magistritöö raames ei õnnestunud *E.coli* bakterigenoomist deleteerida pseudouridiini süntaasi *rлуE*, kuna P1 transduktsiooni käigus kandub doonortüvelt retsipienttüvele edast ~100kb suurune DNA lõik. Kuna *rлуE* ja *rлуC* geenid asuvad genoomis teineteisest 50kb kaugusel, siis kandusid neid valke kodeerivad geenid alati retsipienttüvesse edasi koos. Seetõttu kasutati käesolevas töös *rлуE* deleteerimiseks ehk $\Delta 8$ rakkude konstrueerimiseks Victor de Lorenzo protokolliga nagu kirjeldatud meetodites (Martinez-Garcia & de Lorenzo 2011).

Lisaks konstrueeriti tüvi $\Delta 9$, kust on deleteeritud kõik 23S rRNA-s auvad modifikatsioonid ehk lisaks eelnevale kaheksale ensüümile veel üks – positsiooni 2552 modifikatsiooni Um sünteesiv metüültransferaas RlmE. Kuna on teada, et eraldiseisvalt on RlmE puudumisel kasvufenotüübile ning ribosoomiprofiilile suurim efekt, siis kasutati $\Delta 8$ tüve kontrollina, eristamaks RlmE poolt põhjustatud fenotüübilisi efekte ülejäänud modifikatsioonide puudumisest tingitud efektidest. $\Delta 9$ tüve konstrueerimiseks kasutati algtüvena eelnevalt konstrueeritud $\Delta 8$ tüve ning P1 transduktsiooni. Selleks kasutati KEIO kollektiooni Δ rlmE tüve JW3146-2 (Baba *et al.* 2006), kus *rlmE* geen on asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga. P1 transduktsiooni käigus asendatakse doonortüvest viiruspartiklitesse kaasa pakitud kanamütsiini resistentsuskassetiga *rlmE* geen retsipienttüves.

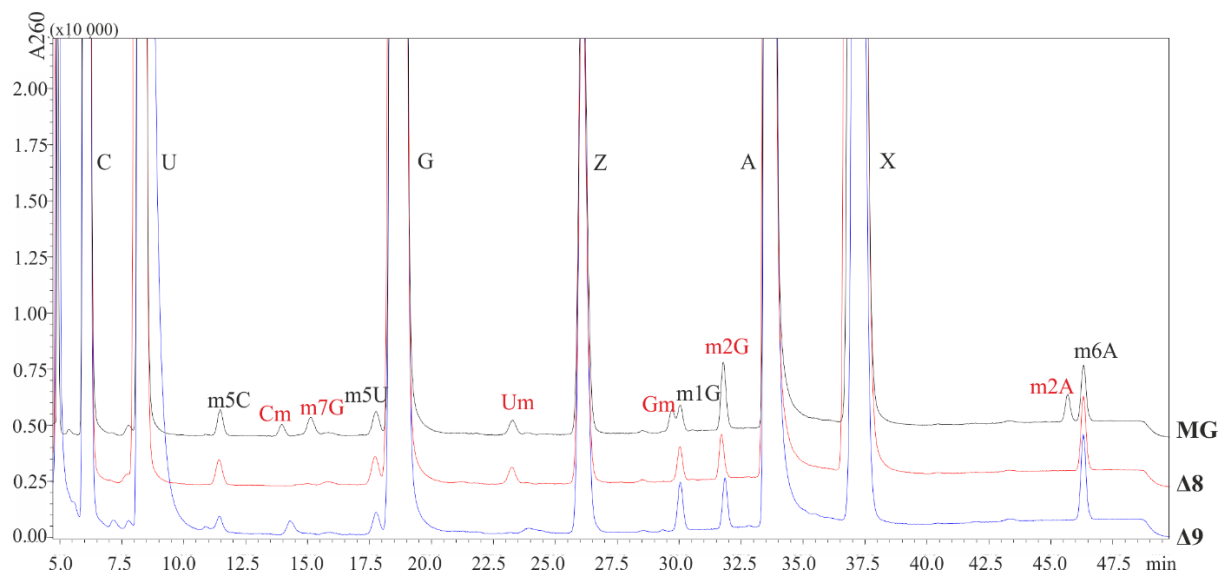
Konstrueeritud bakteritüvedes $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ kontrolliti kõigi deleteeritud modifikatsiooniensüümide geenide puudumist genoomist koloonia PCR-iga. Lisaks kontrolliti nende ensüümide poolt sünteesitavate modifikatsioonide puudumist 23S rRNA-st HPLC-ga nagu kirjeldatud meetodites. HPLC analüüsiks kasutati 70S ribosoomist dissotsieeritud 50S subühikuid.

Jooniselt 7 selgub, et kromatogrammis puuduvad m⁷G, Gm ja m²A modifikatsioonile vastavad piigid, mis viitab, et vastavad modifikatsioonid on $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ tüvedest täielikult puudu. See tulemus kinnitab, et neid modifikatsioone sünteesivad RlmKL, RlmB ja RlmN on tüvede

genoomist deleteeritud. Lisaks on kromatogrammilt näha, et $\Delta 9$ tüves on deleteeritud metüültransferaasi RlmE poolt modifitseeritav Um, mis $\Delta 8$ tüvest pole deleteeritud.

23S rRNA sisaldab kahte m^2G modifikatsiooni ning neid sünteesivad kaks erinevat ensüümi – RlmKL ning RlmG. $\Delta 8$ ning $\Delta 9$ tüvedest on deleteeritud RlmKL, mis on heas kooskõlas joonisega 7, mille järgi m^2G modifikatsiooni piik on vähenenud poole võrra. RlmG poolt sünteesitud m^2G1835 (Zhang *et al.* 2012) peaks 23S rRNA-s endiselt alles olema. Kuna koloonia PCR ei kinnitanud täielikult RlmKL puudumist genoomist, siis kontrolliti RlmKL poolt modifitseeritud m^2G puudumine ka praimerekstensiooniga, mille tulemused on toodud lisas 8. m^2G modifikatsioon põhjustab polümeraasi seiskumise praimeri pikendamise reaktsioonis, mida on näha ka lisast 8 MG1655 puhul. Tüvede $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ puhul on reaktsioon jätkunud, mis viitab m^2G puudumisele.

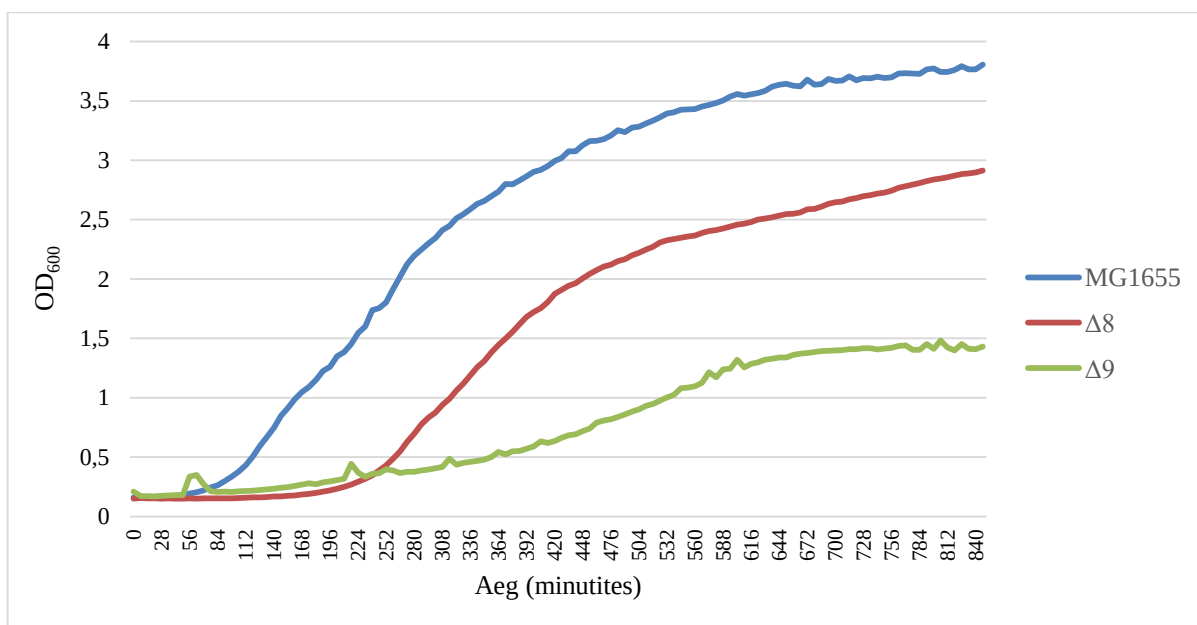
Joonisel 7 on ka näha, et modifikatsioon Cm on $\Delta 8$ tüvest täielikult puudu. $\Delta 9$ tüves on näha Cm ja m^7G piigi vahele tekkinud piiki, mis on metsiktüüpi tüve suhtes nihkunud ning seega on alust arvata, et tegu on tundmatu saastusega. $\Delta 9$ tüve koloonia PCR kinnitas, et modifikatsiooniensüüm RlmM, mis sünteesib modifikatsiooni Cm, on tüvest deleteeritud. Kuna $\Delta 9$ tüvi on konstrueeritud $\Delta 8$ tüvest, millel on kromatogrammil Cm piik puudu, siis on alust arvata, et ka $\Delta 9$ tüves on modifikatsioon jätkuvalt puudu.



Joonis 7. 23S ribosomaalse RNA HPLC kromatogramm. rRNA nukleosiidide analüüsimiseks kasutati Gehrke ja Kuo protokoll (Gehrke & Kuo, 1989). Joonisel märgitud tüve MG1655 (MG) kromatogramm musta värvi, Δ8 punast värvi ja Δ9 23S rRNA HPLC kromatogramm siniselt. Piikidele märgitud nukleosiidid: C, U, G, A on standardised nukleosiidid, X ja Z on proovide töötlemisest tulenevad tundmatud komponendid. Punase kirjaga on tähistatud modifitseeritud nukleosiidid, mis vastavad modifikatsioonidele, mida katalüüsivate valkude geenid on rakkude genoomist eemaldatud (va. Δ8 puhul Um). Musta kirjaga tähistatud kõik ülejäänud modifitseeritud nukleosiidid.

