

HUGO TREFFNERI GÜMNAASIUM

TRIIN PAABO

# ***ESCHERICHIA COLI* RIBOSOOMI METÜÜLTRANSFERAASI RlmH KATALÜÜTILISTE AMINOHAPETE KINDLAKSMÄÄRAMINE**

JUHENDAJA: RYA ERO, MSC

## **SISSEJUHATUS**

Pärilik teave, mis on talletatud geenides, realiseerub valkude sünteesi kaudu. Valke sünteesivad kõigis elusorganismides molekulaarsed nanomasinad – ribosoomid. Ribosoomid koosnevad RNA-st ja valkudest. Ribosoomide RNA komponent (rRNA) erineb paljudest teistest RNA molekulidest, sisaldades lisaks tavalistele nukleotiididele hulgaliselt keemiliselt muudetud ehk modifitseeritud nukleotiide. Nimetatud modifitseeritud nukleotiidid paiknevad ribosoomi olulistes piirkondades, nad on evolutsiooniliselt konserveerunud ning nende sünteesiks kulutavad rakud palju ressursi. Kõik need omadused viitavad modifitseeritud nukleotiide tähtsusele raku elutegevuses. Vaatamata üle 50 aasta kestnud uurimustele ei ole teada paljude ribosoomi RNA modifikatsioonide täpne ülesanne ja sünteesimehhanism.

Soolekepikese (*Escherichia coli*) ribosoomi toimimiseks oluline heeliks 69 sisaldab kolme konserveerunud modifitseeritud nukleotiidi: kaht pseudouridiini positsioonides 1911 ja 1917 ning N3-metüleeritud pseudouridiini positsioonis 1915 (Kowalak jt 1996). Uuringud on näidanud, et heeliks 69 pseudouridiinidel on oluline roll ribosoomi ja seega kogu raku funktsioneerimisel (Liiv jt 2005), ent 1915. positsiooni pseudouridiini metüleerimise bioloogiline tähtsus ei ole teada. Kõik heeliks 69 pseudouridiinid sünteesib ensüüm RluD (Huang jt 1998), misjärel lisab ensüüm RlmH metüülrühma 1915. positsiooni pseudouridiini N3 aatomile (Ero jt 2008; Purta jt 2008). RlmH on teadaolevalt ainuke N3-pseudouridiin-metüültransferaas aktiivsust omav valk eluslooduses.

Töö eesmärgiks on välja selgitada, millised ensüümi RlmH aminohapped on määrava tähtsusega märklaudnukleotiidi äratundmisel ning metüülatsioonireaktsiooni katalüüsil. Potentsiaalsete katalüütiliste aminohapete valimisel lähtuti RlmH valgu kristallstruktuurist, aminohapete konserveerumisest ning sarnasusest transport-RNAd modifitseeriva ensüümiga

TrmD, mille struktuuri ja katalüüsimehhanismi on küllaltki täpselt kirjeldatud (Ahn jt 2003; Elkins jt 2003).

Soolekepikest on kasutatud mudelorganismina juba aastakümneid, uurimaks kogu eluslooduse ulatuses levinud molekulaarseid mehhanisme nagu ribosoomide süntees, translatsioon ja ensüümide katalüüsimehhanismid. Kuigi inimese ja bakteri ribosoomide vahel on palju erinevusi, on siiski mõlemale omane sarnaste modifitseeritud nukleotiidide esinemine rRNA-s. Selle tõttu võib bakteri RNA modifikatsioonienzymide reaktsioonimehhanismide kirjeldamine aidata mõista geneetiliste haiguste nagu Bowen-Conradi sündroomi molekulaarseid tagamaid ning olla aluseks näiteks uue põlvkonna antibiootikumide väljatöötamisel.

### KASUTATUD LÜHENDID

Å – ångström, pikkusühik,  $1 \text{ Å} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$

Ala, A –alaniin

Arg, R – arginiin

Asp, D – asparagiinhape

Da – dalton, aatommassiühik,  $1 \text{ Da} = 1.66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$

DNA – desoksüribonukleiinhape

dNTP – desoksünukleotiid-trifosfaatide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) segu

DTT – *dithiothreitol* – ditiotreitol

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* – etüleendiamiintetraetaanhape

Glu, E – glutamiinhape

Gly, G – glütsiin

GuCN – guanidiintsüanaat

HCC – *hexamminecobalt(III) chloride* – koobalt(III)heksamiinkloriid

Leu, L – leutsiin

Lys, K – lüsiin

mQ – MilliQ – firma Millipore seadmega puhastatud ja deioniseeritud vesi

mRNA – *messenger* ribonukleiinhape

OD – *optical density* – optiline tihedus

PCR – *polymerase chain reaction* – polümeraasahelreaktsioon

RlmH – *ribosomal large subunit methyltransferase H* – ribosoomi suure subühiku metüültransferaas H

RluD – *ribosomal large subunit pseudouridine synthase D* – ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas D

RNA – ribonukleiinhape

rRNA – ribosoomi ribonukleiinhape

RT – *reverse transcriptase* – pöördtranskriptaas

SAM - S-adenosüül-L-metioniin

SDS – *sodium dodecyl sulfate* – naatriumdodetsüülsulfaat

Tris – tris(hüdroksümetüül)aminometaan

tRNA – transpordi ribonukleiinhape

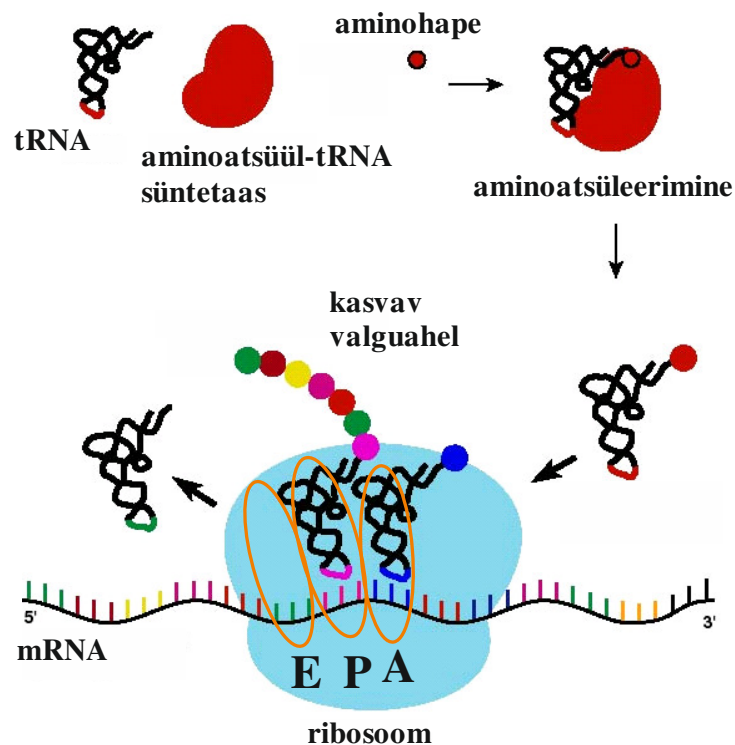
Tyr, Y – türosiin

Ψ – pseudouridiin

## **1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE**

### **1.1. GENEETILISE INFORMATSIOONI TRANSLEERIMINE**

Ribosoom on raku suurim ning keerukaim RNA-valgu kompleks. Kasutades genoomse DNA järjestuse alusel transkribeeritud mRNA ning tRNA molekule, vastutab ribosoom nukleiinhappelise järjestuse kujul säilitatud geneetilise informatsiooni translatsiooni ehk tõlkimise eest valkude aminohappeliseks järjestuseks. *Messenger* RNA (mRNA) määrab sünteesitava valgu järjestuse, transpordi RNA (tRNA) vastutab aminohappe kohaletoimetamise eest. Geneetilise informatsiooni tõlkimine toimub geneetilise koodi vahendusel (Joonis 1).



**Joonis 1. Geneetilise informatsiooni transleerimine.** tRNA antikoodon ning sellele vastav aminoatsüül-tRNA süntetaas, aminohape ja mRNA koodon on tähistatud sama värviga. Oranžig joonega on ümbritsetud aminoatsüül-tRNA (A), peptidüül-tRNA (P) ning deatsüleeritud tRNA (E) seondumissaidid ribosoomil (helesinine) (autori joonis).

mRNA koodonile vastava antikoodoniga tRNA kannab 3' otsas just sellele antikoodonile vastavat aminohapet (ülevaade Wilson ja Nierhaus 2003). tRNA aminoatsüleerimise ehk õige aminohappe liitmise eest vastutavad aminoatsüül-tRNA süntetaasid. Kokku on rakkudes 20 erinevat aminoatsüül-tRNA süntetaasi – iga kodeeritava aminohappe kohta üks, mis tunneb ära konkreetsele aminohappele vastavate antikoodonitega tRNA molekulid (ülevaade Ibba ja Söll 2000). Ribosoomi ülesandeks on tagada korrektne ühildumine mRNA koodonite ja tRNA antikoodonite vahel ning sünteesida aminohapetevaheline peptiidside (ülevaade Wilson ja Nierhaus 2003).

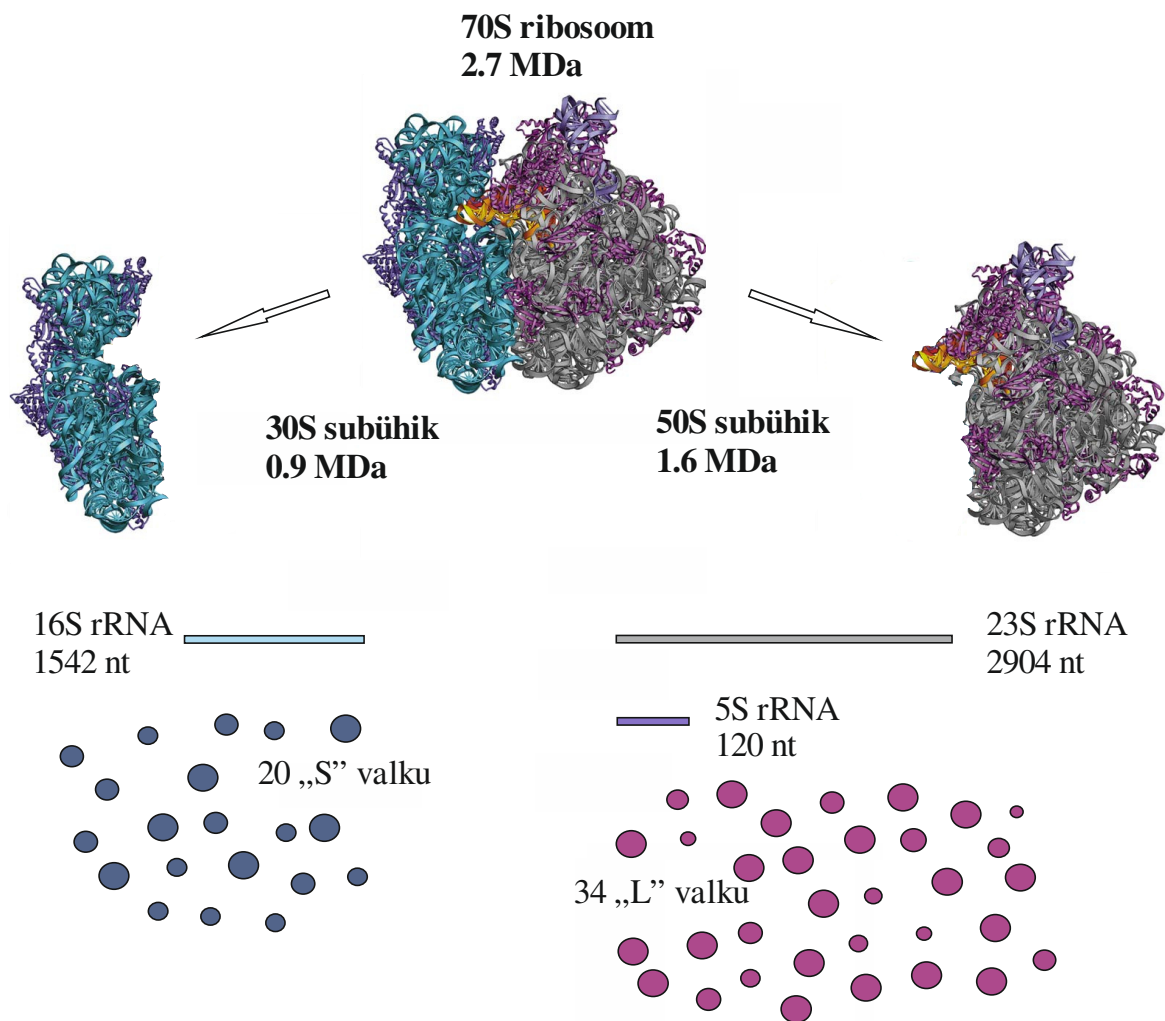
## 1.2. BAKTERI RIBOSOOMI STRUKTUUR

Kõik ribosoomid koosnevad kahest ebavõrdse suurusega subühikust, kusjuures väiksem subühik moodustab umbes poole suurema massist (ülevaade Moore ja Steitz 2003). Bakterite ribosoom sedimenteerub 70S (Svedberg'i ühikutes) partiklina, mille tõttu kutsutakse seda 70S ribosoomiks. Väiksemat subühikut nimetatakse vastavalt 30S ning suuremat subühikut 50S subühikuks (Joonis 2).

Kõige paremini on ribosoomi struktuur kirjeldatud soolestiku mikrofloorasse kuuluvas bakteris soolekepikeses, mis on tuntud ka *Escherichia coli* nime all. *E. coli* on Gram-negatiivne bakter, mis tänu oma lühikesele poolestusajale ja laboritingimustes hõlpsasti kasvatatavusele ning geneetilisele manipuleeritavusele on olnud molekulaarbioloogiliste uuringute mudelorganismiks juba pea 70 aastat (Alberts jt 2002; Watson jt 2004).

*E. coli* ribosoom, molekulmassiga enam kui 2,5 miljonit Da, koosneb kolmest ribosomaalsest RNA molekulist (16S rRNA väikses ning 23S ja 5S rRNA suures subühikus) ning valkudest, mida kutsutakse vastavalt nende paiknemisele subühikutes „S“- ja „L“-valkudeks (Joonis 2). Umbes kaks kolmandikku ribosoomi massist moodustavad rRNA-d ja ühe kolmandiku valgud (ülevaated Wilson ja Nierhaus 2003; Moore ja Steitz 2003).

Ribosoomi subühikute vahel on eristatavad kolm peamist tRNA seondumiskohta ehk saiti (Joonised 1 ja 2) (Yusupov jt 2001). A-saidis tunneb aminohapet kandva aminoatsüül-tRNA molekuli antikoodon ära komplementaarse koodoni mRNA-s. P-saidis paikneb kasvavat valgumolekuli kandev peptidüül-tRNA enne peptiidsideme moodustamist. E-saidis asub valguahelast vabanenud deatsüleeritud-tRNA enne ribosoomist väljumist. Dekodeerivas tsentris toimuva mRNA sidumise ja mRNA-tRNA paardumise eest vastutab peamiselt ribosoomi väiksem subühik. Seevastu leiab peptiidsideme süntees aminohapete vahel aset suuremal subühikul paiknevas peptidüültransferaasi tsentris ning reaktsiooni läbiviimise eest vastutab 23S rRNA (ülevaade Moore ja Steitz 2003). Seega on ribosoomi puhul tegu ribosüümi, mitte ensüümiga – katalüütilist rolli omab RNA, mitte valgud, mis paiknevad enamasti ribosoomi äärmistes osades. Peptidüültransferaasi tsentrist saab alguse väljuva valguahela tunnel, mis viib 50S subühiku vastasküljele. Tunneli pikkus on umbes 100 Å ja läbimõõt umbes 20 Å, mahutades 30–50 aminohappejäägist koosnevat polüpeptiidiahelat. Oletatakse, et tunneli ülesandeks on kaitsta kasvavat valgumolekuli proteaaside eest ning pakkuda sobivat keskkonda valgu kokkupakkimiseks (ülevaade Wilson ja Nierhaus 2003).

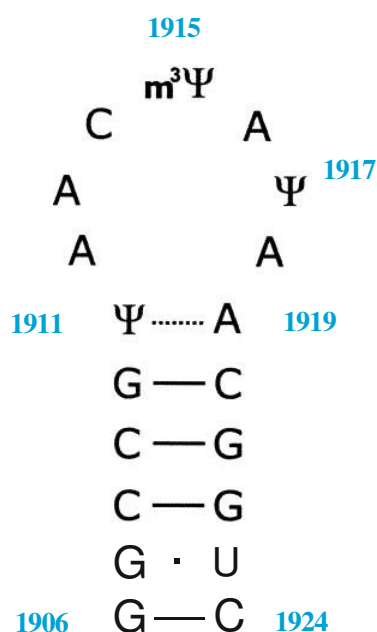


**Joonis 2. Bakteri ribosoomi struktuur.** Bakteriaalne 70S ribosoom koosneb 50S ja 30S subühikust. Suurema subühiku moodustavad 2904 nukleotiidi pikkune 23S rRNA, 120 nukleotiidist koosnev 5S rRNA ning 34 „L” valku. Väiksemas subühikus on 1542 nukleotiidi pikkune 16S rRNA ning 20 „S” valku. Joonisel (muudetud kujul artiklist Yusupov jt 2001) on tähistatud halli ja sinakaslillaga vastavalt 50S subühiku 23 rRNA ja 5 rRNA; „L” valgud on roosakaslillad. 30S subühiku 16S rRNA on türkiissinine ning „S” valgud meresinised. Kollase ja punasega on tähistatud vastavalt A- ja P-saidis paiknevad tRNA molekulid.

50S ja 30S subühikuid hoiavad koos kolme tüüpi subühikutevahelisi sildu (Yusupov jt 2001; Gao jt 2003). Tuvastatud on viis RNA-RNA, kuus RNA-valk ning üks valk-valk sild. RNA-RNA ühendused paiknevad peamiselt ribosoomi keskses osas, samas kui valgulise koostisega sillad on eemal ribosoomi funktsionaalsetest osadest (Yusupov jt 2001). Gao jt (2003) on näidanud, et valk-valk sild liigub translatsiooni käigus ulatuslikult, RNA-RNA sillad on aga küllaltki püsivad.

### 1.2.1. Heeliks 69

Töö seisukohast on oluline ribosoomi suure subühiku heeliks 69. Heeliks 69 on kõrgelt konserveerunud heeliks-ling, mis asub 50S subühiku 23S rRNA neljandas domäänis (kokku on kuus domääni) (Yusupov jt 2001; Hirabayashi jt 2006). Heeliks 69 koosneb 19 nukleotiidist (positsioonid 1906–1924), millest kaksteist (1906–1911 ning 1919–1924) moodustavad 6-aluspaarilise heeliksi ning ülejäänud seitse (1912–1918) selle tipus oleva ligu (Joonis 3). Heeliks 69 sisaldab 3 konserveerunud modifitseeritud nukleotiidi: pseudouridiini positsioonides 1911 ja 1917 ning metüleeritud pseudouridiini positsioonis 1915 (Kowalak et al 1996). Modifitseeritud nukleotiide käsitletakse põhjalikumalt järgnevas peatükis.



**Joonis 3. Heeliks 69 järjestus ja sekundaarstruktuur.** Heeliks 69 sisaldab kolme modifitseeritud nukleotiidi: kahte pseudouridiini (Ψ) ning ühte metüleeritud pseudouridiini (m<sup>3</sup>Ψ). Joonisel (muudetud kujul artiklist Ero jt 2008) on sinisega näidatud nukleotiidide numeratsioon *E. coli* 23S rRNA-s.

Ribosoomi kristallstruktuuri uuringud on näidanud, et heeliks 69 paikneb subühikute vahel. Ulatudes välja 50S subühikust ning seondudes 30S subühiku 16S rRNA heeliks 44-ga, moodustab heeliks 69 olulise subühikutevahelise silla B2a. Märkimisväärne on ka heeliks 69 seondumine väikse subühiku regiooniga, mis vastutab koodon-antikoodon paardumise eest. Lisaks interakteerub heeliks 69 translatsiooniprotsessi erinevate etappide jooksul nii translatsioonifaktorite (valgud, mis aitavad translatsiooni läbi viia) kui tRNA-dega (Yusupov et al 2001). Mitmed uuringud on näidanud, et heeliks 69 on oluline ribosoomide

moodustumiseks ja funktsioneerimiseks rakus, seega on tegu äärmiselt tähtsa ribosoomi elemendiga (Maiväli ja Remme 2004; Liiv jt 2005; Hirabayashi jt 2006).

### 1.3. RNA MODIFITSEERITUD NUKLEOTIIDID

1948. aastal ilmusid esimesed teated võimalikest DNA nukleotiidide modifitseerimisest ning 1956. aastal tuvastati esimese RNA nukleotiidi modifikatsioonina tRNA-s asuv 5-ribosüüluratsiil: uridiini isomeer, mida tuntakse ka kui viiendat nukleotiidi ehk pseudouridiini. Tänapäevaks on tuvastatud üle 100 erineva RNA modifikatsiooni. Lisaks pseudouridiinidele esineb RNA-s sagedasti ka lämmastikalusete ja riboosi metüleerimist. Harvemini esineb aminogruppide lisamist või eemaldamist, hapniku asendamist väävliga, vesiniksidemete küllastamist jne. Kirjeldatud on ka hüpermodifitseerimist, mille käigus on ühes nukleotiidis toimunud kaks või enam muutust (ülevaade Grosjean 2005). RNA modifikatsioonid esinevad kõikides organismides ning mitmetes RNA liikides, lisaks tRNA-le ja rRNA-le on modifikatsioone kirjeldatud ka mRNA-des (*messenger* RNA) ja snRNA-des (väikesed tuuma RNA-d) (Limbach jt 1994; RNA modifikatsioonide andmebaas Modomics).

Modifitseeritud nukleotiidid stabiliseerivad RNA molekulide ruumilist struktuuri ning mõjutavad RNA-de interaktsioone teiste molekulidega, sealhulgas translatsioonil osalevate valkudega ja translatsiooni inhibeerivate antibiootikumidega. Kõige rohkem on teada modifitseeritud nukleotiidide ülesannete kohta tRNA-s. Modifitseeritud nukleotiidid tRNA-s vahendavad tRNA-de äratundmist aminoatsüül-tRNA süntetaaside poolt, osalevad koodon-antikoodon äratundmisel ribosoomi dekodeerivas tsentris ning aitavad tagada translatsiooni täpsuse (ülevaade Lapeyre 2005). Seega on modifitseeritud nukleotiidid vajalikud geneetilise info realiseerimiseks. Ribosomaalse RNA modifitseeritud nukleotiidide rolli käsitletakse töö järgmistes osades.

RNA modifitseerimine toimub post-transkriptsiooniliselt: modifikatsioonid lisatakse pärast RNA ahela sünteesimist neljast standardsest nukleotiidist. Modifitseerimist viivad bakteris läbi RNA positsiooni ja modifikatsiooni tüübi spetsiifilised ensüümid, kasutades signaalina moditseeritava nukleotiidi konteksti RNA-d (Ofengand ja Del Campo 2006). Lisaks paljude modifikatsiooniensüümide geenide identifitseerimisele on iseloomustatud ka mitmete modifikatsiooniensüümide poolt läbiviidavaid reaktsioone (ülevaade Grosjean 2005). Viimasel kümnendil avaldatud RNA modifikatsiooniensüümide kristallstruktuurid võimaldavad modifikatsioonireaktsioonide detailset kirjeldamist, aidates mõista rakkudes toimuvaid protsesse ning nende tähtsust organismi funktsioneerimises (ülevaade Grosjean 2005).



#### 1.4. RIBOSOMAALSE RNA MODIFITSEERIMINE

*Escherichia coli* ribosoomides on kirjeldatud 36 rRNA modifikatsiooni: 11 modifikatsiooni 16S rRNA-s (1 pseudouridiin ja 10 metüleeritud nukleotiidi) ning 25 modifikatsiooni 23S rRNA-s (9 pseudouridiini, 13 metüleeritud nukleotiidi, 1 metüleeritud pseudouridiin, 1 dihüdrouridiin ning 1 teadmata C-modifikatsioon) (Tabel 1) (Ofengand ja Del Campo 2006; RNA modifikatsioonide andmebaas Modomics). Kõikide pseudouridiinide sünteesimise eest vastutavate ensüümide geenid on tuvastatud, ent kolme rRNA metülatsiooni eest vastutava ensüümi geenid ei ole veel teada (Tabel 1).

Summaarselt on eukarüootide rRNA-des modifikatsioone rohkem kui prokarüootide rRNA-des, ent modifikatsioonide varieeruvus on suurem prokarüootide rRNA-des. Kui lämmastikaluste metülatsioonide arv organismi keerukuse kasvades väheneb, siis riboosi 2'-O metülatsioonide ning pseudouridiinide arv kasvab (Tabel 2) (Ofengand jt 2001). rRNA üldine modifikatsioonimuster ning mitmed individuaalsed modifikatsioonid on liigiti konserveerunud. Modifitseeritud nukleotiidid paiknevad funktsionaalselt olulistes ribosoomi piirkondades: väikese subühiku dekodeeriva tsentri ning suure subühiku peptidüültransferaasi tsentri vahetus läheduses (Joonis 4) (Wilson ja Nierhaus, 2007).

**Tabel 1. Modifitseeritud nukleotiidid *Escherichia coli* rRNA-s** (ülevaade Kaczanowska ja Rydén-Aulin 2007; Wilson ja Nierhaus 2007).

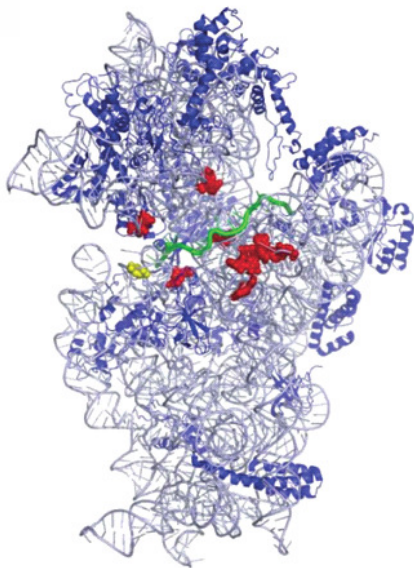
Modifikatsiooni positsioon	Modifikatsiooni tüüp	Modifitkatsiooniensüüm
<b>16S rRNA</b>		
516	Ψ	RsuA
527	m <sup>7</sup> G	RsmG
966	m <sup>2</sup> G	RsmD
967	m <sup>5</sup> C	RsmB
1207	m <sup>2</sup> G	RsmC
1402	m <sup>4</sup> Cm	RsmH, RsmI
1407	m <sup>5</sup> C	RsmF
1498	m <sup>3</sup> U	RsmE
1516	m <sup>2</sup> G	RsmJ (geen teadmata)
1518	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	RsmA (tuntud kui KsgA)
1519	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	RsmA (tuntud kui KsgA)
<b>23S rRNA</b>		
745	m <sup>1</sup> G	RlmA
746	Ψ	RluA
747	m <sup>5</sup> U	RlmC
955	Ψ	RluC
1618	m <sup>6</sup> A	RlmF
1835	m <sup>2</sup> G	RlmG

1911	Ψ	RluD
1915	m <sup>5</sup> Ψ	RluD, RlmH
1917	Ψ	RluD
1939	m <sup>5</sup> U	RlmD
1962	m <sup>5</sup> C	RlmI
2030	m <sup>6</sup> A	RlmJ (geen teadmata)
2069	m <sup>7</sup> G	RlmK (geen teadmata)
2251	Gm	RlmB
2445	m <sup>2</sup> G	RlmL
2449	D	RldA (geen teadmata)
2457	Ψ	RluE
2498	Cm	RlmM
2501	C modifik.	RltA (geen teadmata)
2503	m <sup>2</sup> A	RlmN
2504	Ψ	RluC
2552	Um	RlmE
2580	Ψ	RluC
2604	Ψ	RluF
2605	Ψ	RluB

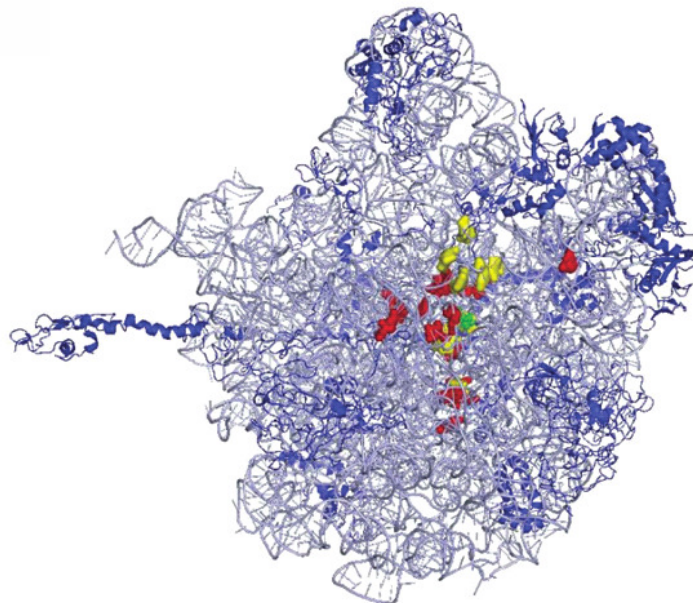
**Tabel 2. Modifikatsioonide arv erinevate organismide rRNA-s.** Tabel kohandatuna artiklist Ofengand jt 2001.