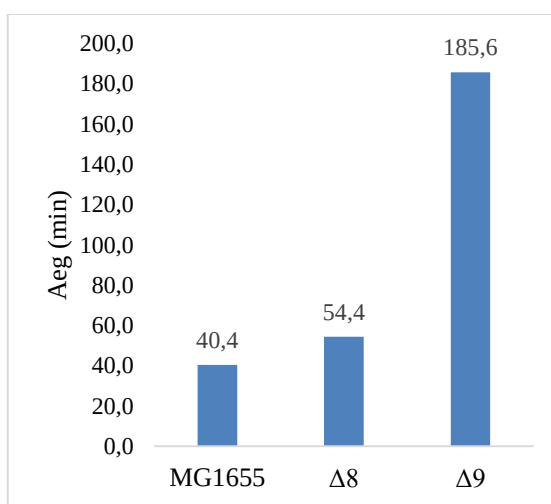
2.4.3. Bakteritüvede kasvukõverad ja generatsiooniajad

23S rRNA modifikatsioonide puudumise mõju kasvufenotübile hinnati MOPS minimaalsöötmel mikroplaatilugejaga *BMG Labtech POLARstar Omega* 14 tunni jooksul temperatuuril +37°C. Joonisel 8 on toodud metsiktüüpi MG1655, Δ8 ja Δ9 kasvukõverad, kust on selgelt näha, et metsiktüüpi MG1655 ja deletsioonitüvede kasv samal söötmel samadel tingimustel on väga erinev. Δ9 tüve kasvukiirus on metsiktüüpi MG1655-ga võrreldes märkimisväärselt langenud. Δ8 tüve kasvukiirus näib olevat sarnane metsiktüübiga, kuid näha on pikemat lag-faasi, mis võib olla põhjustatud ka väiksemast inokulumi hulgast.



Joonis 8. MG1655, Δ8 ja Δ9 tüvede kasvukõverad +37°C juures. Graafiku y-teljel on OD₆₀₀, graafiku x-teljel on aeg minutites. Bakterikultuuri tihedust mõõdeti iga 7 minuti tagant 14h jooksul.

Saadud kasvukõverate eksponentsiaalsele faasist arvatati tüvedele generatsiooniajad, mis on toodud joonisel 9. Võrreldes metsiktüüpi MG1655-ga on Δ8 generatsiooniaeg umbes 14 minuti võrra pikem. Δ9 tüvel on aga võrreldes MG1655-ga generatsiooniaeg pikenenud 4,6 korda (Joonis 9). Seega omab kaheksa 23S rRNA domeeni V modifikatsiooniensüümi deleteerimine rakule vähest mõju, samas kui 9 ensüümi deleteerimine põhjustab aeglase kasvu fenotüübi.

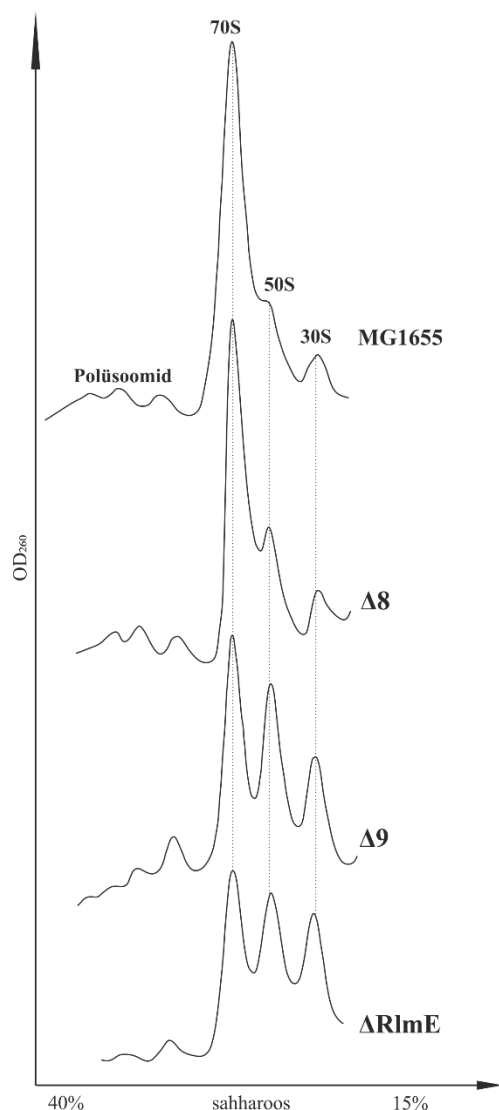


Joonis 9. MG1655, Δ8 ja Δ9 rakkude generatsiooniajad temperatuuril +37°C. Generatsiooniajad on arvatud valemi järgi (Valem 1) kasutades joonisel 8 olevaid andmeid.

2.4.4. Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendis

Selgitamaks 23S ribosomaalse RNA domeeni V modifikatsioonide mõju 70S ribosoomi moodustumisele *in vivo*, formeeriti rakkude ribosoomide ja vabade (50S ja 30S) subühikute hulga analüüsimiseks 15%-40% sahharoosgradient (12mM Mg). Rakulüsaat ultratsentrifuugiti läbi sahharoosgradiendi nagu kirjeldatud peatükis 2.3.3.2.

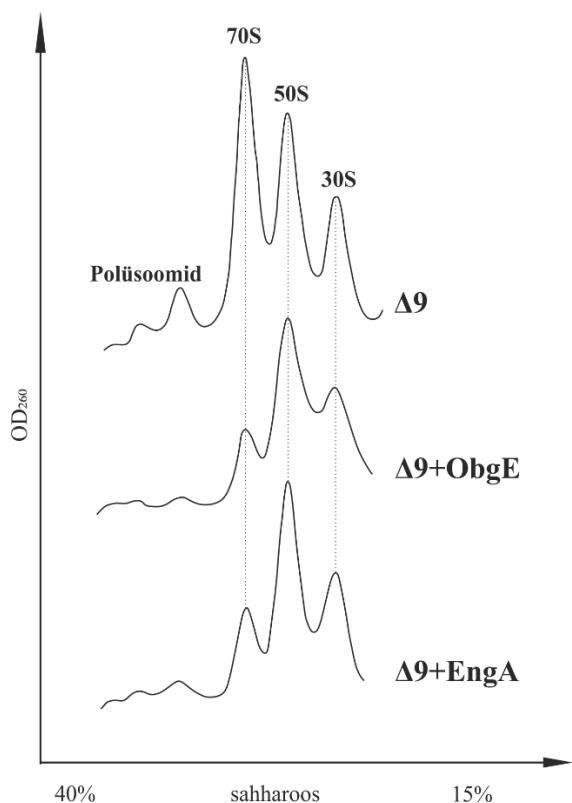
Joonisel 10 on toodud MG1655, Δ RlmE, Δ 8 ja Δ 9 tüvedest pärit ribosoomide sahharoosgradiendi profiil. On näha, et MG1655 ja Δ 8 ribosoomiprofiilid on väga sarnased – neil on palju aktiivselt transleerivaid ribosoomide (polüsoomid ja 70S ribosoomi fraktsioon) ning vähe vabu 50S ja 30S subühikuid. Küll aga on märgata nii Δ 9 kui ka Δ RlmE tüve puhul oluliselt tõusnud vabade mittetransleerivate subühikute osakaalu ning on vähenenud aktiivsete ribosoomide osakaal (Joonis 10), mis viitab 50S subühiku aeglasele assambleerumisele või ribosoomi subühikute aeglasele assotsieerumisele. Kokkuvõtlikult viitavad antud tulemused sellele, et Δ RlmE deleteerimisel *E.coli* genoomist on suurim efekt ribosoomiprofiilile ning ülejäänud 10 modifikatsiooni deleteerimine 23S rRNA domeenist V omab ribosoomiprofiilile vähest mõju. Vähenenud 70S ribosoomide hulk rakus viitab väiksemale valgusünteesi tasemele, mille põhjuseid analüüsiti edaspidi nii *in vivo* kui ka *in vitro* meetodeid kasutades.



Joonis 10. Ribosoomide 15%-40% sahharoosgradiendi profiilid. Toodud on metsiktüüpi MG1655, üksikmutandi $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ tüvedest eraldatud ribosoomide profiilid. Märgitud on polüsoomide, 70S ribosoomi ja vabade ehk 50S ning 30S subühikute piigid.

Tan *et. al* on näidanud, et $\Delta RlmE$ tüves kahe väikese GTPaasi ObgE ja EngA üleekspressioon kompenseerib $RlmE$ deletsioonist põhjustatud kasvudefekti ning stabiliseerib 70S funktsionaalse ribosoomi (Tan *et al.* 2002). Uurimaks, kas ka konstrueeritud $\Delta 9$ tüves GTPaasid $RlmE$ deletsioonist põhjustatud fenotüübi kompenseerivad, kloneeriti GTPaasid plasmidi pBAD ja ekspresseeriti ning analüüsiti ribosoomide profiili. Plasmiidid pBAD-ObgE ja pBAD-EngA konstrueeriti meie laboris juhendaja Margus Leppiku poolt. Joonisel 11 on toodud ObgE-d ja EngA-d ekspresseerivate $\Delta 9$ rakkude ribosoomide profiilid võrrelduna GTPaase mitteeksprimeeriva $\Delta 9$ ribosoomiprofiiliga. Profiilipildilt on näha, et $\Delta 9$ tüves suurenenud vabade inaktiivsete subühikute ja vähenenud funktsionaalsete 70S ribosoomide hulk on GTPaase ekspresseerides antud fenotüüpi veelgi võimendanud – nii EngA kui ka ObgE

ekspressioon rakus viib veelgi suuremale vabade subühikute hulga ning selle arvelt vähenenud 70S ribosoomi fraktsioonile. See tulemus on vastuolus Tan *et al.* tulemustega, et EngA ja ObgE ekspressioon kompenseerib RlmE deletsioonist põhjustatud fenotüübi.



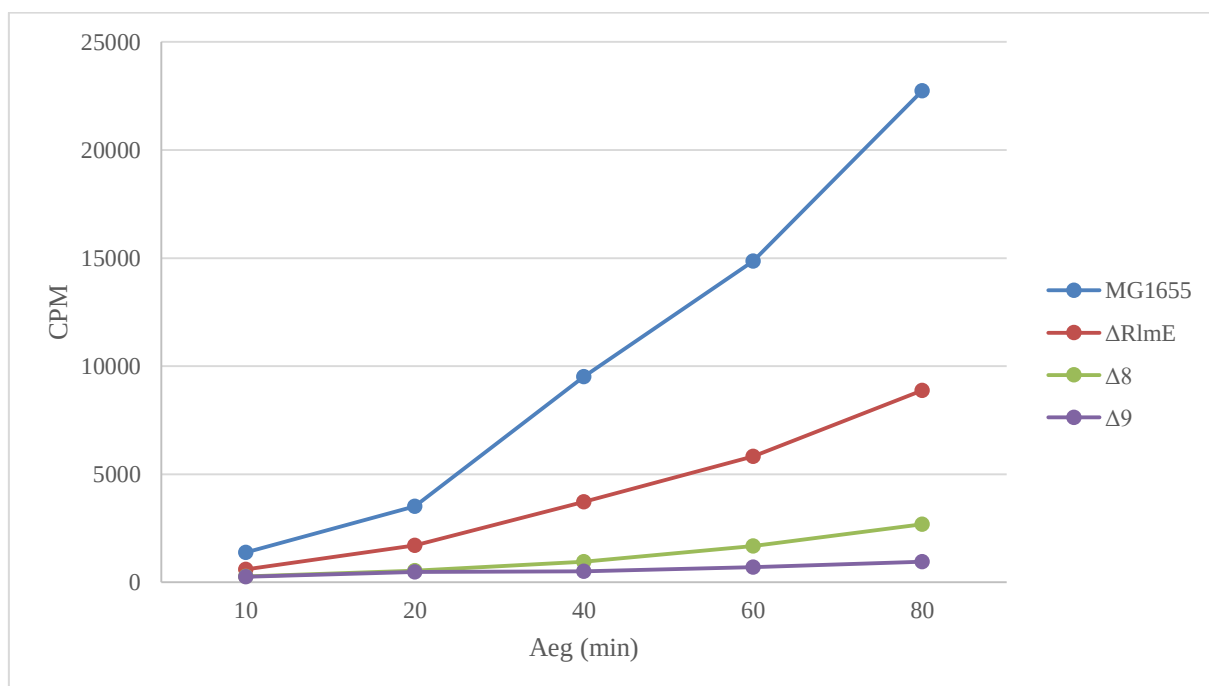
Joonis 11. Ribosoomide 15%-40% sahharoosgradiendi profiilid. Joonisel näidatud $\Delta 9$ ning pBAD plasmiidilt ObgE-d või EngA-d ekspresseerivate $\Delta 9$ rakkude ribosoomiprofiilid. Märgitud polüsoomide, 70S ribosoomi ja vabade ehk 50S ning 30S subühikute piigid.

2.4.5. Totaalne valgusüntees *in vivo*

Totaalse valgu biosünteesi taseme määramiseks $+37^{\circ}\text{C}$ juures viidi läbi *in vivo* rakukultuuri märkimine isotoopiga [^{35}S]-metioniin, mille sisenemisel rakkudes hakatakse isotoopmärgitud metioniini sünteesitavatesse valkudesse lülitama.

Radioaktiivse märgiga valkude TCA-s sadestamine võimaldab mõõta radioaktiivse märke lülitumist sünteesitavatesse valkudesse ja seega võimaldab mõõta reaktsioonis sünteesitud valgu kogust *in vivo*. Valgu biosünteesi katse viidi läbi nelja tüvega: metsiktüüpi MG1655, üksikmutant ΔRlmE , $\Delta 8$ ja $\Delta 9$. Joonisel 12 on näha, et ΔRlmE ning $\Delta 8$ tüvede valgusünteesi tase on võrdlemisi sarnane. Seega võib järeldada, et raku valgu biosünteesi võimet vähendab

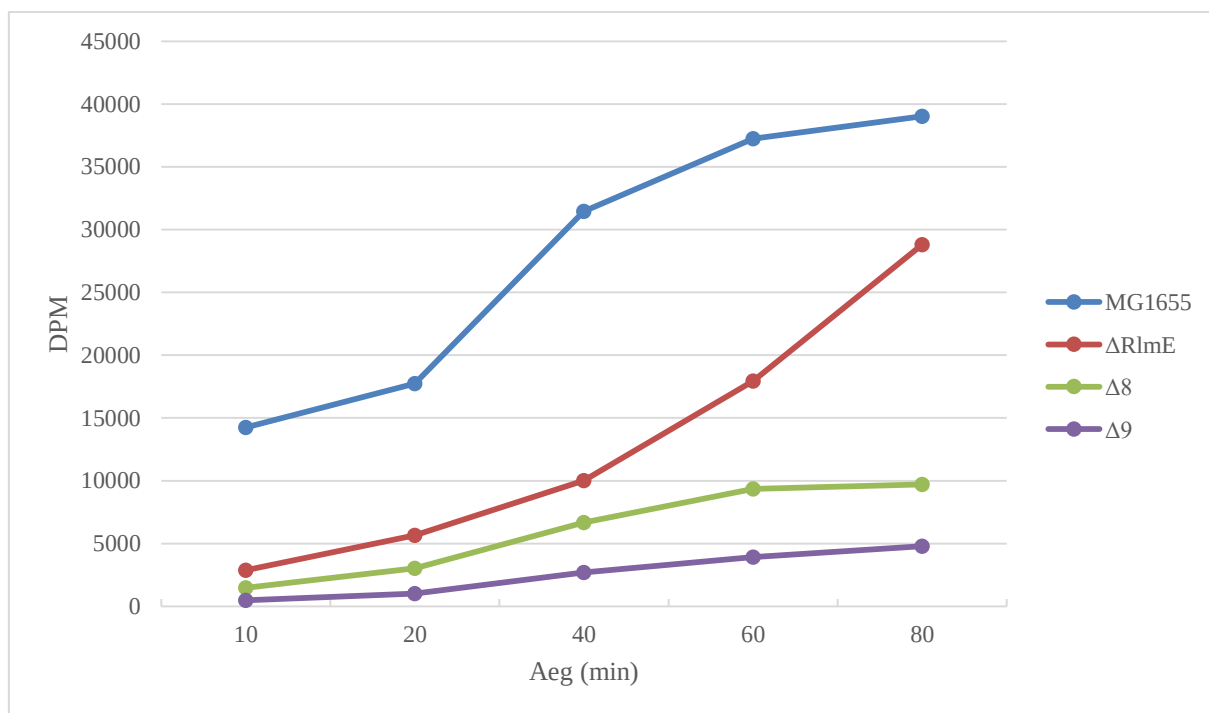
ühe modifikatsiooni ehk RlmE poolt sünteesitud Um2552 puudumine sama palju kui ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi kaotamine PTC-st. Küll aga on näha RlmE ja ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi kaotamise kumulatiivset negatiivset efekti $\Delta 9$ tüve näol, kus 80 minuti jooksul on võrreldes teiste tüvedega valkudesse lülitunud kordades vähem ^{35}S -metioniini (Joonis 12). Antud tulemuste alusel võib järeldada, et PTC-s asuvad modifikatsioonid on valgusünteesis olulised ning suurimat efekti omab metüültransferaas RlmE poolt sünteesitud modifikatsiooni Um2552 puudumine. Antud katset on korratud kahel korral ning esitatud on üks näide. Mõlemal kordusel on näha sama tendents, teise korduse tulemused on toodud lisas 4.



Joonis 12. *In vivo* valgu biosüntees +37°C juures. Graafikul toodud nelja tüve - metsiktüüpi MG1655, üksikmutant ΔRlmE , $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ ^{35}S -metioniini valkudesse lülitamise sirged.

Kontrollimaks ega madal valgusünteesi tase pole põhjustatud raku üldisest madalast metabolismist, analüüsiti *in vivo* ka totaalse RNA sünteesi taset. Kontrolliti kas valgusüntees on madal seetõttu, et rakus on vähenenud RNA süntees, mis põhjustab omakorda valgusünteesi vähenemise rakus, või on madal valgusüntees põhjustatud modifikatsioonide puudumisest PTC-s. Jooniselt 13 võib näha, et võrreldes metsiktüvega MG1655 on kõigi kolme

deletsioontüve totaalse RNA süntees madalam, madalaim $\Delta 9$ tüves. RNA ja valgusünteesi suhted arutati ning sellest selgus, et MG1655 puhul oli RNA sünteesitase valgusünteesi tasemest ~1,7 korda kõrgem, kuid $\Delta 9$ puhul oli 5 korda kõrgem. $\Delta RlmE$ puhul oli RNA sünteesitase kõrgem ~3 korda ning $\Delta 8$ tüvel ~3,5 korda. Ka antud katset on korratud 2 korda ning nähtud tendents on sama. Teise korduse graafiku esitatud lisas 5.