Organism	Lämmastikaluse metülatsioonid	Riboosi 2'-O metülatsioonid	Ψ ja selle metülatsioonid
<i>Escherichia coli</i> (bakter)	21	4	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (pärm)	9	56	48
<i>Xenopus laevis</i> (kahepaikne)	9	95-97	~ 96
<i>Homo sapiens</i> (inimene)	9	103-105	~ 91

## väike subühik



## suur subühik

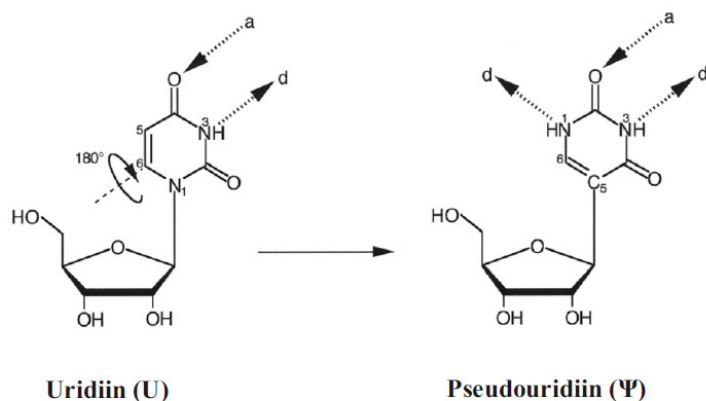


**Joonis 4. Modifitseeritud nukleotiidide paiknemine *E. coli* ribosoomis.** Näidatud on väike ja suur subühik vaadatuna subühikute vahelise seondumise poolt. Halliga on näidatud rRNA ning tumesinisega ribosoomi valgud. Punasega on tähistatud metüleeritud nukleotiidid, kollasega pseudouridiinid. Rohelisega on märgitud väikese subühiku dekodeerivasse tsesentrisse seonduv mRNA ja suure subühiku peptitüültransferaasi tsesentrisse seondunud antibiootikum klooramfenikool (joonis muudetud kujul artiklist Wilson ja Nierhaus, 2007).

### 1.4.1. Pseudouridiinid

Pseudouridiin (5-ribosüül uratsiil,  $\Psi$ ) on ribosomaalse RNA-s enam levinud modifitseeritud nukleotiid (Tabel 1). Pseudouridiini sünteesi käigus toimub uridiini N1-glükosiidsideme ensümaatiline lõikamine, uratsiilringi pööramine  $180^\circ$  ümber oma telje, ning uue glükosiidsideme moodustamine uratsiili C5-ga (Ofengand jt 2001) (Joonis 5).

Kuigi mitmed pseudouridiinide esinemiskohad rRNA-s on kõrgelt konserveerunud ning nad paiknevad klastritena rRNA funktsionaalselt tähtsates piirkondades, ei ole pseudouridiinide bioloogilist rolli veel täielikult mõistetud (ülevaade Hamma jt 2006). Kuna pseudouridiin saab võrreldes uridiiniga moodustada ühe vesiniksideme lisaks (Joonis 5), võib selle modifikatsiooni ülesandeks olla RNA molekuli struktuuri stabiliseerimine, tugevdades molekulisisesid RNA-RNA kontakte või parandades rRNA interaktsiooni valkudega (Ofengand jt 2001). Pseudouridiinide tähtsusele viitab ka nende arvu suurenemine vastavalt organismi keerukuse astmele (Tabel 2).



**Joonis 5. Uridiini isomeriseerimine pseudouridiiniks.** Näidatud on uratsiilringi pööramistelg ning lämmastikaluse positsioonid, mis saavad osaleda vesiniksideme moodustamisel: „a“ on vesiniksideme aktseptor ning „d“ vesiniksideme doonor (joonis muudetud kujul artiklist Hamma jt 2006).

Uridiini isomeriseerimist pseudouridiiniks viivad läbi post-transkriptsioonilised ensüümid – pseudouridiinide süntaasid. Kuna pseudouridiini moodustumine on energeetiliselt soodne protsess, ei ole reaktsiooni toimumiseks vaja lisaenergiat ega kofaktoreid (Ofengand jt 2001). Aminohappelise järjestuse alusel jaotatakse *E. coli* 11 pseudouridiinide süntaasi viide perekonda: RluA, RsuA, TruA, TruB ning TruD (ülevaade Hamma jt 2006). Ensüümide kristallstruktuuriuuringud on näidanud, et erinevused perekondade vahel on väikesed ning kõikide katalüütiliseks aminohappeks on asparagiinhape (ülevaade Hamma jt 2006). Märkimisväärne on ensüümide spetsiifilisus substraadi suhtes. Iga pseudouridiini moodustumisel osaleb vaid üks kindel ensüüm, ent mõnel juhul võib üks süntaas katalüüsida mitme erineva uridiini isomeriseerimist: nii RluD kui ka RluC osalevad kolme pseudouridiini tekkel rRNA-s (Tabel 1) (Ofengand jt 2001). RluA on aga ainuke teadaolev näide pseudouridiini süntaasist, mis tunneb ära kaht erinevat substraati, modifitseerides 23S rRNA positsioonis 746 olevale uridiinile lisaks ka uridiini tRNA positsioonis 32 (Ofengand jt 2001).

### 1.4.2. RluD

*E. coli* RluD on RluA perekonda kuuluv pseudouridiinsüntaas, mis katalüüsib 23S rRNA heeliks 69 positsioonides 1911, 1915 ning 1917 asuvate uridiinide isomeriseerimist pseudouridiinideks (Joonis 3). RluD eelistab substraadina ribosoomi 50S subühikuid, modifitseerides valguvaba 23S rRNA-d ebatäpselt (Vaidyanathan jt 2007). On teada, et heeliks 69-s asuvad pseudouridiinid on väga kõrgelt konserveerunud, esinedes kõikide seni uuritud organismide ribosoomides (Raychaudhuri jt 1998). Kuna heeliks 69 seondub

translatsioonifaktorite ja tRNA-ga, võib oletada, et konserveerunud pseudouridiinid on vajalikud efektiivseks valgusünteesiks (Gutgesell jt 2005).

Gutgesell jt näitasid, et kas RluD valk ise või modifikatsioonid  $\Psi$ 1911,  $\Psi$ 1915 ja  $\Psi$ 1917 on vajalikud ribosoomi normaalseks moodustumiseks ja funktsioneerimiseks (Gutgesell jt 2005). *rluD* geeni deletsioonil aeglustus bakterirakkude pooldumine ning ilmnesid häired ribosoomi subühikute moodustumises (Gutgesell jt 2005). Kuigi heeliks 69 ja selles esinevad pseudouridiinid on tähtsad ribosoomide stabiilsuseks *in vivo* (Gutgesell jt 2005), on näidatud, et ilma heeliks 69-ribosoomid suudavad läbi viia *in vitro* valgusünteesi (Ali jt 2006). Välja on pakutud, et RluD ja heeliks 69 pseudouridiinid osalevad ribosoomide kvaliteedikontrollis (Vaidyanathan jt 2007). Lisaks on arvatud, et RluD võib olla sarnaselt RluA perekonna teiste liikmetega ka ribosoomide assambleerumiskompleksi, osaledes suure subühiku kokkupaneku hiliste etappides (Vaidyanathan jt 2007).

### 1.4.3. Metülatsioonid

Metülatsioonid ehk metüülrühma lisamised on pseudouridiinide kõrval levinuimad post-transkriptsioonilised modifikatsioonid RNA-s (Ofengand ja Del Campo 2006). RNA puhul on kirjeldatud nii lämmastikaluste erinevate positsioonide kui ka riboosi 2' OH-rühma metüleerimisi. Ülekantav metüülrühm on üldiselt pärit kofaktorilt S-adenosüül-L-metioniini (Joonis 6).

Nukleotiidi metüleerimise efekt vastandub pseudouridiinide moodustumise efektile: kui pseudouridiinidel on võrreldes uridiinidega lisandunud üks vesiniksideme moodustamise võimalus, siis metüleerimise käigus muudetakse lämmastikalus hoopis hüdrofoobsemaks. Kirjeldatud muutus võib takistada lämmastikaluse elektrostaatilisi interaktsioone, näiteks paardumist komplementaarse nukleotiidiga, kui metülatsioon on toimunud ühes Watson-Crick positsioonis. Lämmastikaluse metüleerimine võib mõjutada ka erinevate ligandide, sh translatsioonifaktorite ja antibiootikumide seondumist RNA-ga. Näiteks takistab *E. coli* 16S rRNA positsioonidel 1518 ja 1519 olevate adenosiinide topeltmetülatsioon (moodustub  $m^6_2A1518$  ja  $m^6_2A1519$ , Tabel 1) antibiootikumi kasutamise seondumist ribosoomidega ning muudab bakterid resistentseks kasutamisele. Hüdrofoobse „raja“ loomine on oluline ka väljuva valguhela tunnelis, mille moodustamises osalevad mitmed metüleeritud riboosiga nukleotiidid, takistades kasvava polüpeptiidiahela interaktsiooni tunneli seinaga (Laypere, 2005).

Enamik nukleiinhappeid metüleerivatest ensüümidest ehk metüültransferaasidest (kutsutakse ka metülaasideks) kuuluvad *Rossmann-fold* ensüümide superklassi. *Rossmann-fold*

ensüümide katalüütilised domäänid sisaldavad *Rossmann* motiivi – piirkonda, mis koosneb kuuest paralleelsest beeta-struktuurist ja neid ühendavast kahest alfa-heeliksi paarist ning mille abil toimub valgu seondumine nukleotiidiga. (Ofengand ja Del Campo 2006). rRNA metüültransferaasid RlmH, RsmE ja RlmB kuuluvad aga intrigeeriva struktuuriga SPOUT ensüümide superklassi (Tkaczuk jt 2007).

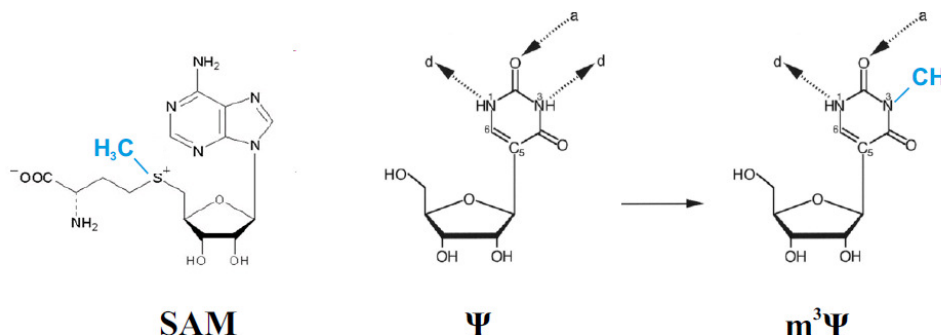
SPOUT (saanud nime esimeste esindajate SpoU ja TrmD järgi) metüültransferaasidele on iseloomulik sõlme esinemine valguahelas ning valkude esinemine dimeeridena, kusjuures aktiivsaite paikneb valgu monomeeride vahel ning selle moodustumisel on oluline roll mõlema monomeeri aminohapetel (Tkaczuk jt 2007). Kirjeldatud on nii üksteisega risti kui ka antiparalleelselt piknevate monomeeridega SPOUT metüültransferaase (Tkaczuk jt 2007).

#### 1.4.4. RlmH

*E. coli* RlmH on SPOUT metüültransferaaside superklassi kuuluv ensüüm, mis katalüüsib metüülühema ülekannet kofaktorilt S-adenosüül-L-metioniinilt 23S rRNA 1915. positsioonis paikneva pseudouridiini N3 aatomile, põhjustades modifikatsiooni m<sup>3</sup>Ψ1915 (Joonis 6) (Ero jt 2008; Purta jt 2008). Kuigi nii pseudouridiinid kui ka erinevad metüülatsioonid on rRNA-des ja tRNA-des levinud modifikatsioonid, siis 23S rRNA m<sup>3</sup>Ψ1915 on ainus teadaolev metüüleeritud pseudouridiin bakteris ning ainus teadaolev pseudouridiini 3. positsiooni lämmastiku metüülatsioon terves eluslooduses (Kowalak jt 1996; Ero jt 2008). Seetõttu on RlmH ensüümi poolt läbiviidav reaktsioon unikaalne ja huvipakkuv.