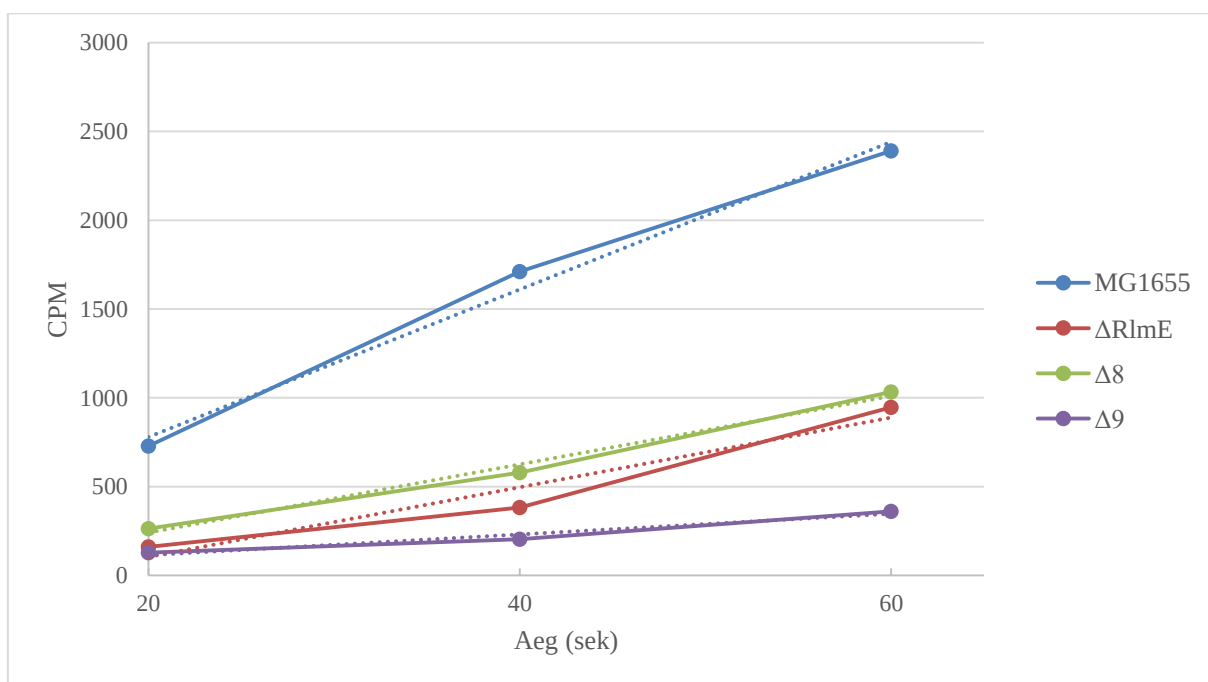
Joonis 13. *In vivo* RNA süntees +37°C. Graafikul toodud nelja tüve - metsiktüüpi MG1655, üksikmutant $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ H^3U RNA-sse lülitamise sirged.

2.4.6. Peptidüültransferaasne (PT) aktiivsus *in vitro*

Peptidüültransferaasse ehk peptiidsideme katalüüsamise aktiivsuse mõõtmiseks 70S funktsionaalsetest ribosoomidest dissotsieeritud 50S subühikutel *in vitro* kasutati [^{35}S]-fMet-tRNA ja puromütsiini reaktsiooni. Puromütsiin on antibiootikum, mis sarnaseb oma struktuuri poolest aa-tRNA 3'CCA otsaga, seega on PTC võimeline läbi viima [^{35}S]-fMet-i ülekannet A-saidis asuvale puromütsiinile. Reaktsioonist tekkinud [^{35}S]-fMet-puromütsiini kompleksi hulga võib võrdsustada PTC katalüüsivõimega, seega on võimalik PTC aktiivsust mõõta radioaktiivse produkti tekke järgi.

In vitro peptidüültransferaasset aktiivsust uuriti temperatuuridel +37°C, +30°C ja +42°C. Radioaktiivse produkti teket mõõdeti 20, 40 ja 60 sekundi möödudes. Aja möödudes peaks ka lineaarselt tõusma PTC aktiivsust märkiva [^{35}S]-fMet-puromütsiini kompleksi hulk. +37°C

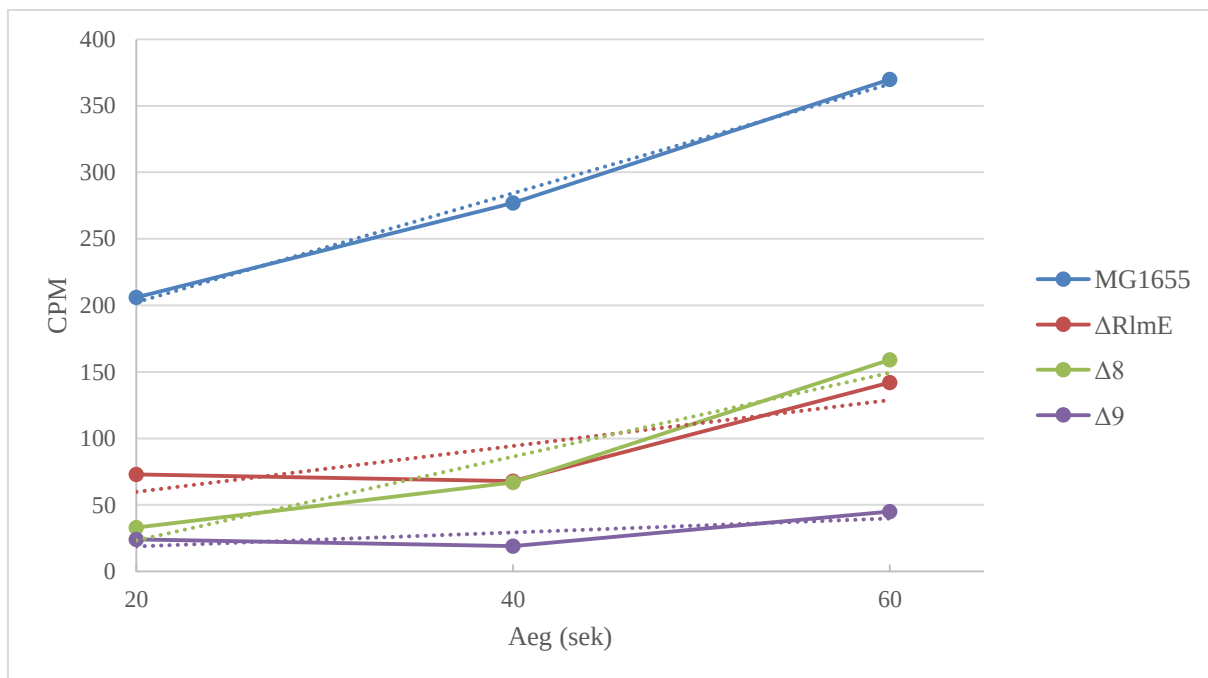
juures viidi katset läbi 3 korda, millest on üks näide toodud välja joonisel 14. Oluline on järgida sirgete lineaarset tõusu, mis on iga tüve kohta välja toodud samavärvilise punktiirjoonega. Sellele tuginedes võib järeldada, et $\Delta 8$ ja $\Delta RlmE$ tüvedest dissotsieeritud 50S subühikute sirgete tõusud joonisel 14 on samad ehk PTC on neil tüvedel samaväärselt võimeline peptiidsidet sünteesima (Joonis 14). Küll aga on $\Delta 9$ tüvest dissotsieeritud 50S subühikute puhul näha märkimisväärset PTC aktiivsuse langust. See tulemus korreleerub ka eelnevalt läbi viidud *in vivo* totaalse valgusünteesi katsega. Läbiviidud *in vivo* ja *in vitro* katsete tulemustest võib järeldada, et MG1655 metsiktüüpi tüvest deleteerides vaid metüültrasferaas RlmE või kõik ülejäänud 8 modifikatsioonientsüümi (*ArhB ArhC ArhF ArhM ArhKL ArhMM ArhMN ArhE*) avaldab ribosoomi peptidüültrasferaasile aktiivsusele sarnast efekti. $\Delta 9$ tüvel on peptidüültrasferaasne aktiivsus võrreldes teiste tüvedega väga madal.



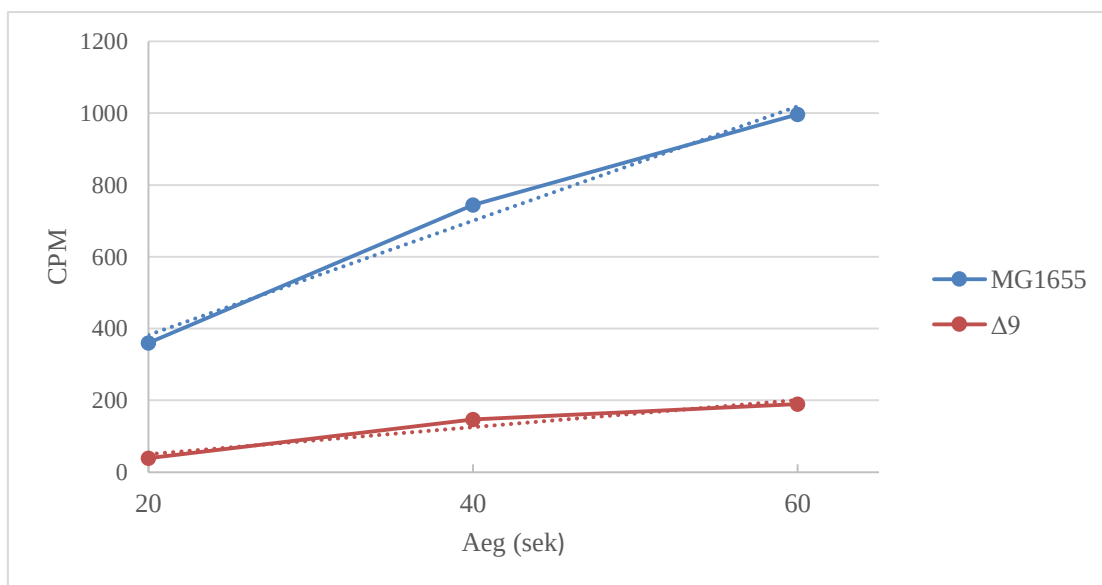
Joonis 14. [^{35}S]-fMet-puromütsiini reaktsiooni graafik (+37°C). Katse viidi läbi metsiktüüpi MG1655, $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ -ga. Punktiirjoonega tõmmatud sirgete lineaarsed tõusud.

50S subühikute peptidüültrasferaasset aktiivsust analüüsiti ka temperatuuridel +42°C kõigi neljast tüvest dissotsieeritud subühikutega ning +30°C juures vaid metsiktüvega MG1655 ning $\Delta 9$ tüvega. Nendel temperatuuridel analüüsiti PT aktiivsust 1 kordus. Joonisel 15 on näha, et +42°C juures on $\Delta 8$ tüve 50S dissotsieeritud subühikute PT aktiivsus pigem sarnane metsiktüve MG1655-ga kui $\Delta RlmE$ -ga nagu võis näha +37°C juures. $\Delta 9$ tüve tõus on jätkuvalt madal. Sama võib näha ka jooniselt 16, kus on katse läbi viidud temperatuuril +30°C juures tüvedega

MG1655 ning $\Delta 9$. Kokkuvõtlikult võib öelda, et MG1655 metsiktüüpi tüvest deleteerides vaid metüültrasferaas RlmE või kõik ülejäänud 8 modifikatsioonensüümi omab raku peptidüültrasferaasele aktiivsusele sarnast efekti. RlmE ja ülejäänud 8 modifikatsioonensüümi puudumine avaldab rakule negatiivset kumulatiivset mõju – $\Delta 9$ rakkude PT aktiivsus on väga madal.



Joonis 15. [^{35}S]-fMet-puromütsiini reaktsiooni graafik (+42°C). Katse viidi läbi metsiktüüpi MG1655, $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ -ga. Punktiirjoonega tõmmatud sirgete lineaarsed tõusud.



Joonis 16. [^{35}S]-fMet-puromütsiini reaktsiooni graafik (+30°C). Katse viidi läbi metsiktüüpi MG1655 ja $\Delta 9$ -ga. Punktiirjoonega tõmmatud sirgete lineaarsed tõusud.

Lisaks eraldati $\Delta 9$ tüve polüsoomide fraktsioonist 50S subühikud ning analüüsiti peptidüültransferaasse tsentri aktiivsust *in vitro*. Polüsoomidest dissotsieeritud $\Delta 9$ tüve 50S subühikuid käsitleti kui kontrolli. Polüsoomid on aktiivselt transleerivad ribosoomid ning seega kontrolliti ega 70S ribosoomidest dissotsieeritud 50S subühikute PT aktiivsus pole madal, kuna selles ribosoomide fraktsioonis esineb 50S subühikuid, mis on katalüütiliselt defektsed. $\Delta 9$ tüve polüsoomidest dissotsieeritud 50S subühikute peptidüültransferaasne aktiivsus on graafikuna toodud lisas 7 metsiktüüpi MG1655, $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ ja $\Delta 9$ tüve 70S ribosoomist dissotsieeritud 50S subühikute võrdluses. Kuigi $\Delta 9$ polüsoomidest dissotsieeritud 50S subühikute PT aktiivsus on veidi kõrgem kui $\Delta 9$ tüve 70S ribosoomidest dissotsieeritud 50S subühikute PT aktiivsus, kuid madalam kui metsiktüüpi, $\Delta RlmE$ või $\Delta 8$ tüvel, võib siiski kokkuvõtlikult järeldada, et modifikatsioonid ribosoomi PTC-s on vajalikud peptiidsideme katalüüsiks. Suurim efekt PT aktiivsusele on modifikatsioonil Um , mida sünteesib metüültransferaas $RlmE$, kuid ülejäänud modifikatsioonidel on samuti väga oluline roll.

2.5. Arutelu

Modifitseeritud nukleotiidid on koondunud rRNA funktsionaalselt olulistesse aladesse, kus nende roll pole kaugeltki selge. Enamus 23S rRNA modifikatsioonidest asub domeenis V, mis moodustab peptidüültrasferaasse tsentri. Arvatakse, et eraldiseisvalt on modifikatsioonid vajalikud ribosoomi peenhäälestamiseks. Green ja Noller näitasid, et *in vitro* transkribeeritud 23S rRNA pole võimeline assambleeruma funktsionaalseks 50S subühikuks (Green & Noller 1996). Nad identifitseerisid 80 nukleotiidi pikkuse ala PTC-s, milles asuvad modifitseeritud nukleotiidid on hädavajalikud ribosoomi funktsionaalsuse tagamiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada 23S rRNA domeenist V moodustuva PTC modifikatsioonide puudumise mõju valgu biosünteesile. Selleks konstrueeriti tüved $\Delta RlmE$, $\Delta 8$ (*$\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rluE$*), $\Delta 9$ (*$\Delta rluB \Delta rluC \Delta rluF \Delta rlmB \Delta rlmKL \Delta rlmM \Delta rlmN \Delta rluE \Delta rlmE$*) ja $\Delta RlmE$.

Töö tulemustest selgub, et kõigi 23S rRNA-s asuvate modifikatsioonide puudumisel pikeneb rakkude generatsiooniaeg 4,6 korda (Joonis 9, $\Delta 9$ tüvi). $\Delta 8$ tüvel suureneb rakkude generatsiooniaeg umbes 35% võrra ehk 14 minutit. Suurim efekt kasvukiirusele on modifikatsioonil Um2552, mida sünteesib modifikatsiooniensüüm RlmE. On näidatud, et ainult RlmE puudumisel tõuseb generatsiooniaeg 2 korda (Caldas *et al.* 2000). Tüve $\Delta 9$ ~5 korda tõusnud generatsiooniaeg on siiski põhjustatud kõigi modifikatsioonide puudumise kumulatiivsest negatiivsest efektist, mitte ainult RlmE poolt modifitseeritud Um2552 puudumisest.

Tüvedest eraldatud ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendis selgitas $\Delta 9$ bakteritüve umbes viis korda tõusnud generatsiooniaja põhjuse. $\Delta 9$ ribosoomiprofiil näitab, et funktsionaalsete 70S ribosoomide hulk on langenud ning selle arvelt tõusnud vabade 50S ja 30S subühikute hulk, mis viitab langenud valgusünteesi tasemele rakus. Sarnane $\Delta 9$ ribosoomiprofiilile on $\Delta RlmE$ tüve profiil, kuid $\Delta 8$ tüvest eraldatud ribosoomiprofiil sarnaneb metsiktüüpi MG1655-ga – palju polüsoome ja 70S ribosome ning vähe vabu subühikuid, seega toimub rakus aktiivne translatsioon. Antud tulemuste alusel võiks spekuloida, et kuigi $\Delta 9$ fenotüübi põhjustab kõigi modifikatsioonide üheaegne puudumine, siis suurima panuse $\Delta 9$ tüve fenotüübi kujunemisele on põhjustanud RlmE puudumine, sest ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi puudumine ei avalda raku ribosoomiprofiilile mõju.

Üllatavalt võimendas GTPaaside ObgE ja EngA ekspressioon rakus veelgi $\Delta 9$ tüves nähtud suurt vabade subühikute ning väikest 70S ribosoomide hulka. Nii ObgE-d kui ka EngA-d ekspresseerivad $\Delta 9$ tüve rakkude ribosoomi profiilidel on näha väga suurt vabade inaktiivsete 50S ja 30S subühikute ning väga madalat 70S ribosoomi hulka. Võib spekuloida, et ObgE ja EngA osalevad subühikute assotseerumisel. Võimalik, et EngA ja ObgE ei lase 50S subühikutel, mis pole võimelised transleerima, assotseeruda 30S-iga ja seega moodustada 70S-i. Küll aga ühinevad need subühikud, mis on võimelised transleerima. ObgE ja EngA ekspressioon on $\Delta 9$ rakkudes põhjustanud suurenenud vabade subühikute hulga, seega pole võimeline kompenseerima nähtud fenotüüpi sarnaselt $\Delta RlmE$ tüves nähtule (Tan *et al.* 2002).

Konstrueeritud tüvedel analüüsiti *in vivo* totaalse valgu biosünteesi taset isotoobiga [^{35}S]-metioniin. Tulemustes on toodud läbiviidud kahest kordusest üks näide. Teine näide on toodud lisas 4, kuna isotoobi lisamine erinevates kordustes veidi erinevatel bakterikultuuri tihedustel tekitas tulemustes kõikumise. Nähtav tendents on aga sama. Tulemustes on näha, et $\Delta RlmE$ ning $\Delta 8$ tüvede valgusünteesi tase on võrdlemisi sarnasel tasemel. Seega võib järeldada, et raku valgu biosünteesi võimet mõjutab ühe modifikatsiooni puudumine sama palju kui ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi poolt sünteesitava 10 modifikatsiooni kaotamine PTC-st. Kõigi 11 modifikatsiooni puudumine PTC-s põhjustab rakkudes madala valgusünteesi taseme. 80 minuti jooksul on $\Delta 9$ tüves võrreldes teiste tüvedega kordades vähem [^{35}S]-metioniini valkudesse lülitunud. Sellest võib järeldada, et PTC-s asuvad modifikatsioonid on valgusünteesis olulised.

Seejärel kontrolliti ka rakkude totaalse RNA taset, et näha kas madal valgusünteesi tase *in vivo* on põhjustatud raku metabolismihäiretest või ribosoomi töö häirumisest modifikatsioonide puudumise tõttu. Võrreldes metsiktüvega MG1655 on kõigi kolme deletsioontüve totaalse RNA sünteesi tase veidi madalam, kõige madalam RNA sünteesi tase on $\Delta 9$ tüves. Parema ülevaate saamiseks arvutati RNA ja valgusünteesi suhted CPM ja DPM arvude järgi ning sellest selgus, et MG1655 puhul oli RNA sünteesitase valgusünteesi tasemest ~1,7 korda kõrgem, kuid $\Delta 9$ puhul oli ~5 korda kõrgem. Seega võib näha, et valgusüntees on $\Delta 9$ rakkudes kordades madalam võrreldes MG1655-ga, mis viitab sellele, et valgusünteesi madal tase on põhjustatud ribosoomi funktsiooni defektidest. Võib spekuloida, et antud madala valgusünteesi taseme tõttu rakkudes sünteesitakse ka vähe RNA polümeraasi, mille tõttu sünteesitakse rakus RNA-d normaalsest vähem.