RlmH metüüleerib eelistatult pseudouridiini, 23S rRNA 1915. positsioonis paikneva uridiini metüüleerimine on märgatavalt vähem efektiivne (Ero jt 2010). Sellest järelduvalt peab metüüleerimisele eelnema uridiini isomeriseerimine RluD poolt, mis leiab aset ribosoomi 50S subühiku moodustumise hilises etapis, ent enne 70S ribosoomi moodustumist (Leppik jt 2007). See tähendab omakorda, et RlmH poolt katalüüsitud reaktsioon leiab aset veelgi hilisemas ribosoomide sünteesimise etapis. Selgus, et RlmH metüüleerib Ψ1915 70S ribosoomides, ent mitte 50S subühikutes. Seni ei ole ühegi teise *E. coli* modifikatsiooniensüümi korral kirjeldatud spetsiifilisust 70S ribosoomide suhtes, seega on RlmH poolt sünteesitud modifikatsioon tõenäoliselt viimane, mis rRNA-dele lisatakse. 70S ribosoomides paikneb heeliks 69 subühikute vahel, tRNA seonumissaitide ja peptidüültransferaasi tsentri lähedal. Seetõttu tuleb RlmH valgul pseudouridiini metüüleerimiseks seonduda oma substraadiga ribosoomi subühikute vahel. Purta jt modelleerisid 70S ribosoomi subühikute vahele seondunud RlmH dimeeri, mis ei takista

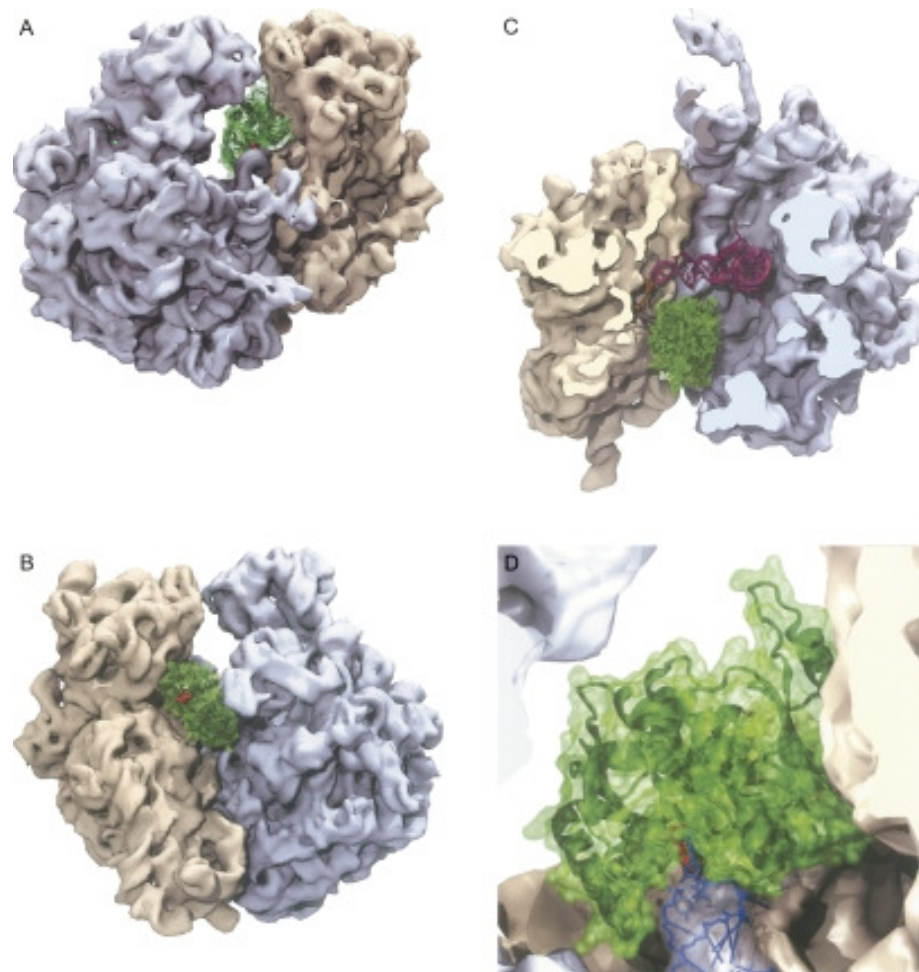
tRNA seondumist P-saiti, ning ennustasid RlmH valgu kontakte mõlema subühikuga (Joonis 7) (Purta jt 2008).



**Joonis 6. Pseudouridiini 3. positsiooni lämmastiku metüleerimine.** Metüülrühma doonoriks on SAM(S-adenosüül-L-metioniin). Sinisega on tähistatud ülekantav metüülrühm SAM-i ja metüleeritud pseudouridiini ( $m^3\Psi$ ) koostises. Näidatud on lämmastikaluse positsioonid, mis saavad osaleda vesiniksideme moodustamisel: „a“ on vesiniksideme aktseptor ning „d“ vesiniksideme doonor (autori joonis).

70S ribosoom moodustub alles valgusünteesi initsatsiooni käigus (Ero jt 2008; Purta jt 2008; Ero jt 2010). Seega on võimalik, et ribosoomid saavad lõplikult valmis (st sisaldavad kõiki modifitseeritud nukleotiide) alles valgusünteesi ajal (Ero jt 2008). On välja pakutud, et valk RlmH ise või tema sünteesitud  $m^3\Psi$  modifikatsioon on olulised ribosoomide kvaliteedi kontrollis (Purta jt 2008).

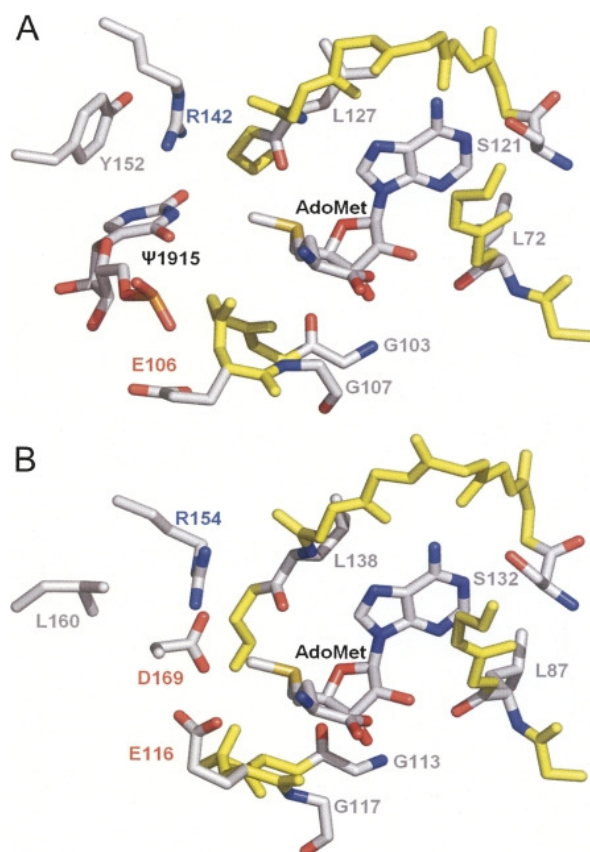
Nagu eelpool mainitud, on valgu RlmH puhul suure tõenäosusega tegu ainsa ensüümiga eluslooduses, mis suudab eristada pseudouridiini struktuurselt väga sarnasest uridiinist ning kanda metüülrühm üle pseudouridiini 3. positsiooni lämmastikule. RlmH apoensüümi (ensüüm ilma kofaktori ja substraadita) kohta on teada kristallstruktuur (Benach jt 2003), ent substraadi äratundmise ja metülatsiooni katalüüsimehhanism on seni teadmata.



**Joonis 7. *E. coli* 70S ribosoomidega seondunud RlmH valgu mudel.** Halliga on tähistatud 50S subühik, beežiga 30S subühik, rohelisega RlmH dimeer, tumeroosaga P-saidi tRNA ning punasega kofaktor. Vaade ribosoomi E-saidi poolt (A), A-saidi poolt (B), “poolik” ribosoom “ülevalt” vaadatuna (C) ning lähivaade 23S rRNA heeliks 69 ja RlmH interaktsioonist. Joonis on artiklist Purta jt 2008.

*E. coli* RlmH valgu aminohappelise järjestuse võrdlusest homologsete valkudega (sarnase aminohappelise järjestuse ja struktuuriga ning suure tõenäosusega teistes bakterites sama modifikatsiooni sünteesivad valgud) selgus, et kuus aminohapet (glütsiin-103, glütsiin-107, histidiin-129, glutamiinhape-138, arginiin-142 ning türosiin-152) on universaalselt konserveerunud (Ero jt 2008). Nendest kaks – glütsiin-103 ja glütsiin-107 – paiknevad ennustatult kofaktor SAM sidumiskohas ning arginiini-142 on pakutud katalüütiliseks aminohappeks (Anantharaman jt 2002; Ero jt 2008). RlmH valgu lähim sugulane *E. coli*-s on TrmD valk, mis katalüüsib tRNA-s 37. positsiooni guanosiini N1 metüleerimist (Byström ja Björk, 1982). N1 aatomi kontekst guanosiinis (paikneb lämmastikaluse aromaatses tuumas) sarnaneb keemiliselt N3 aatomi kontekstiga pseudouridiinis. TrmD valk on struktuurselt ja





**Joonis 8. RlmH ensüümi katalüütilise saiti seondunud kofaktor ja substraat Ψ1915 ning sarnasus TrmD valguga.** (A) Ennustatud S-adenosüül-L-metioniini (AdoMet) ja substraadi Ψ1915 seonumiskohad RlmH valgu kristallstruktuuris. (B) TrmD valgu kristallstruktuur kompleksis S-adenosüül-L-metioniiniga (AdoMet). Metülatsioonireaktsioonis oletatavalt osalevate aminohapete külghelad ning kofaktor on tähistatud järgnevalt: süsinik halliga, lämmastik sinisega ja hapnik punasega. RlmH ja TrmD valkudes konserveerunud kofaktori sidumiskoha peptiidselgroog on näidatud kollasega. Aminohapete ühetähelised lühendid on järgnevad; R-arginiin, L-leutsiin, S-seriin, E-glutamiinhape, Y-türosiin, D-asparagiinhape ning G-glütsiin. Joonis on artiklist Purta jt 2008.

biokeemiliselt suhteliselt hästi iseloomustatud (Ahn jt 2003; Elkins jt 2003). Purta jt ennustasid TrmD valguga sarnasuse põhjal kofaktori ja substraat Ψ1915 seonumiskohad RlmH kristallstruktuuris (Joonis 8) (Purta jt 2008). Valkude RlmH ja TrmD kofaktori SAM seonumiskohad on peaaegu identsed (Joonis 8) (Purta jt 2008). Osad valgu RlmH konserveerunud aminohapped (L72, G76, G103, G107, S121, L127) vastavad valgu TrmD konserveerunud aminohapetele (L87, G91, G113, G117, G132, L138) (Joonis 8) (Purta jt 2008). Lisaks on kirjeldatud analoogseid konserveerunud aminohappeid, mis paiknevad sarnaselt RlmH ja TrmD valkude ruumilises struktuuris, ent mitte aminohappelises järjestuses. Näiteks RlmH arginiinile-142 vastav arginiin (positsioonis 154) TrmD valgus paikneb katalüütilises tsentris ning osaleb substraatnukleotiidi sidumisel (Purta jt 2008). RlmH arginiinile-154 vastav TrmD arginiin-24 võib osaleda interaktsioonis RNA fosfaatselgrooga ning RlmH türosiinile-152 vastav TrmD leutsiin-160 interakteerub tõenäoliselt substraatalusega seda stabiliseerides (Purta jt 2008). Samas viitavad mõningad

erinevused RlmH ja TrmD valkude vahel nende vajadusele tunda ära erinevaid lämmstikaluseid (vastavalt  $\Psi$  ja G) ning katalüüsida metüülühma liitmist erinevatesse positsioonidesse (vastavalt 3. ja 1. positsiooni lämmstikele). Näiteks glutamiinhape-106, mis on homoloogne TrmD glutamaadiga-116, ei ole RlmH valgus konserveerunud ja on pööratud oletatavast aktiivsaidist eemale (Joonis 8) (Purta jt 2008). Siiski ei ole kristallstruktuuranalüüsi põhjal leitud RlmH valgus TrmD katalüütilisele aspartaadile-169 (vajalik guanosiini deprotoneerimiseks) vastavat aminohapet (Ahn jt 2003; Elkins jt 2003; Purta jt 2008).

Vaatamata mõningatele väikestele erinevustele RlmH ja TrmD valkude struktuuris saab TrmD valgu kohta avaldatud biokeemiliste ja mutageneesuuringute tulemusi kasutada lähtepunktina RlmH valgu substraadispetsiifika ja reaktsioonimehhanismi tundmaõppimisel.

## 2. PRAKTILINE TÖÖ

### 2.1. METOODIKA

#### 2.1.1. Kasutatud bakteritüved, plasmiidid ja söötmed

Töös kasutati *Escherichia coli* metsiktüüpi tüvesid XL-1 Blue (firmalt Stratagene, genotüübiga: endA1, gyrA96(nal<sup>R</sup>), thi-1, recA1, relA1, lac, glnV44, F' [::Tn10, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>,  $\Delta$ (lacZ)M15], hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)), DH5 $\alpha$  (genotüübiga: F<sup>-</sup>, endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda^-$ ) ning TOP10 (firmalt Invitrogen, genotüübiga: F<sup>-</sup>, mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, nupG, recA1, araD139,  $\Delta$ (ara-leu)7697, galE15, galK16, rpsL(Str<sup>R</sup>), endA1,  $\lambda^-$ ).

rlmH- tüvi on *E. coli* MG1655 metsiktüüpi tüve (genotüübiga: F<sup>-</sup>,  $\lambda^-$ , ilvG<sup>-</sup>, rfb-50, rph-1) derivaat, milles genoomne *rlmH* geen on asendatud kanamütsiiniresistentsust tagava geenikassetiga (konstrueeritud Tartu Ülikoolis Rya Ero poolt).

Kloneerimisel ning valguekspressioonil kasutati plasmidi pBAD/Myc-HisC firmalt Invitrogen, mis on mõeldud rekombineeritud valkude ekspressiooniks ja puhastamiseks *E. coli* rakkudes. Valkude ekspressiooni plasmiidilt kontrollib araboosi poolt aktiveeritav *E. coli* araBAD promooter (P<sub>BAD</sub>) ning regulatsiooni eest vastutav valk AraC on kodeeritud plasmidi enda poolt. Lisaks sisaldab plasmid ampitsilliiniresistentsust tagavat  $\beta$ -laktamaasi geeni.

Metsiktüüpi *rlmH* geeni sisaldava pBAD plasmidi konstrueeris Rya Ero Tartu Ülikoolist.

Bakterite kasvatamisel kasutati järgnevaid söötmeid: SOB (2% bakto-trüpton, 0.5% pärmiekstrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM KCl, pH 7.0), 2xYT (1.6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0.5% NaCl, pH 7.0) ning Luria-Bertani (LB) tardsöötme tasse (1% bakto-trüpton, 0.5% pärmiekstrakt, 1% NaCl, 1.7% agar, pH 7.0).

Bakteritüve *rlmH*- selektsiooniks lisati söötmetele antibiootikumi kanamütsiin lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml ning plasmidi pBAD/*Myc*-HisC derivaatide selektsiooniks kasutati antibiootikumi ampitsiliin lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

### 2.1.2. Punktmutatsioonide sisestamine *rlmH* geeni PCR-ga

*E. coli* RlmH valgu aminohappelise järjestuse võrdlusest homoloogsete valkudega on selgunud, et kuus aminohapet (glütsiin-103, glütsiin-107, histidiin-129, glutamiinhape-138, arginiin-142 ning türosiin-152) on universaalselt konserveerunud (Ero jt 2008). Nendest kaks – glütsiin-103 ja glütsiin-107 – paiknevad ennustatult kofaktor SAM sidumiskohas ning arginiini-142 on pakutud katalüütiliseks aminohappeks (Anantharaman jt 2002; Ero jt 2008). Lisaks võib arvata, et glutamiinhape-106 vastab sarnase valgu TrmD aktiivsuses olulisele aminohappele glutamiinhape-116 (Elkins jt 2003) ja türosiin-152 ning arginiin-154 osalevad substraadi sidumisel.

Sellest lähtuvalt sooviti valgu RlmH katalüütiliste aminohapete tuvastamiseks asendada valgus järgnevad aminohapped: glutamiinhape-56, asparagiinhape-73, glütsiin-103, glutamiinhape-106, glütsiin-107, glutamiinhape-138, arginiin-142, türosiin-152, arginiin-154. Valgu aminohappelise järjestuse muutmiseks oli vaja muuta vastavaid koodoneid *rlmH* geenis.

Polümeraasahelreaktsiooni (PCR) eesmärgiks oli viia punktmutatsioonid *rlmH* geeni kindlatesse positsioonidesse, selleks kasutati järgmisi primereid (esmal on toodud joonistele 9 ja 10 vastav tähis, seejärel primeri nukleotiidne järjestus 5'–3' suunas, kus mutatsiooni sisaldav koodon on märgitud rasvases kirjas ning mutatsioon ise on näidatud punasega, ning viimaks on esitatud primeri nimi):

**A** - CCATCGTCTCGC**ATGA**AAGCTGCAACTTGTCGCCGTGGG -  
*rlmH/pQE60/pBAD/5'Esp3I*

**B** - GGACTTAGATCTTTATCACTCACGGTGATAAGGATTG - *rlmH/pBAD/3'BglII*

**C<sub>1</sub>** - CCAACATCTGCTCACC**CGC**TTTGTCGAGTATGC - *rlmH E56A Rev*

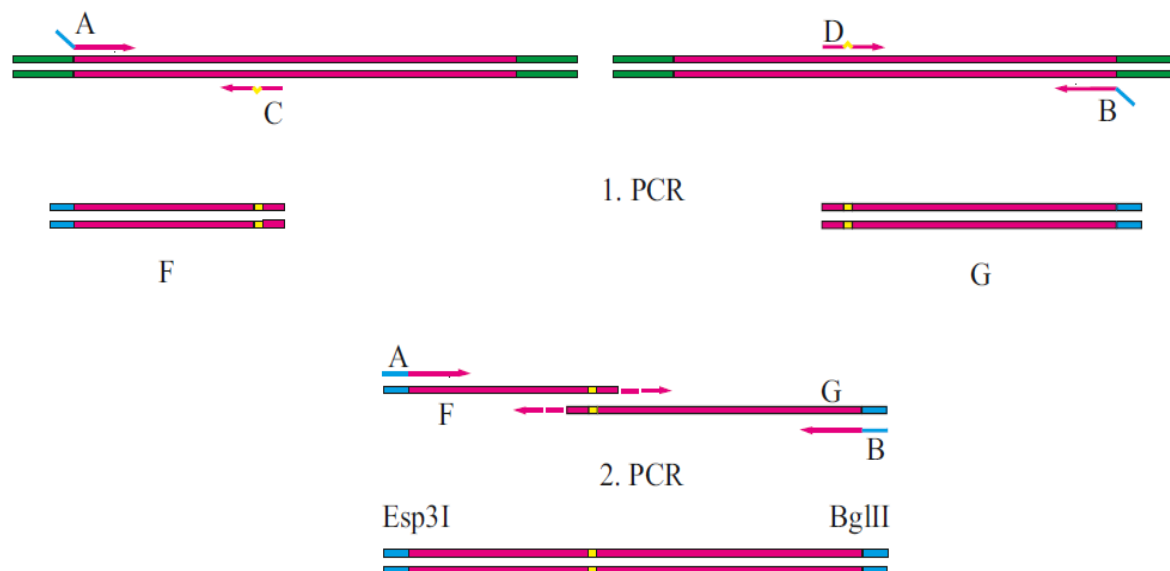
**C<sub>2</sub>** - GGCTTGCCTGGAATA**GCG**AGGGTGACAATGCGG - *rlmH D73A Rev*

**C<sub>3</sub>** - CCCTTCAGGCC**CGG**CAATCAGTAGACTGACG - *rlmH G103A Rev*

**C<sub>4</sub>** - GCAGGCGACAACC**TGC**AGGCCCGCCAATCAG - *rlmH E106A Rev*

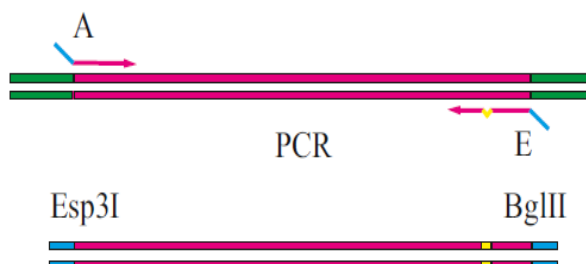
**C<sub>5</sub>** - CAGGCAGGCGACAAC**CGCT**TTCAGGCCC GCCAAT - rlmH G107A Rev  
**C<sub>6</sub>** - CCCGGTACAGACT**CGCT**GCGACCAGCACGCG - rlmH E138A Rev  
**C<sub>7</sub>** - GTGATGCTCCACGCC**CGC**GTACAGACTCGCTGC - rlmH R142A rev  
**C<sub>8</sub>** - GTGATGCTCCACGCC**AGG**TACAGACTCGCTGC - rlmH R142L rev  
**C<sub>9</sub>** - GTGATGCTCCACGCC**TTG**TACAGACTCGCTGC - rlmH R142K rev  
**D<sub>1</sub>** - GCATACTCGACAAAG**CGG**GTGAGCAGATGTTGG - rlmH E56A  
**D<sub>2</sub>** - CCGCATTGTCACCCTC**GCT**ATTCCAGGCAAGCC - rlmH D73A  
**D<sub>3</sub>** - CGTCAGTCTACTGATT**GCC**GGGCCTGAAGGG - rlmH G103A  
**D<sub>4</sub>** - CTGATTGGCGGGCCT**GCA**GGGTTGTCGCCTGC - rlmH E106A  
**D<sub>5</sub>** - ATTGGCGGGCCTGAAG**CGT**TGTCGCCTGCCTG - rlmH G107A  
**D<sub>6</sub>** - CGCGTGCTGGTCGCAG**CGA**GTCTGTACCGGG - rlmH E138A  
**D<sub>7</sub>** - GCAGCGAGTCTGTAC**CGG**GCGTGGAGCATCAC - rlmH R142A  
**D<sub>8</sub>** - GCAGCGAGTCTGTAC**CTG**GCGTGGAGCATCAC - rlmH R142L  
**D<sub>9</sub>** - GCAGCGAGTCTGTAC**AAG**GCGTGGAGCATCAC - rlmH R142K  
**E<sub>1</sub>** - GGACTTAGATCTTTATCACTCACGGTG**AGC**AGGATGG - rlmH Y152A/3' *Bgl*III  
**E<sub>2</sub>** - GGACTTAGATCTTTATCACTCA**AGC**GTGATAAGGATGG - rlmH R154A/3' *Bgl*III

Aminohapete asendamiseks RlmH valgu positsioonides 56, 73, 103, 106, 107, 138 ning 142 sisestati punktmutatsioonid *rlmH* geeni vastavatesse positsioonidesse kahe järjestikuse PCR reaktsiooniga (Joonis 9). RlmH valgu positsioonides 152 ja 154 asuvatele aminohapetele vastavad koodonid paiknevad *rlmH* geeni lõpuosas. See võimaldas vastavate mutatsioonide sisestamist ühe PCR reaktsiooniga (Joonis 10). Praimeriga A viidi *rlmH* geeni sisaldava PCR fragmendi 5' otsa restriктаasi *Esp*I lõikamissait ning praimeritega B või E fragmendi 3' otsa restriктаasi *Bgl*III lõikamissait (Joonised 9 ja 10).



**Joonis 9. Punktmutatsioonide sisestamise I skeem:** *rlmH* geenis aminohapetele E56, D73, G103, E106, G107, E132 ja R142 vastavate koodonite muteeriminealaniinile (A), lüsiinile (K) või leutsiinile (L) vastavateks koodoniteks. PCR-i esimeses etapis kombineeriti primereid A ja C<sub>1-9</sub> ning B ja D<sub>1-9</sub> ning tekkisid vastavalt fragmendid F<sub>1-9</sub> ja G<sub>1-9</sub>. Fragmendid F<sub>1-9</sub> ja G<sub>1-9</sub> puhastati ning kombineeriti omavahel ja praimeritega A ning B PCR'i teises etapis, andes produktiks punktmutatsioone sisaldavad *rlmH* geenid, mille 5' otsas on restriктаasi *Esp*3I ning 3' otsas restriктаasi

*Bgl*III lõikamiskohad. Roosaga on tähistatud *rlmH* geen ning sellega komplementaarsed praimerite lõigud, rohelisega genoomis *rlmH* geeniga piirnevad alad, sinisega restriктаaside äratundmisjärjestused ning kollasega on tähistatud mutatsiooni koht (autori joonis).



**Joonis 10. Punktmutatsioonide sisestamise II skeem:** *rlmH* geenis aminohapetele Y152 ja R154 vastavate koodonite muteerimine alaniinile (A) vastavateks koodoniteks. PCR-iks kasutati primereid A ja E<sub>1-2</sub>, saades produktiks punktmutatsioone sisaldavad *rlmH* geenid, mille 5' otsas on restriктаasi *Esp*3I ning 3' otsas restriктаasi *Bgl*III lõikamiskohad. Roosaga on tähistatud *rlmH* geen ning sellega komplementaarsed praimerite lõigud, rohelisega genoomis *rlmH* geeniga piirnevad alad, sinisega restriктаaside äratundmisjärjestused ning kollasega on tähistatud mutatsiooni koht (autori joonis).

Preparatiivsesse PCR reaktsiooni (lõppruumalaga 70 µl) võeti 200–400 ng *E. coli* MG1655 tüve genoomset DNA-d või DNA fragmente F<sub>1-9</sub> ja G<sub>1-9</sub>, 70 pmol vastavaid primereid (firmalt DNA Technology A/S) 0.2 mM desoksünukleotiidtrifosfaatide segu (dNTP) ja 5 ühikut *Pfu* DNA polümeraasi (saadud kingitusena prof J. Sedmanilt, Tartu Ülikool). Reaktsioon toimus puhvris koostisega 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA (*bovine serum albumine*), 0.1% Triton X-100 ja 2 mM MgSO<sub>4</sub>. PCR-i üht tsüklit (40 sekundit 93°C juures, 40 sekundit 55°C juures, 1.5 minutit 72°C juures) korrati 32 korda. PCR-i reaktsioonisegud (millele oli lisatud 15 µl foreesi värvi: 0.25% broomfenoolsinine, 0.25% ksüleentsüanoool ja 30% glütserool) kanti 2% agarosgeelile ning elektroforeesiti (I = 50 mA, U = 100V) TBE puhvris (1 liitri puhvri kohta 10.8 g Tris alust, 5.5 g boorhapet, 20 ml 0.5 M EDTA-d) ligikaudu üks tund. DNA fragmendid visualiseeriti etiidiumbromiidi lisamisega geelile (1 µg/ml). PCR produktide pikkuse määramiseks kasutati GeneRuler 1 kb DNA Ladder markerit (Fermentas). Pärast elektroforeesi lõigati skalpelliga pikalainelise UV valguses sobiva pikkusega DNA fragmendid geelist välja ning puhastati Fermentase Gene Jet Gel Extraction Kiti abil.

### 2.1.3. Mutantsete *rlmH* geenide klonimine plasmidi pBAD

Mutantsete *rlmH* geenide kloonimiseks plasmiidi pBAD valmistati esmalt kemo-kompetentsed rakud ning eraldati plasmiid pBAD. Seejärel restrikteeriti nii PCR-fragmente (mutantse *rlmH* geeniga) kui plasmiidi, et sisestada mutante geen plasmiidi ligeerimise teel.

### **2.1.3.1. Kemo-kompetentsete rakkude valmistamine**

Kemo-kompetentsete rakkude saamiseks külvati XL-1 Blue ja *rlmH*- bakteritüved vastavalt LB ja LB+kanamütsiin (25 µg/ml) tardsöötme tassidele ning inkubeeriti 37 °C juures üle öö. Üks koloonia kummagi tüve rakkudest viidi 2 ml 2xYT söötmesse, *rlmH*- tüve puhul lisati kanamütsiini (25 µg/ml). Rakke inkubeeriti loksutil aereerides 37 °C juures üle öö. Kummastki rakukultuurist pipeteeriti 1 ml 200 ml SOB söötmesse (*rlmH*- tüve korral lisati kanamütsiini 25 µg/ml) ning kasvatati aereerides loksutis 37 °C juures optilise tiheduseni OD<sub>600</sub> 0.3–0.4. Seejärel jahutati rakud jääl ning koguti tsentrifuugimisega 15 minuti jooksul (3000 p/min, 4 °C). Sööde eemaldati ning rakud suspendeeriti 40 ml RF1 puhvril (100 mM KCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 30 mM kaaliumatsetaat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15% glütserool, pH 5.8). Rakke inkubeeriti 30 minutit jääl, koguti tsentrifuugimisega 15 minuti jooksul (3000 p/min, 4 °C). RF1 puhver eemaldati ning rakud suspendeeriti 8 ml RF2 puhvril (10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 mM MOPS, 15% glütserool, pH 6.8). Rakke inkubeeriti 15 minutit jääl, jagati 150 µl kaupa Ependorfi tuubidesse, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati –80 °C juures.

### **2.1.3.2. Plasmiidi pBAD eraldamine**

Esmalt sisestati plasmiid pBAD XL-1 bakteritesse. Transformeerimiseks võeti 100-150 µl jääl sulatatud XL-1 Blue kemo-kompetentseid rakke ja 1 mg plasmiidi pBAD. Plasmiidse DNA sisestamiseks rakkudesse kasutati kuumašoki meetodit, selleks inkubeeriti rakke koos plasmiidse DNA-ga 20 minutit jääl, millele järgnes 5 minutit soojendamist 37 °C juures. Järgnevalt hoiti rakke veel 5 minutit jääl. Rakud külvati LB+ampitsiliin tardsöötme tassile ning kasvatati üle öö 37 °C juures. Ühe kolooniaga inokuleeriti 25 ml 2xYT söödelt ning baktereid kasvatati ampitsiliini juuresolekul (100 µg/ml) loksutis 37 °C juures üle öö. Plasmiid pBAD eraldati bakteritest vastavalt Invisorb Plasmid Midi Kit komplektile.