In vivo valgusünteesi tulemused korreleeruvad hästi ka läbiviidud *in vitro* katsetega, kus kasutati PT aktiivsuse mõõtmiseks [^{35}S]-fMet-tRNA ja puromütsiini reaktsiooni. Antud katset

temperatuuril +37°C viidi läbi 3 kordust, kuid kuna korduste jooksul langes teadmata põhjustel aktiivsete ribosoomide arv, siis ei saa kolme eksperimenti ühele graafikule panna. Seetõttu on kahe teise eksperimendi absoluutarvud toodud lisas 6. Kõigil kolmel kordusel on näha siiski sarnane tendents. Puromütsiini ja [³⁵S]-fMet-tRNA katsest on näha jällegi Δ RlmE ja Δ 8 sarnasusi – nende tüvede reaktsioonide sirgetel on antud katses sama tõus ehk siis PT aktiivsus on neil võrdne. Δ 9 tüvest dissotsieeritud 50S subühikutel aga on võrreldes teiste tüvedega märkimisväärselt madalam tõus, mis viitab madalale PT aktiivsusele. Lisaks Δ 9 tüve 70S funktsionaalsest ribosoomist dissotsieeritud 50S subühikutele analüüsiti PT aktiivsust ka Δ 9 polüsoomide fraktsioonist dissotsieeritud 50S subühikutel. See sai kontrolliks, kuna on võimalik, et polüsoomide fraktsioonis on aktiivselt transleerivad ribosoomid ning 70S subühikutest dissotsieeritud 50S subühikute PT aktiivsus on madal, sest 70S ribosoomidel esineb assambleerumise defekte. Seega 70S ribosoomid võivad olla inaktiivsed ning aktiivsed transleerivad ribosoomid asuda polüsoomide fraktsioonis. Tulemustest aga avaldus, et polüsoomidest dissotsieeritud 50S subühikute PT aktiivsus oli küll veidi parem kui Δ 9 tüve 70S-st dissotsieeritud 50S subühikutel, kuid siiski märkimisväärselt madalam kui metsiktüübil või Δ RlmE ja Δ 8 tüvedel. Sama tendents oli näha ka temperatuuridel +30°C ja +42°C. See kinnitab, et modifikatsioonid PTC-s on peptiidside sünteesiks vajalikud.

Green ja Noller on näitanud, et 6 PTC-s asuvat modifikatsiooni on hädavajalikud 50S subühiku assambleerumiseks ning nad järeldasid sellest, et modifikatsioonid PTC-s on olulised eelkõige 50S subühiku aktiivtsentri assambleerimiseks (Green & Noller 1996). Antud töö tulemustest võib näha, et metsiktüüpi tüvest deleteerides vaid 1 modifikatsioon (Δ RlmE) või kõik ülejäänud 10 modifikatsiooni (Δ 8 tüvi) avaldab raku peptidüültransferaasele aktiivsusele võrdväärset negatiivset efekti. Δ 9 tüvel on peptidüültransferaase aktiivsus võrreldes Δ RlmE ja Δ 8 tüvedega väga madal, Δ 9 rakkude generatsiooniaeg on kasvanud 4,6 korda võrreldes metsiktüübiga ning ribosoomi profiililt näha palju vabu subühikuid ja vähe 70S funktsionaalseid ribosoomide. Kuigi ribosoomi profiili järgi on Δ RlmE tüvel palju vabu subühikuid ja vähe funktsionaalseid 70S ribosoomide ning Δ 8 tüve ribosoomide fraktsioneerimise profiil väga sarnane metsiktüübile, siis valgu biosünteesi võime on neil sarnane. Caldas *et al.* spekulatsioonid, et modifikatsioon Um suurendab valgusünteesi aktiivsust ning tugevdab subühikutevahelist interaktsiooni. Käesoleva töö tulemustele tuginedes võib spekuloida, et RlmE poolt sünteesitud modifikatsioon Um on vajalik pigem 50S subühikute assotsiatsioonil. Ülejäänud 8 modifikatsioonienamuse poolt sünteesitud modifikatsioonid on

olulised pigem 50S subühiku funktsionaalsuses ehk peptiidahela sünteesis. See seletaks ka $\Delta 9$ tüvel nähtud fenotüübi, mis summeeris nii $\Delta RlmE$ kui ka $\Delta 8$ fenotüübi.

Kuna täpselt pole teada kuidas RlmE sünteesitav modifikatsioon Um ribosoomi subühikute assambleerimist mõjutab, tuleb seda uurida edasistes katsetes. Kokkuvõtlikult avaldub tulemustest, et 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid on olulised ribosoomi peenhäälestamisel – nii peptidüültransferaasse tsentri aktiivsuse tagamisel kui ka subühikute assotsiatsioonil.

Kokkuvõte

Modifitseeritud nukleotiidid asuvad 23S rRNA funktsionaalselt olulises piirkonnas PTC-s. Kuigi uuritud on modifikatsioonide rolli ribosoomis juba kümneid aastaid, siis teada on nende kohta vähe. Käesoleva magistr töö teemaks oli uurida kõigi 23S rRNA modifikatsioonide puudumise mõju ribosoomi valgu biosünteesile. Tulemustest väljendub, et peptidüültransferaase tsentri modifikatsioonide üheaegne puudumine *E.coli* genoomist põhjustab 4 korda pikenenud generatsiooniaega. Selle põhjustele vihib rakkude ribosoomiprofiil, kus on näha oluliselt vähenenud 70S ribosoomide ning suurenenud vabade 50S ja 30S subühikute hulka $\Delta 9$ rakkudes. See tulemus näitab, et rakus on vähenenud translatsioonitase ning defektid ribosoomi subühikute omavahelises interakteerumises ehk assotsieerumises.

In vivo katsetega näidati, et kõigi 11 PTC-s asuva modifikatsiooni puudumisel on rakkude valgu biosünteesi tase väga madal. Deleteerides üks modifikatsiooniensüüm (RlmE) rakkude genoomist omas samaväärset efekti rakule nagu ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi deleteerimine. Seega võib öelda, et suurim efekt $\Delta 9$ tüve fenotüübi väljakujunemisele on metüültransferaasi RlmE puudumine, mis sünteesib modifikatsiooni Um2552. Sama oli näha ka *in vitro* katsetes, kus $\Delta 9$ tüvel võis näha väga madalat peptidüültransferaasest aktiivsust nii optimaalsel temperatuuril $+37^{\circ}\text{C}$ kui ka temperatuuridel $+30^{\circ}\text{C}$ ja $+42^{\circ}\text{C}$. Kuigi metüültransferaasi RlmE puudumisel on $\Delta 9$ raku fenotüübi kujunemisele suurim mõju, on ka ülejäänud 8 modifikatsiooniensüümi deleteerimisel translatsiooni peenhäätamisele arvestatav mõju.

Tuginedes käesoleva töö tulemustele võib spekuloida, et modifitseeritud nukleotiidid 23S rRNA domeenis V on olulised ribosoomi peptidüültransferaase aktiivsuse tagamiseks ning subühikute assotsieerimisel 70S funktsionaalseks ribosoomiks.

Summary

Ribosomes are responsible for protein biosynthesis from amino acids in all living cells. It consists of 2 subunits – 30S and 50S. 23S rRNA is located in the larger 50S subunit and its domain V contains the peptidyl transferase center (PTC) in which peptide bond formation takes place. All RNA-s are posttranscriptionally modified. Modified nucleotides are mainly clustered into 23S rRNAs PTC. Although the role of modifications has been studied for quite some time, still very little is known about them. The main theme of present masters thesis was to study the effect of losing all 11 modifications from PTC on protein biosynthesis in *E.coli* cells.

Deletion of all modifications led to 4 times longer generation time when compared to wild type strain MG1655. This phenomenon might be explained by decrease of functional 70S ribosomes and polysomes and also with larger amount of non-translating 50S and 30S subunit fractions that can be seen in $\Delta 9$ stains ribosome profile. This shows that the rate of translation in cells is decreased and there are defects in 30S and 50S subunit association.

Deletion of all 11 modifications from found in PTC led to very low protein synthesis *in vivo*. Deletion of only RlmE or deletion of other 8 modification enzymes had similar effects on cells protein synthesis – lower than wild type, but higher than $\Delta 9$. So the cumulative negative effect of deleting all modification enzymes from *E.coli* strains is mostly caused by deletion of methyltransferase RlmE. The same was observed *in vitro* with puromycin and [³⁵S]-fMet-tRNA. 50S subunits dissociated from $\Delta 9$ stains 70S ribosomes had very low peptidyl transferase activity in optimal +37°C and also +30°C and +42°C. Although deletion of methyltransferase RlmE has the biggest effect on seen phenotype in $\Delta 9$ cells, other 8 modification enzymes have a considerable effect on fine-tuning of the ribosome.

Based on the results shown in present masters thesis, it can be speculated that modifications in 23S rRNA domain V are essential for ensuring ribosomes peptidyl transferase activity and also for subunit association into actively translating 70S ribosomes.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajat Margus Leppikut 4 aasta pikkuse meisterliku juhendamise ning kannatlikkuse eest. Kindlasti soovin tänada ka TÜ MRI molekulaarbioloogia labori professorit Jaanus Remmet heade soovitude ning intrigeeriva lõputöö teema eest.

Soovin tänada ka geneetika õppetooli vanemteadurit Rita Hõrakut, kes tutvustas mulle de Lorenzo metoodikat, tänu millele antud töö võimalikuks sai.

Tänamata ei jää ka TÜMRI molekulaarbioloogia ja üldise mikroobibiokeemia meeldiv seltskond.

5. Kirjanduse loetelu

Raamatud ja lõputööd:

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.

Truu, T. 2016. 23S rRNA modifikatsioonide roll valgusünteesis. Magistritöö

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. *Q Rev Biophys.* 2009 August ; 42(3): 159–200. doi:10.1017/S0033583509990060.

Agmon I., Bashan A., Zarivach R. & Yonath A. (2005). Symmetry at the active site of the ribosome: structural and functional implications. *Biological chemistry*, 386, 833-44.

Alian A., DeGiovanni A., Griner S.L., Finer-Moore J.S. & Stroud R.M. (2009). Crystal structure of an RluF-RNA complex: a base-pair rearrangement is the key to selectivity of RluF for U2604 of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 388, 785-800.

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, E4707-16.

Arluisson V., Hountondji C., Robert B. & Grosjean H. (1998). Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry*, 37, 7268-76.

Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L. & Mori H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2, 2006 0008.

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, 905-20.

Beringer M. & Rodnina M.V. (2007). The ribosomal peptidyl transferase. *Molecular cell*, 26, 311-21.

Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62, 293-300.

Blanchard S.C. & Puglisi J.D. (2001). Solution structure of the A loop of 23S ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3720-5.