### **2.1.3.3. Plasmiidi pBAD lõikamine ensüümidega *NcoI* ja *BglII***

Plasmiidi PCR fragmentide viimiseks lõigati plasmiidi pBAD kõigepealt ensüümiga *NcoI*, lineariseerunud plasmiid puhastati ning lõigati seejärel ensüümiga *BglII*. Selleks lisati ~8 µg

plasmiidile 10 ühikut restriктаasi *NcoI* (Fermentas), restriksioon toimus Fermentase Y<sup>+</sup> puhvrts (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) 1.5 tunni jooksul 37 °C juures. Restriksioonisegu kanti sarnaselt PCR-i segule 1.5% agarosgeelile ning elektroforeesiti (I = 70 mA, U = 150 V) TBE puhvrts ligikaudu 1.5 tundi. Lineariseerunud pBAD lõigati pikalainelise UV valguses geelist välja ning puhastati Fermentase Gene Jet Gel Extraction Kiti abil. Lineariseerunud plasmiid elueeriti GenJET™ kolonnilt 50 µl Fermentase eluatsioonipuhvrtsiga ning lisati 10 ühikut restriктаasi *BgIII* (Fermentas). Restriksioon toimus Fermentase O<sup>+</sup> puhvrts (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) 1.5 tunni jooksul 37 °C juures. Restriksioonisegu kanti jällegi 1.5% agarosgeelile ning elektroforees toimus sarnaselt eelpool kirjeldatule, plasmiid puhastati geelist Fermentase Gene Jet Gel Extraction Kiti abil.

#### **2.1.3.4. PCR fragmentide lõikamine ensüümidega *BgIII* ja *Esp3I***

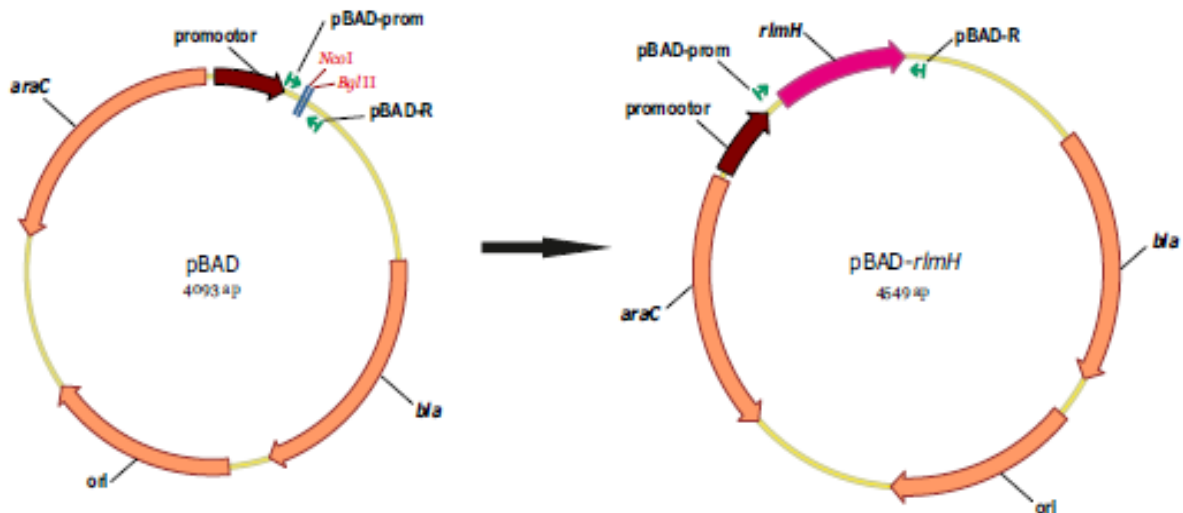
Ka PCR fragmentide viimiseks plasmidi töödeldi neid vastavate ensüümidega. PCR-i reaktsiooni produktidena saadud DNA fragmente lõigati kõigepealt restriктаasiga *BgIII*, et luua DNA fragmentidele 3' ots, mis sobitub samuti *BgIII* restriктаasiga lõigatud pBAD plasmiidiga. Pärast DNA fragmentide puhastamist agarosgeelist lõigati fragmente restriктаasiga *Esp3I*. *Esp3I* restriктаas ei lõika DNA-d äratundmisjärjestuse kohast, vaid fikseeritud kauguselt 3' suunas. PCR praimerid olid disainitud nii, et PCR produkti lõikamisel restriктаasiga *Esp3I* tekib fragmendile 5' ots, mis sobitub *NcoI* restriктаasiga lõigatud pBAD plasmiidiga. *NcoI* restriктаasi ei saanud fragmendi lõikamisel kasutada, kuna fragmendis olevas *rlmH* geenis on samuti *NcoI* restriктаasi lõikmissait.

Fermentase eluatsioonipuhvrts PCR-i fragmentidele lisati 10 ühikut restriктаasi *BgIII*. Restriksioon toimus Fermentase O<sup>+</sup> puhvrts 37 °C juures 1.5 tundi. DNA fragmentide puhastamiseks restriksioonisegust kasutati Fermentase komplekti Gene Jet Gel Extraction Kit. DNA fragmendid elueeriti GenJET™ kolonnilt 50 µl Fermentase eluatsioonipuhvrtsiga ning lisati 10 ühikut restriктаasi *Esp3I* (Fermentas). Restriksioon toimus Fermentase Y<sup>+</sup> puhvrts (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) 1.5 tunni jooksul 37 °C juures. DNA puhastamiseks kasutati taaskord Fermentase komplekti Gene Jet Gel Extraction Kit.

#### **2.1.3.5. PCR fragmentide ligeerimine plasmidi pBAD ja transformatsioon**

Muudetud *rlmH* geeni saamiseks sisestati PCR fragmendid plasmidi pBAD. Mutantseid *rlmH* gene sisaldavad DNA fragmendid kloneeriti plasmidi pBAD nagu on näidatud

joonisel 11. Ligeerimissegusse (lõppruumala 20 µl) võeti ~3 µg restriктаasidega lõigatud DNA fragmente ja ~2 µg restriктаasidega lõigatud plasmidi pBAD, 2.5 mM HCC-d ning viis ühikut T4 DNA ligaasi (Fermentas). Ligatsioon toimus T4 ligaasi puhvril (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH 7.8) toatemperatuuril neli tundi. Ligeerimissegu kuumutati ligaasi inaktiveerimiseks 70 °C juures 10 minutit.



**Joonis 11. Mutantsete *rlmH* geenide klonimine vektorisse pBAD.** pBAD plasmidi lõigati restriктаasidega *NcoI* ja *BglII* (lõikamiskohad näidatud sinisega) ning *rlmH* geen (tähistatud roosaga) ligeeriti lõikamissaitide vahele. Rohelisega on näidatud konstrueeritud vektorite koloonia PCR-l ja sekveneerimisel kasutatud praimerite pBAD-prom ja pBAD-R seondumiskohad. Lisaks on näidatud plasmidi replikatsiooni, valguekspressiooni ja ampitsilliini resistentsuse seisukohast olulised regioonid (autori joonis).

Transformeerimiseks lisati 10 µl ligatsioonisegu 100–150 µl jääl sulatatud kemo-kompetentsetele *E. coli* TOP10 või DH5α tüve rakkudele. Plasmiidse DNA sisestamiseks rakkudesse kasutati kuumašoki meetodit, rakke inkubeeriti koos plasmiidse DNA-ga 30 minutit jääl, millele järgnes 2 minutit soojendamist 42 °C juures. Järgnevalt hoiti rakke veel 5 minutit jääl. Rakkude turgutamiseks lisati 900 µl 2xYT söödet ning inkubeeriti üks tund 37 °C juures. Liigest söötmetest vabanemiseks tsentrifugeeriti rakud põhja ühe minuti jooksul (Heraeuse lauatsentrifuug, 3000 p/min) ning valati ära suurem osa söötmetest. Rakud suspendeeriti ~100 µl alles jäänud söötmes, külvati LB+ampitsilliin tardsöötme tassidele ning kasvatati 37 °C juures üle öö.



#### **2.1.4. Kloneerimise kontroll ja plasmiidse DNA eraldamine räniga**

Plasmiidiga pBAD rakkude kloneerimise kontrolliks kasutati koloonia-PCR meetodit. Iga mutantse *rlmH* geeni kohta võeti kuni 8 juhuslikult valitud bakterikolooniat ja suspendeeriti 10 µl mQ vees ning kuumutati 95 °C juures 5 minutit. Seejärel lisati 15 µl PCR-i reaktsioonisegu, mis sisaldas 30 pmol praimereid pBAD-prom (GCAACTCTCTACTGT) ja pBAD-R (GATTTAATCTGTATCAGG), PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100, 0.5% Ficoll-400 ja 1 mM tartasiin), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP ja 30 ühikut *Taq* DNA polümeraasi (saadud kingitusena prof J. Sedmanilt, Tartu Ülikool). Koloonia-PCR üht tsüklit (1 minut 95 °C juures, 1 minut 56 °C juures, 1 minutit 72 °C juures) korrati 34 korda. PCR-i reaktsioonisegud kanti 1.5% agarosgeelile ning elektroforeesiti (I = 70 mA, U = 150 V) TBE puhvris ligikaudu 1 tund. PCR produktide pikkuse määramiseks kasutati GeneRuler 1 kb DNA Ladder markerit.

Korrektse pikkusega (~500 nukleotiidi) PCR fragmentidele vastavate bakterikoloonitega inokuleeriti 2 ml 2xYT vedelsöödet ning baktereid kasvatati ampitsiliini juuresolekul (100 µg/ml) loksutis 37°C juures üle öö. Plasmiidse DNA eraldamiseks bakteritest kasutati Qiagen Miniprep Plasmid Extraction komplekti.

#### **2.1.5. Konstrueeritud plasmiidide sekveneerimine**

Mutantseid *rlmH* geene sisaldavate konstrueeritud pBAD plasmiidide kontrollimiseks sekveneeriti huvipakkuvad regioonid, kasutades praimereid pBAD-prom ja pBAD-R (Joonis 11). Selleks segati (lõppruumala 7.3 µl) 200–400 ng konstrueeritud pBAD plasmiidide ja 1.6 pmol praimeriteid pBAD-prom (GCAACTCTCTACTGT) või pBAD-R (GATTTAATCTGTATCAGG). Kasutati Eesti Biokeskuse ja Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi DNA genotüüpiseerimise ja sekveneerimise tuumiklabori sekveneerimisteenust.

#### **2.1.6. Ribosoomide profiilid ja ribosomaalse RNA eraldamine**

##### **2.1.6.1. Bakterite kasvatamine**

Muudetud aminohappelise järjestusega RlmH valkude aktiivsuse hindamiseks transformeeriti metsiktüüpi ja mutantseid *rlmH* geene sisaldavad konstrueeritud pBAD plasmiidid kuumašoki meetodil *E. coli* rlmH- bakteritüvesse. Transformeerimiseks võeti 100–150 µl jääl sulatatud rlmH- tüve kemo-kompetentseid rakke ja 1 mg konstrueeritud pBAD plasmiidide. Rakke

inkubeeriti 20 minutit jääl, seejärel viidi rakud viieks minutitiks 37 °C juurde ning järgnevalt tõsteti rakud jällegi viieks minutitiks jääle. Rakud külvati LB+ampitsiliin tassidele ning kasvatati üle öö 37 °C juures. Üle öö kasvanud bakteritest viidi üks koloonia 2 ml 2xYT söötmesse, kuhu lisati ampitsiliini (100 µg/ml) ning kanamütsiini (25 µg/ml). Rakke kasvatati üle öö loksutis 37 °C juures. 1 ml üle öö kasvanud bakterikultuuriga inokuleeriti 100 ml SOB söödet, millesse lisati ampitsiliini (100 µg/ml) ning kanamütsiini (25 µg/ml). Pärast kahte tundi loksutis aereerides 37 °C juures kasvamist ( $OD_{600} \sim 0.2$ ) lisati arabinoosi (1 mM) pBAD plasmiidilt valgusünteesi indutseerimiseks. Rakke kasvatati veel kaks tundi ( $OD_{600} \sim 0.8$ ), jahutati jääl ning koguti tsentrifuugitamisega (10 minutit, 6000 p/min, 4 °C). Võrdluseks kasvatati sarnastel tingimustel *E. coli* metsiktüüpi XL-1 Blue ja transformeerimata rlmH- tüve rakke. XL-1 Blue ja transformeerimata rlmH- tüve korral ampitsiliini ja arabinoosi ei lisatud. XL-1 Blue tüve korral ei lisatud ka kanamütsiini.

#### **2.1.6.2. 70S ribosoomide eraldamine**

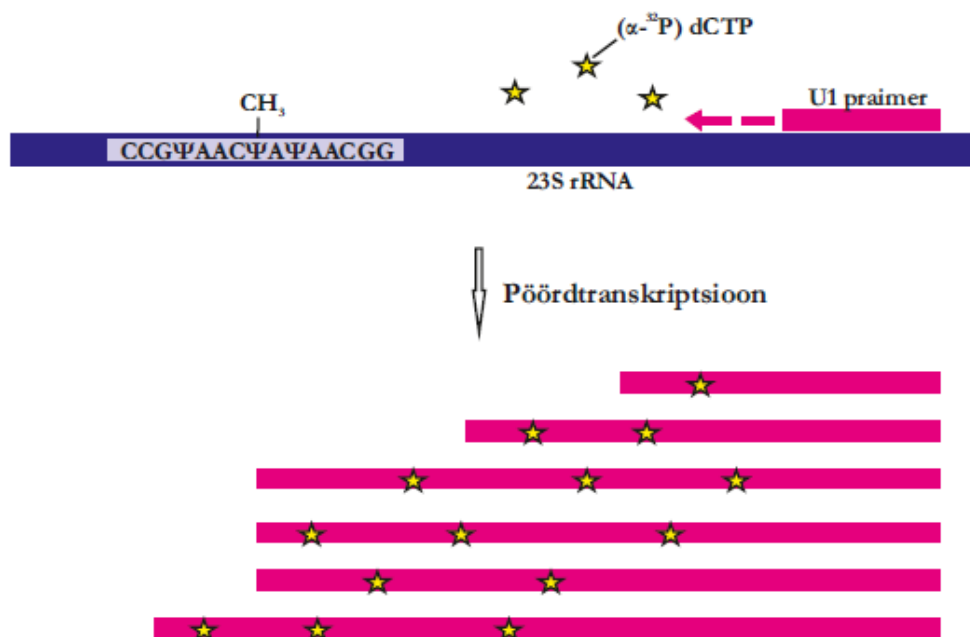
Et analüüsida RlmH valgu poolt modifitseerivat rRNA piirkonda, oli esmalt vaja eraldada 70S ribosoomid. Ribosoomid eraldati sahharoosi gradiendis tsentrifuugimise teel. Rakud suspendeeriti 1.5 ml lüüsi puhvrts (60 mM KCl, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 50 mM Tris-HCl pH 8.6 mM, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 16% sahharoos ja 6 mM β-merkaptopetanool), millele oli lisatud lüsootsüüm (20 mg/ml) rakukestade lõhkumiseks ning DNAas I (50 ühikut/ml) genoomsest DNA-st vabanemiseks. Rakkude lüüsimiseks kasutati kolme külmutamis-sulatamistsükli: -80 °C juures külmutatud rakud sulatati aeglaselt jäävee segul. Järgnevalt tsentrifuugiti rakukestad Ependorfi tuubi põhja (10 minutit, 13 000 p/min, 4 °C). Supernatanti lahjendati LLP puhvrtsiga suhtes 3:1 ning 1 ml (~ 60 OD<sub>254</sub> ühikut RNA-d) kanti 15–30% sahharoosi gradiendile (lõppruumala 36 ml) LLP puhvrts (60 mM KCl, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM β-merkaptopetanool) ning tsentrifuugiti 13 tundi 22 000 p/min ( $\omega^2t = 3.0 \times 10^{11}$ , 4°C) ultratsentrifuugis (Beckman Coulter, Optima L-90K) rootoriga SW-28. Gradiendid pumbati peristaltilise pumba abil läbi isekirjutajaga (UVICORD SII) ühendatud läbivoolutusfotomeetri (LKB Bromma/2238), analüüsides läbivoolu pidevalt OD<sub>254</sub> nm juures. 70S ribosoomi sisaldav fraktsioon koguti, ribosoomid sadestati 96% külma etanooli 2.5 kordse ülehulgaga (-20 °C juures vähemalt 2 tundi) ning tsentrifuugiti 50 minuti jooksul (5000 p/min, 4 °C) katseklaasi põhja. Sadet pesti kaks korda 70% etanooliga, etanool eemaldati vaakumpumbaga ning katseklaase hoiti 10 minutit 37 °C juures etanoolijääkide aurustamiseks.

### **2.1.6.3. Ribosomaalse RNA eraldamine**

Järgnevalt oli vaja vabaneda ribosomaalsetest valkudest. Ribosoomid lahustati 200 µl mQ vees ning pipeteeriti Ependorfi tuubidesse. Ribosoomilahusele lisati 1 ml QIAGEN PN puhvrit ning ribosomaalsed valgud ekstraheeriti 20 minuti jooksul. Seejärel lisati rRNA sidumiseks 20 µl 50% ränisuspensiooni ning lahuseid segati 10 minutit. Järgnevalt tsentrifugeeriti 15–20 sekundi jooksul (Heraeuse lauatsentrifuug, 6000 p/min, 4 °C) räniga seondunud rRNA tuubi põhja, supernatant eemaldati vaakumpumbaga ning räni sade suspendeeriti 1 ml 70% etanoolis. Järgnes tsentrifugeerimine (15–20 sekundit, 6000 p/min, 4 °C), supernatandi eemaldamine ning etanoolpesu kordamine. Pärast teistkordset etanooli eemaldamist vaakumpumbaga jäeti Ependorfi tuubid 10 minutiks avatuna lauale, et etanoolijäägid aurustuks. Järgnevalt lisati rRNA elueerimiseks ränilt 50 µl mQ vett, segati, kuni kogu sade oli suspendeerunud, inkubeeriti 37 °C juures 3 minutit ning tsentrifugeeriti 3 minutit (lauatsentrifuug, 13 000 p/min, 4 °C). Vesifaas viidi uude Ependorfi tuubi ning mõõdeti rRNA kontsentratsioon (Nanodrop, Thermo Scientific). rRNA säilitati –20 °C juures.

### **2.1.7. Praimerkestensioonanalüüs**

Valgu RlmH aktiivsuse kontrolliks ehk 23S rRNA 1915 positsiooni metüleerituse tuvastamiseks kasutati pöördtranskriptaasiga praimerkestensiooni analüüsi, mille skeem on toodud joonisel 12. Pöördtranskriptaas pikendab U1 praimerit, sünteesides 23S rRNA-ga komplementaarse DNA ahela. Kui positsioonis 1915 asuv pseudouridiin on metüleeritud, peatub pöördtranskriptaas ning DNA ahela edasine süntees on pärsitud.



**Joonis 12. Primereksensiooni analüüsi skeem.** Lillaga on tähistatud 23S RNA, heeliks 69 nukleotiidid 1908-1922 ning 1915. positsiooni pseudouridiini metüülrühm on eraldi välja toodud. 23S rRNA komplementaarse piirkonnaga seondunud U1 praimerit pikendatakse pöördtranskriptaasi poolt, lülitades sünteesitavasse DNA ahelasse radioaktiivse märga  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-d. Kui positsioonis 1915. paiknev pseudouridiin on metüleeritud, takistab see DNA fragmentide edasist pikendamist. Primereksensiooni käigus sünteesitud DNA fragmendid lahutatakse pikkuse järgi polüakrüülamiidgeelis elektrofooresil ning visualiseeritakse radioaktiivse märke abil (autori joonis).

Primeri hübridiseerimiseks rRNA-ga segati kokku 5  $\mu\text{l}$  (1-2 pmol) puhastatud rRNA-d, 2  $\mu\text{l}$  (2 pmol) U1 praimerit (CAGCCTGGCCATCAT) ja 2  $\mu\text{l}$  puhvrit HB (250 mM Hepes pH 7.0, 500 mM KCl). Hübridisatsioonireaktsioone inkubeeriti rRNA sekundaarstruktuuri denatureerimiseks 90 °C juures ühe minuti jooksul. Järgnevalt alandati temperatuuri aeglaselt (10–20 minuti jooksul) 47 °C kraadini, et praimer saaks hübridiseeruda rRNA molekuli komplementaarse regiooniga; seejärel tõsteti proovid jääle. Primeri ekstensiooniks lisati proovidele 1.2  $\mu\text{l}$  10xRB puhvrit (1.3 M Tris-HCl pH 8.4, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, ja 100 mM DTT), 0.8  $\mu\text{l}$  dNTP-C (110  $\mu\text{M}$  dATP, 110  $\mu\text{M}$  dGTP, 110  $\mu\text{M}$  dTTP ja 6  $\mu\text{M}$  dCTP), 0.5  $\mu\text{l}$  (~100  $\mu\text{M}$ )  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP ning 3 ühikut AMV pöördtranskriptaasi (Seikagaku). Reaktsioonisegu lõppruumala viidi mQ veega 12 mikrolitriini ning proove inkubeeriti 30 minutit 42 °C juures. Seejärel lisati 1.9  $\mu\text{l}$  1 mM dNTP segu ja veel kaks ühikut AMV pöördtranskriptaasi ning jätkati inkubeerimist 15 minutit 42 °C juures. Ekstensioonireaktsiooni peatamiseks ja DNA fragmentide sadestamiseks lisati 120  $\mu\text{l}$  RT-STOP lahust (0.3M NaOAc:etanol suhtes 1:3) ning vajadusel DNA sadestamise soodustamiseks dekstraani. DNA sadestati –20 °C juures

vähemalt 2 tundi ning proove tsentrifuugiti 15 minutit (lauatsentrifuug, 13 000 p/min, 4 °C). DNA sade lahustati 5 µl formamiidvärvis (98% formamiid, 0.04 M broomfenoolsinine, 0.04 M ksüleenksüanool).

Praimerekstensiooni sekveneerimisreaktsioonides kasutati metsiktüüpi XL-1 Blue tüvest eraldatud rRNA-d. Reaktsioonid viidi läbi nagu eelpool kirjeldatud, ent ekstensiooniseigule lisati 12 µM vastavat ddNTP-d (kas didesoksünukleotiidi ddATP, ddCTP, ddGTP, või ddTTP).

Praimerekstensiooni reaktsiooni käigus sünteesitud DNA fragmendid lahutati pikkuse järgi 7% urea-polüakrüülamiidgeelis (akrüülamiid-bisakrüülamiid suhtes 19:1, 8M urea, 0.1% naatriumpersulfaat, 0.08% TEMED) elektroforeesil (~3 tundi, 1900V) TBE puhvril. Enne geelile kandmist kuumutati proove kolm minutit 95 °C juures. Pärast elektroforeesi kanti geel GF/C klaas-mikrofiiberpaberile ja kuivatati vaakumkuivatis 80 °C juures 40 minutit. Geelil lahutunud radioaktiivset märgat sisaldavad DNA fragmendid visualiseeriti Typhoon Scanner PhosphoImageriga (Molecular Dynamics) ning analüüsiti kasutades ImageQuant tarkvara.

### 2.1.8. Valgu ekspressiooni kontroll

Kontrollimaks, kas konstrueeritud pBAD plasmiididelt mutantseid RlmH valke sünteesitakse, analüüsiti arabinoosi juuresolekul kasvatatud bakterite rakulüsaati SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforeesil. Konstrueeritud pBAD plasmiidid transformeeriti kuumašoki meetodil *E. coli* rlmH- bakteritüvesse. Rakud külvati LB+ampitsiliin tardsöötme tassidele ning kasvatati üle öö 37 °C juures. Üle öö kasvanud bakteritest viidi üks koloonia 2 ml 2xYT söötmesse, kuhu lisati ampitsiliini (100 µg/ml) ning kanamütsiini (25 µg/ml). Võrdlusena kasutati transformeerimata rlmH- tüve rakke (söötmele lisati ainult kanamütsiini) ja *E. coli* metsiktüüpi XL-1 tüve rakke (söötmele antibiootikume ei lisatud). Rakke kasvatati loksutis 37 °C juures kuni  $OD_{600} = 0.6-0.7$ . Seejärel lisati arabinoos (1 mM) pBAD plasmiidilt valgusünteesi indutseerimiseks ning jätkati kasvatamist, kuni optiline tihedus oli  $OD_{600} \sim 1.6$ . Rakud tsentrifuugiti tuubi põhja 3 minuti vältel (13 000 p/min, 4 °C) ning sööde eemaldati vaakumpumbaga.

Rakud suspendeeriti 100 µl mQ vees ning lisati 100 µl 2xSDS värvi (25% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glütserool ja 0.01% broomfenoolsinine). Proove kuumutati rakkude lüüsimiseks 5 minutit 95 °C juures ja kanti 15% SDS-polüakrüülamiid geelile (akrüülamiid-bisakrüülamiid suhtes 29:1, 250 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% naatriumpersulfaat,

0.08% TEMED). Võrdluseks kanti geelile ka ~0.1 mg puhastatud metsiktüüpi RlmH valku (puhastatud Tartu Ülikoolis Rya Ero poolt). Valkude kontsentreerimiseks valati 15% geeli peale 5% SDS-poliakrüülamiid geeli (akrüülamiid-bisakrüülamiid suhtes 29:1, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% naatriumpersulfaat, 0.08% TEMED). Elektroforeesil (I = 50 mA, U = ~200 V, 2.5 tundi) kasutati Tris-glütsiin puhvrit (125 mM Tris alus, 1.25 M glütsiin, 0.5 % SDS). Valgud visualiseeriti geeli leotamisega Coomassie R-250 värvilahuses (värvi 1 g/l, 10% jää-äädikat, 30% etanooli, 60% destilleeritudvett). Seejärel geeli leotati *destain*-lahuses (10% jää-äädikat, 30% etanooli, 60% vett) üle öö ning skaneeriti.

## 2.2. TULEMUSED JA ARUTELU

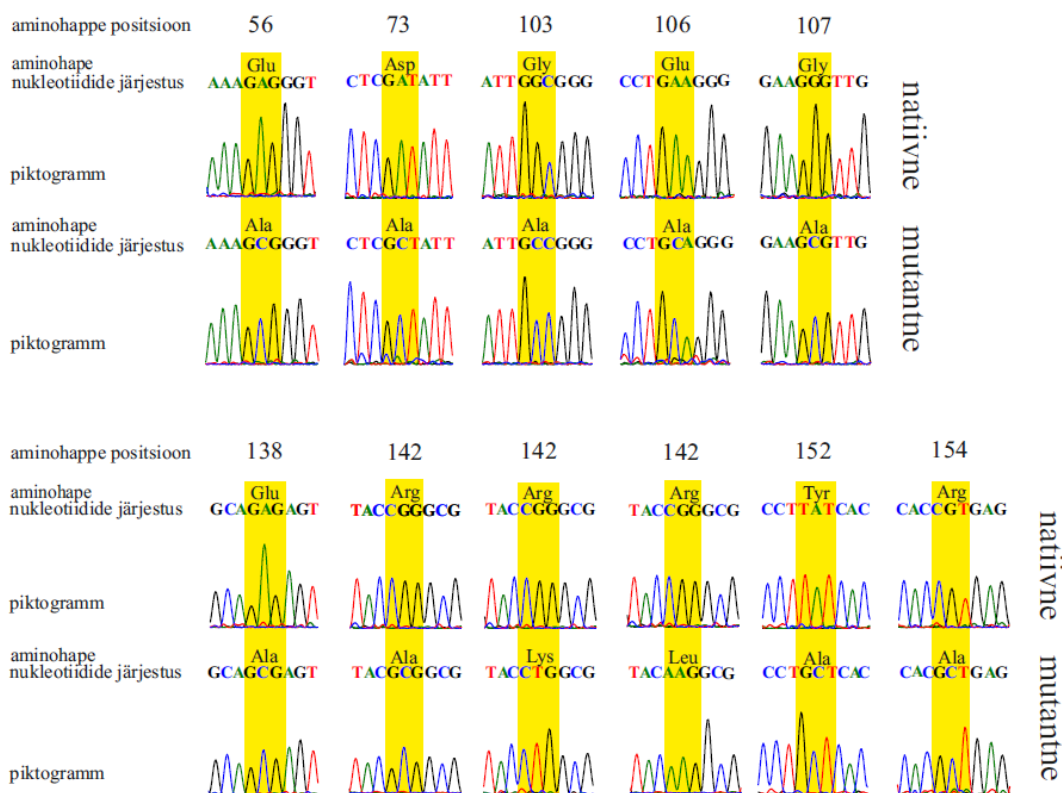
RlmH-i poolt läbiviidava metülatsioonireaktsiooni mehhanismi selgitamiseks sooviti asendada RlmH valgus potentsiaalselt olulised aminohapped ning hinnata metülatsioonireaktsiooni efektiivsust rakus.