Blattner F.R., Plunkett G., 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B. & Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453-62.

- Brimacombe R. & Stiege W. (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *The Biochemical journal*, 229, 1-17.
- Brock S., Szkaradkiewicz K. & Sprinzl M. (1998). Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Molecular microbiology*, 29, 409-17.
- Caldas T., Binet E., Boulloc 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, 714-8.
- Charette M. & Gray M.W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB life*, 49, 341-51.
- 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, 18562-6.
- Czudnochowski N., Ashley G.W., Santi D.V., Alian A., Finer-Moore J. & Stroud R.M. (2014). The mechanism of pseudouridine synthases from a covalent complex with RNA, and alternate specificity for U2605 versus U2604 between close homologs. *Nucleic acids research*, 42, 2037-48.
- Davis D.R. (1995). Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research*, 23, 5020-6.
- Decatur W.A. & Fournier M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27, 344-51.
- Del Campo M., Kaya Y. & Ofengand J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in Escherichia coli. *Rna*, 7, 1603-15.
- Dunkle J.A. & Cate J.H.D. (2012). An introduction to the structure and function of the ribosome. *EcoSal Plus 2013*; doi:10.1128/ecosal.2.5.2.
- Erlacher M.D., Lang K., Wotzel B., Rieder R., Micura R. & Polacek N. (2006). Efficient ribosomal peptidyl transfer critically relies on the presence of the ribose 2'-OH at A2451 of 23S rRNA. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 4453-9.
- Ero R. (2012). Modifier view of the bacterial ribosome. In: *Molecular Biology*. University of Tartu.
- Gao H., Sengupta J., Valle M., Korostelev A., Eswar N., Stagg S.M., Van Roey P., Agrawal R.K., Harvey S.C., Sali A., Chapman M.S. & 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.
- 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*, 2, 1011-21.
- 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.

- Gutgsell N.S., Deutscher M.P. & Ofengand J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *Rna*, 11, 1141-52.
- Hamma T. & Ferre-D'Amare A.R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & biology*, 13, 1125-35.
- Helm M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic acids research*, 34, 721-33.
- Jiang J., Seo H. & Chow C.S. (2016). Post-transcriptional Modifications Modulate rRNA Structure and Ligand Interactions. *Accounts of chemical research*, 49, 893-901.
- Khaitovich P. & Mankin A.S. (1999). Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5 S rRNA. *Journal of molecular biology*, 291, 1025-34.
- 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, 4071-85.
- Klein D.J., Moore P.B. & Steitz T.A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *Journal of molecular biology*, 340, 141-77.
- Lancaster L., Lambert N.J., Maklan E.J., Horan L.H. & Noller H.F. (2008). The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit. *Rna*, 14, 1999-2012.
- Laursen B.S., Sorensen H.P., Mortensen K.K. & Sperling-Petersen H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69, 101-23.
- Liu Q. & Fredrick K. (2016). Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome. *Journal of molecular biology*, 428, 2146-64.
- Long K.S. & Vester B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms, with an Emphasis on Those Related to the Ribosome. *EcoSal Plus*, 3.
- 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, 6957-60.
- Maeda M., Shimada T. & Ishihama A. (2015). Strength and Regulation of Seven rRNA Promoters in *Escherichia coli*. *PloS one*, 10, e0144697.
- Maivali U. & Remme J. (2004). Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *Rna*, 10, 600-4.
- Martin J.L. & McMillan F.M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current opinion in structural biology*, 12, 783-93.
- Martinez-Garcia E. & de Lorenzo V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 13, 2702-16.
- Melnikov S., Ben-Shem A., de Loubresse N.G., Jenner L., Yusupova G. & Yusupov M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jun 5;19(6):560-7. doi: 10.1038/nsmb.2313.

- Moazed D. & Noller H.F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, 342, 142-8.
- Moore P.B. & Steitz T.A. (2003). After the ribosome structures: how does peptidyl transferase work? *Rna*, 9, 155-9.
- Neidhardt F.C., Bloch P.L. & Smith D.F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of bacteriology*, 119, 736-47.
- Nierhaus K.H. (1980). The assembly of the prokaryotic ribosome. *Bio Systems*, 12, 273-82.
- Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B. & Steitz T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289, 920-30.
- Noller H.F. (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annual review of biochemistry*, 60, 191-227.
- O'Connor M., Thomas C.L., Zimmermann R.A. & Dahlberg A.E. (1997). Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA. *Nucleic acids research*, 25, 1185-93.
- Ofengand J. & Del Campo M. (2004). Modified Nucleosides of Escherichia coli Ribosomal RNA. *EcoSal Plus*, 1.
- Pan H., Ho J.D., Stroud R.M. & Finer-Moore J. (2007). The crystal structure of E. coli rRNA pseudouridine synthase RluE. *Journal of molecular biology*, 367, 1459-70.
- Paul B.J., Ross W., Gaal T. & Gourse R.L. (2004). rRNA Transcription In Escherichia coli. *Annu. Rev. Genet.* 2004. 38:749–70; doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091347.
- Petrov A.S., Bernier C.R., HersHKovits E., Xue Y., Waterbury C.C., Hsiao C., Stepanov V.G., Gaucher E.A., Grover M.A., Harvey S.C., Hud N.V., Wartell R.M., Fox G.E. & Williams L.D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2013, 1-14 doi:10.1093/nar/gkt513.
- Polikanov Y.S., Melnikov S.V., Soll D. & Steitz T.A. (2015). Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly. *Nature structural & molecular biology*, 22, 342-4.
- Punekar A.S., Shepherd T.R., Liljeruhm J., Forster A.C. & Selmer M. (2012). Crystal structure of RlmM, the 2'O-ribose methyltransferase for C2498 of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic acids research*, 40, 10507-20.
- Ramakrishnan V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108, 557-72.
- Samanta D., Mukhopadhyay D., Chowdhury S., Ghosh J., Pal S., Basu A., Bhattacharya A., Das A., Das D. & DasGupta C. (2008). Protein folding by domain V of Escherichia coli 23S rRNA: specificity of RNA-protein interactions. *Journal of bacteriology*, 190, 3344-52.
- Schwartz S., Bernstein D.A., Mumbach M.R., Jovanovic M., Herbst R.H., Leon-Ricardo B.X., Engreitz J.M., Guttman M., Satija R., Lander E.S., Fink G. & Regev A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 159, 148-62.
- Selmer M., Dunham C.M., Murphy F.V.t., Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A.C., Weir J.R. & Ramakrishnan V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 313, 1935-42.

- Sergiev P.V., Golovina A.Y., Sergeeva O.V., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Bogdanov A.A. & Dontsova O.A. (2012). How much can we learn about the function of bacterial rRNA modification by mining large-scale experimental datasets? *Nucleic acids research*, 40, 5694-705.
- Shi X., Khade P.K., Sanbonmatsu K.Y. & Joseph S. (2012). Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *Journal of molecular biology*, 419, 125-38.
- Shine J. & Dalgarno L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 1342-6.
- Siibak T., Peil L., Xiong L., Mankin A., Remme J. & Tenson T. (2009). Erythromycin- and chloramphenicol-induced ribosomal assembly defects are secondary effects of protein synthesis inhibition. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 563-71.
- Siibak T. & Remme J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *Rna*, 16, 2023-32.
- Stagg S.M., Mears J.A. & Harvey S.C. (2003). A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 328, 49-61.
- 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, 103-7.
- Stojkovic V., Noda-Garcia L., Tawfik D.S. & Fujimori D.G. (2016). Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme. *Nucleic acids research*, 44, 8897-8907.
- Strobel S.A. & Cochrane J.C. (2007). RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches. *Current opinion in chemical biology*, 11, 636-43.
- Sunita S., Zhenxing H., Swaathi J., Cygler M., Matte A. & Sivaraman J. (2006). Domain organization and crystal structure of the catalytic domain of E.coli RluF, a pseudouridine synthase that acts on 23S rRNA. *Journal of molecular biology*, 359, 998-1009.
- Zahn K.E., Averill A., Wallace S.S. & Doublié S. (2011). The miscoding potential of 5-hydroxycytosine arises due to template instability in the replicative polymerase active site. *Biochemistry*, 50, 10350-8.
- Zhang H., Gao Z.Q., Wei Y., Wang W.J., Liu G.F., Shtykova E.V., Xu J.H. & Dong Y.H. (2012). Structural insights into the function of 23S rRNA methyltransferase RlmG (m(2)G1835) from Escherichia coli. *Rna*, 18, 1500-9.
- Tan J., Jakob U. & Bardwell J.C. (2002). Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *Journal of bacteriology*, 184, 2692-8.
- 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*, 14, 98-106.
- 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, 5138-48.

- VanLoock M.S., Agrawal R.K., Gabashvili I.S., Qi L., Frank J. & Harvey S.C. (2000). Movement of the decoding region of the 16 S ribosomal RNA accompanies tRNA translocation. *Journal of molecular biology*, 304, 507-15.
- Widerak M., Kern R., Malki A. & Richarme G. (2005). U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy. *Gene*, 347, 109-14.
- Williamson J.R. (2003). After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *Rna*, 9, 165-7.
- Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons Jr. W.M., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonnrhein, C.; Hartschk T. & Ramakrishnan V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407(6802):327-39.
- Wittmann H.-G. (1976). Structure, Function and Evolution of Ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 61, 1 - 13 (1976).
- Yu F.T., Tanaka Y., Yamashita K., Suzuki T., Nakamura A., Hirano N., Suzuki T., Yao M. & Tanaka I. (2011). Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 19593-19598.
- Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H. & Noller H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292, 883-96.

6. Lisad

Lisa 1. PCR1&2 ja PCR3 tingimused

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg (sekundites)	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	98	30	1
Denaturatsioon	98	10	30
Praimerite seondumine	52	30	
Elongatsioon	72	60 (PCR3 puhul 90)	
Lõplik elongatsioon	72	300	1

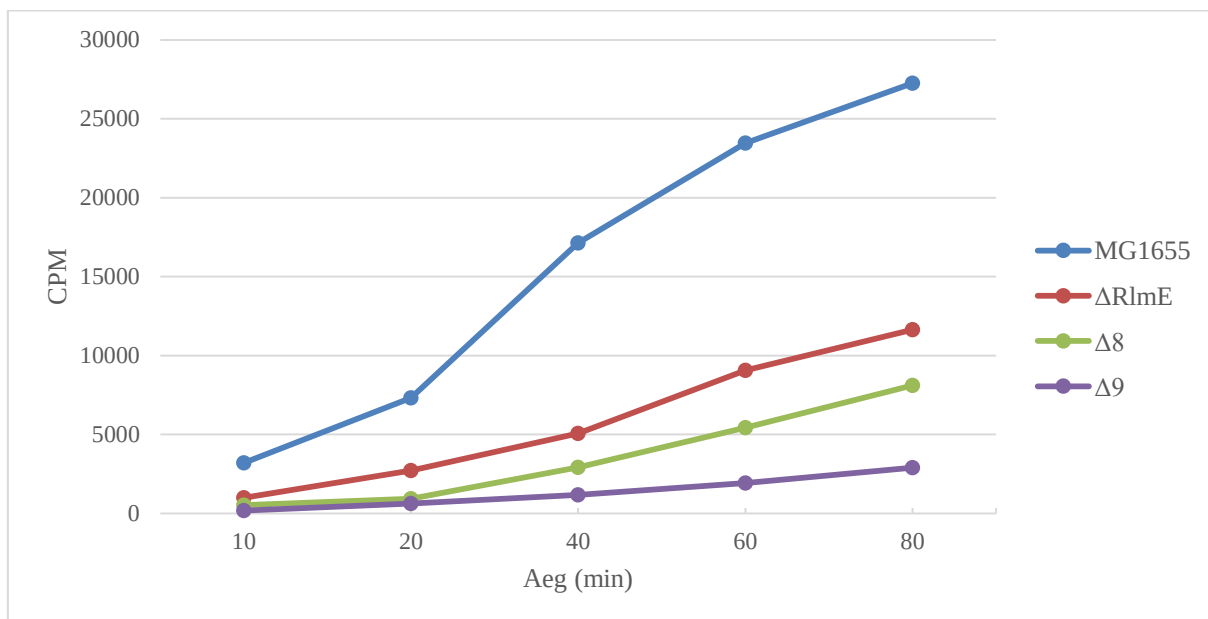
Lisa 2. Koloonia PCR-i reaktsioonisegu koostis.

Reaktsioonisegu	Maht (ühe reaktsiooni kohta)
10x PCR puhver	2,5µl
25mM MgCl ₂	2µl
10mM dNTP	0,5µl
Taq polümeraas (5U/µl)	1µl
Praimer (dir)	30pmol
Praimer (rev)	30pmol
mQ vesi	Kuni 15µl

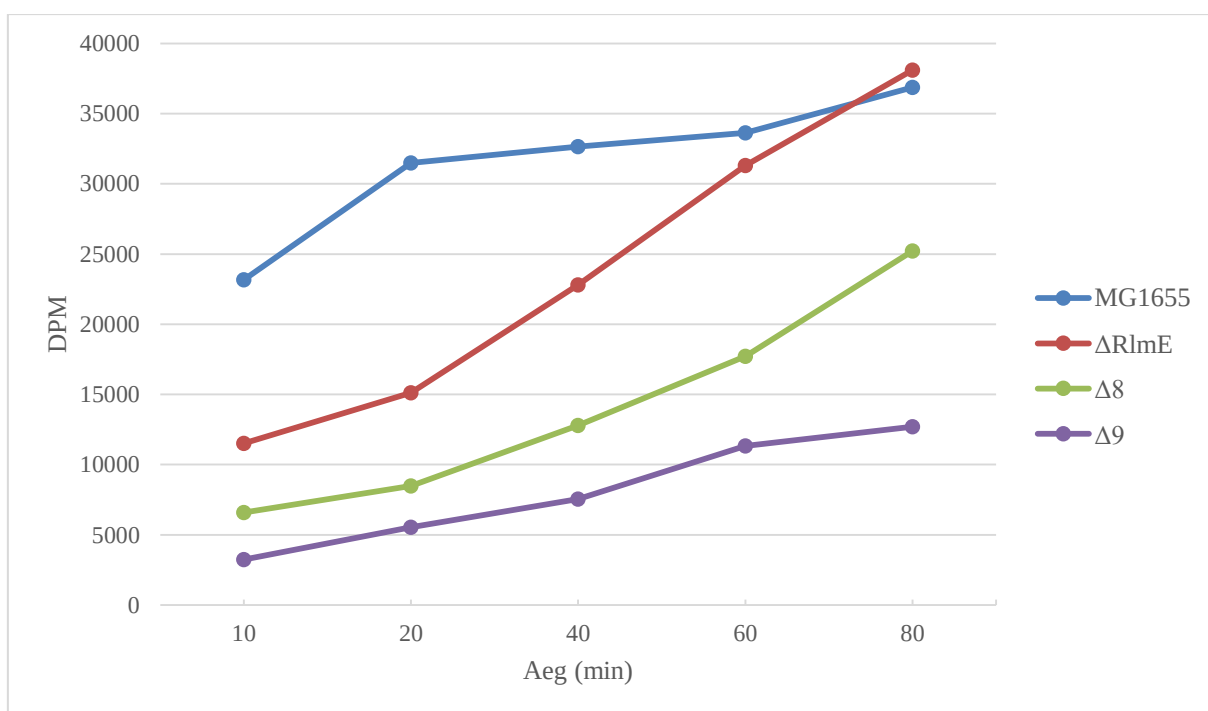
Lisa 3. Koloonia PCR-i tingimused

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg (sekundites)	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	94	180	1
Denaturatsioon	94	30	30
Praimerite seondumine	54	60	
Elongatsioon	72	90	
Lõplik elongatsioon	72	300	1

Lisa 4. Totaalne valgu biosüntees +37°C



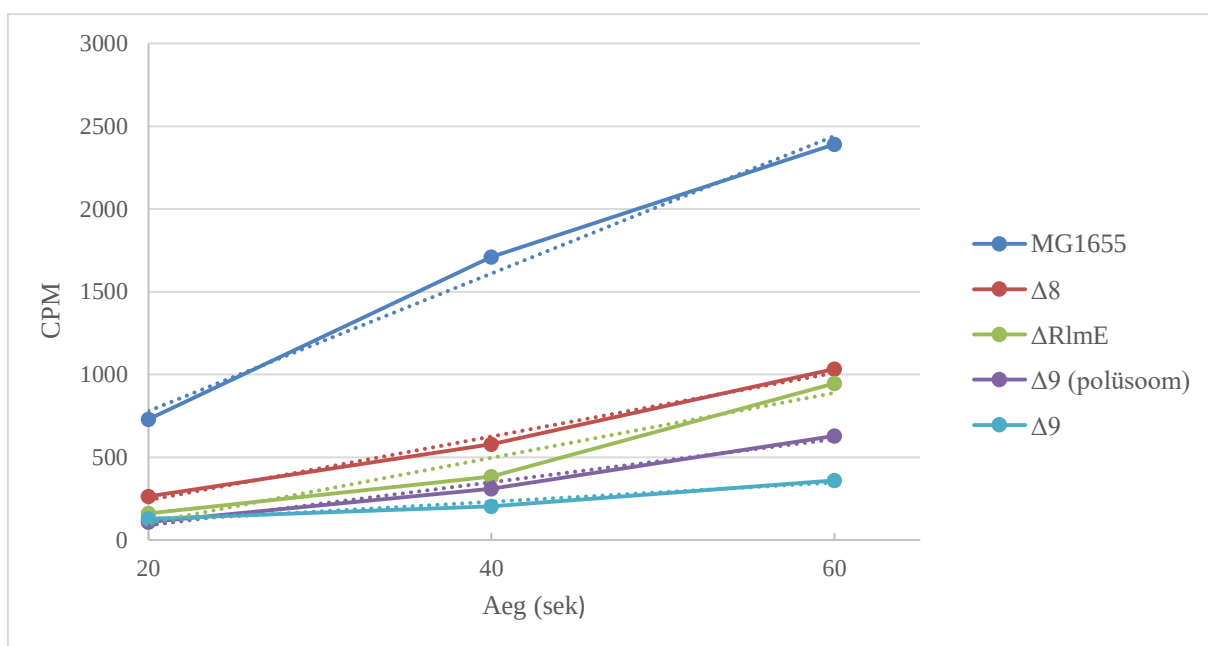
Lisa 5. Totaalne RNA süntees +37°C



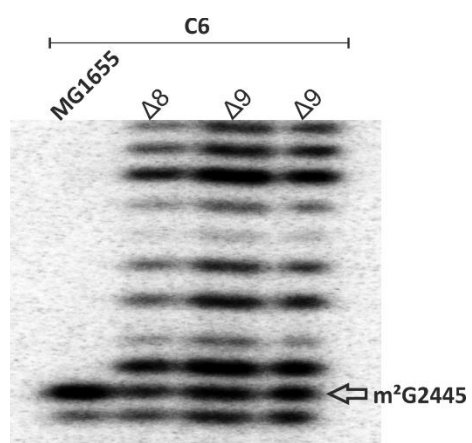
Lisa 6. Peptidüültransferaasne aktiivsus +37°C juures

	20 sek	40 sek	60 sek
MG1655 (1)	1341	3202	5339
ΔRlmE (1)	527	422	1476
Δ8 (1)	606	1732	2509
Δ9 (1)	435	329	1135
MG1655 (2)	246	475	625
ΔRlmE (2)	235	298	328
Δ8 (2)	130	141	190
Δ9 (2)	102	157	173

Lisa 7. Peptidüültransferaasne aktiivsus +37°C (MG1655, Δ RlmE, Δ 8, Δ 9 ja Δ 9 polüsoomidest dissotsieeritud 50S-iga)



Lisa 8. m²G määramine praimerekstensiooniga 23S rRNA praimeriga C6



Lihtlitsents lõputöö avaldamiseks

Mina, Birgit Marjak (28.07.1993),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „23S rRNA domeeni V modifikatsioonide tähtsus valgusünteesis“ mille juhendaja on PhD Margus Leppik,
 - 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 alates **31.05.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017