### 2.2.1. Kohtspetsiifiline mutatsioonide sisestamine ning *rlmH* geeni kloneerimine ekspressioonivektorisse

Soovitud aminohappeliste asenduste saamiseks valgus tuleb viia mutatsioonid valku kodeeriva geeni kindlatesse positsioonidesse ning tagada mutantsetelt geenidelt valgu ekspresseerimise. Punktmutatsioonid sisestati *rlmH* geeni PCR meetodiga, mille juures kasutati soovitavaid nukleotiidseid asendusi sisaldavaid primereid (punktmutatsioonide sisestamise skeemid näidatud joonistel 9 ja 10). Punktmutatsioone sisaldavad *rlmH* geenid kloneeriti valgu ekspressioonivektorisse pBAD (kloneerimise skeem näidatud joonisel 11). Konstrueeritud mutantseid *rlmH* gene sisaldavad pBAD praimerid kontrolliti huvipakkuva regiooni nukleotiidse järjestuse määramisega (sekveneerimisega), kasutades pBAD vektori spetsiifilisi primereid pBAD-prom ja pBAD-R (Joonis 11).

Nukleotiidse järjestuse analüüsist selgus, et konstrueeritud plasmiidid sisaldasid soovitud mutatsioonidega *rlmH* gene (Joonis 13). Metsiktüüpi RlmH valgus 56. positsiooni glutamaadile (Glu), 73. positsiooni asparagiinhappele (Asp), 103. positsiooni glütsiinile (Gly), 106. positsiooni glutamaadile (Glu), 107. positsiooni glütsiinile, 138. positsiooni glutamiinhappele (Glu), 142. positsiooni arginiinile (Arg), 152. positsiooni türosiinile (Tyr) ning 154. positsiooni arginiinile (Arg) vastavad koodonid oli asendatudalaniini (Ala) kodeerivate koodonitega. 142. positsiooni arginiinile (Arg) vastav koodon oli asendatud ka lüsiini (Lys) ning leutsiini (Leu) kodeerivate koodonitega.

Lisaks selgus nukleotiidse järjestuse analüüsist, et kloneeritud mutantsed *rlmH* geenid olid õiges lugemisraamis, sisaldasid korrektset start- ja stoppkoodonit ning ei sisaldanud mittesoovitud lisamutatsioone (tulemused ei ole esitatud).

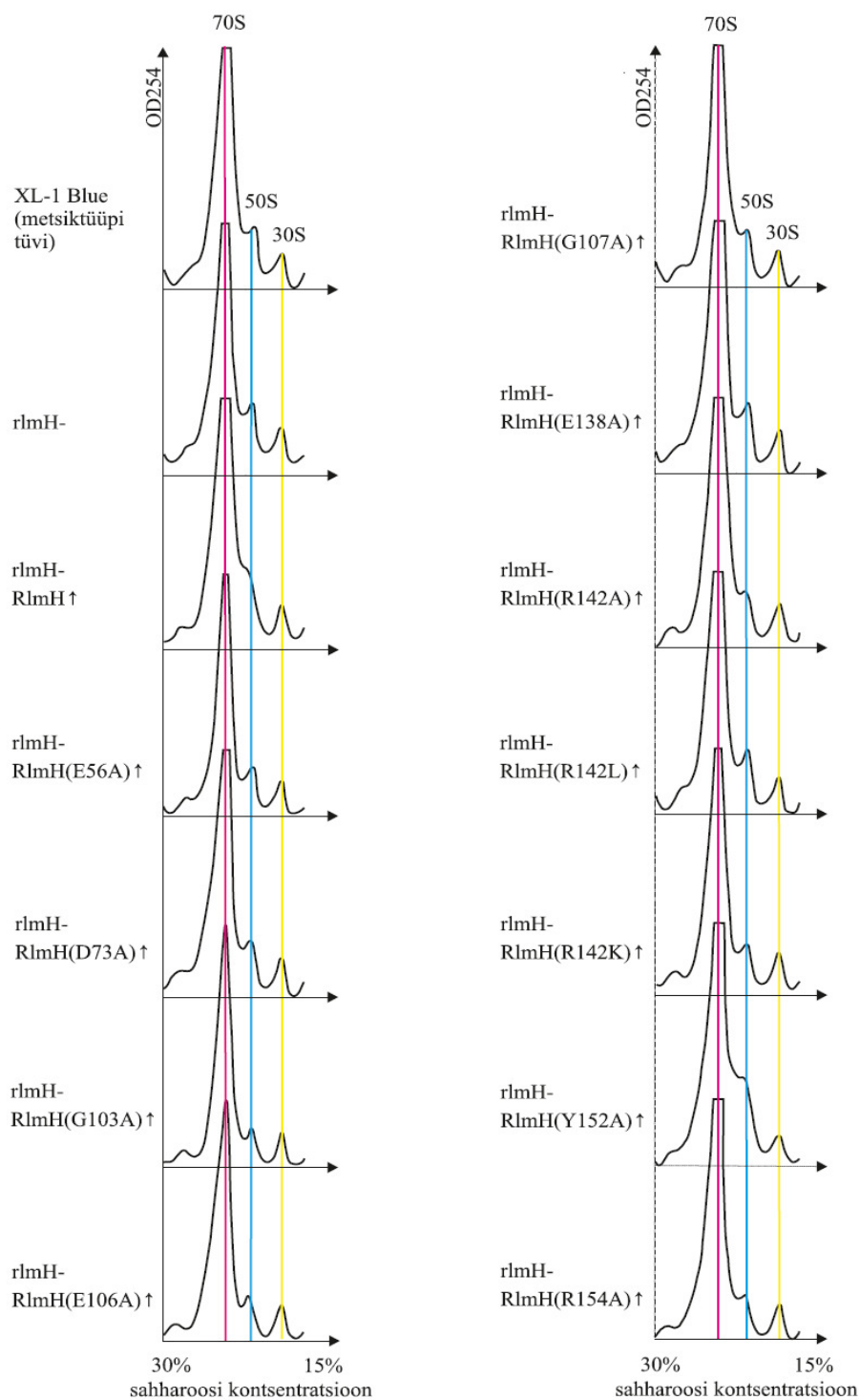


**Joonis 13. Mutantseid *rlmH* gene sisaldavate plasmiidide huvipakkuvate regioonide nukleotiidne järjestus.** Joonisel on kollaste kastidega näidatud metsiktüüpi *rlmH* geeni ning mutantseid *rlmH* gene sisaldavate plasmiidide sekveneerimisel saadud huvipakkuvate koodonite piktogramm ja nukleotiidne järjestus. Lisaks on näidatud huvipakkuva koodoni poolt kodeeritud aminohape ning selle positsioon RlmH valgus.

### 2.2.2. Mutantsete RlmH valkude ekspressiooni mõju ribosoomide profiilile

Järgnevalt sooviti teada, kas mutantsete RlmH valkude ekspresseerimine plasmiidilt mõjutab ribosoomide profiili rakus. Selleks viidi mutantseid *rlmH* gene sisaldavad plasmiidid *E. coli* *rlmH*- tüve rakkudesse, kust on deleteeritud genoomne *rlmH* geen. Võrdlusena kasutati metsiktüüpi *rlmH* geeni sisaldavat plasmidi. RlmH valkude ekspressioon pBAD plasmidi araBAD promooterilt indutseeriti 1 mM arabinoosiga. Lisaks kasutati võrdlusena *E. coli* metsiktüüpi XL-1 Blue tüve rakke, mis kodeerivad metsiktüüpi RlmH valku genoomses DNA-s (RlmH valgu ekspressioon metsiktüüpi promooteri kontrolli all), ning plasmiidita *rlmH*- tüve rakke, kus RlmH valku ei ekspresseerita üldse. Rakud lüüsi ning ribosoomide

profiile analüüsiti sahharoosi gradiendis tsentrifuugimisega. Ribosoomi profiilid on esitatud joonisel 14.



**Joonis 14. Mutantsete RlmH valkude ekspresseerimise mõju ribosoomide profiilile.** Joonisel on näidatud *E. coli* metsiktüüpi XL-1 Blue tüve, rlmH- tüve ning metsiktüüpi või mutantseid RlmH valke ekspresseeriva rlmH- tüve ribosoomide profiilid 254 nm juures 15-30% sahharoosigradiendis tsentrifuugimisel. Sulgudes on näidatud aminohappe asendus mutantsete RlmH valkude korral. Noolega (↑) on tähistatud arabiinosis sõltuv valkude ekspresseerimine plasmiidilt.



Ribosoomide profiilid on asetatud kohakuti. 70S ribosoomide fraktsiooni on näidatud läbiva roosa joonega ning 50S subühikud ja 30S subühikud vastavalt sinise ja kollase joonega.

Ribosoomide profiili analüüsist selgus, et ei RlmH valgu puudumine rlmH- tüves ega ka selle ekspressioon nii metsiktüüpi kui ka mutantsel kujul ei mõjuta märgatavalt ribosoomide profiili rakus. Ribosoomi 50S ja 30S subühikute omavaheline suhe ning suhe 70S ribosoomidesse sarnanes kõikide analüüsitud tüvede korral metsiktüüpi XL-1 Blue tüve omale (Joonis 14). Samuti ei olnud ribosoomi profiilidel näha subühikute moodustumise vahepartiklite kuhjumist ega märgatavalt aeglasemat rakkude kasvu (tulemused ei ole näidatud), mis tõttu võiks väita, et ribosoomide süntees ja funktsioneerimine ei olnud analüüsitud tüvedes häiritud.

### **2.2.3. RlmH valgu mutatsioonide mõju 23S rRNA 1915. positsiooni metüleerimisele**

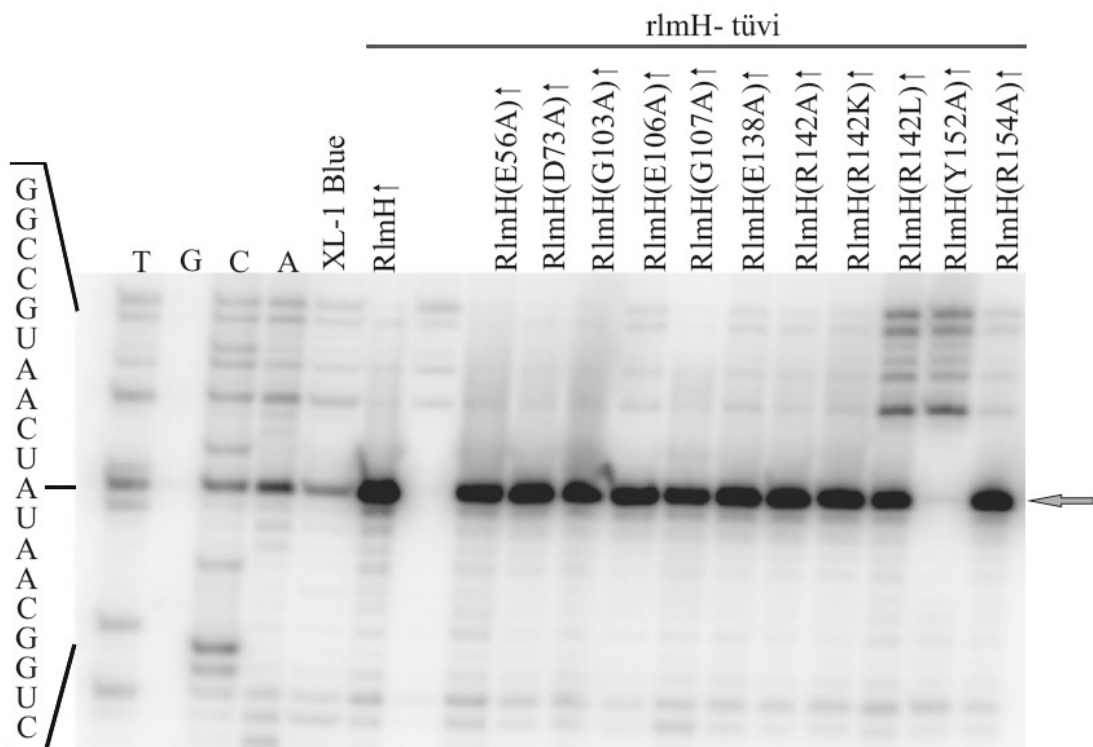
*E. coli* RlmH valk kannab metüülrühma kofaktor SAM-ilt ribosoomi suure subühiku 23S rRNA 1915. positsioonis paikneva pseudouridiini N3 aatomile (Joonis 6). Hindamaks potentsiaalselt oluliste aminohapete asenduste mõju RlmH valgu aktiivsusele, analüüsiti 23S rRNA 1915. positsiooni metüleerituse taset rlmH- tüves metsiktüüpi ning mutantsete RlmH valkude ekspressiooni korral.

Metüülrühma lisamine pseudouridiini 3. positsiooni lämmastiku aatomi külge kaotab selle positsiooni vesiniksidemes osalemise võime ning takistab klassikalise Watson-Crick aluspaari moodustumist (Joonis 6). Selle tõttu on võimalik tuvastada antud metüülrühma olemasolu praimerkestensiooni meetodiga. Pöördtranskriptaas (RNA-sõltuv DNA polümeraas) pikendab praimerit kuni N3 positsioonist metüleeritud pseudouridiinini, ent edasine praimerit pikendamine on takistatud (Joonis 12).

Ribosoomi profiilide analüüsimise käigus (Joonis 14) koguti 70S ribosoomide fraktsioonid, millest eraldati ribosomaalne RNA. rRNA-d kasutati matriitsina praimerkestensiooni reaktsioonis. Sünteesitud radioaktiivset märget sisaldavad DNA fragmendid lahutati urea-polüakrüülamiidgeelis elektrofooresil ning visualiseeriti Typhoon Scanner PhosphoImageriga. Tulemused on esitatud joonisel 15.

Praimerit ekstensioonanalüüs näitas, et 23S rRNA 1915. positsiooni pseudouridiini N3 aatom on metsiktüüpi *E. coli* XL-1 Blue tüves metüleeritud, ent rlmH- tüves, kus genoomne *rlmH* geen on deleteeritud, vastav metülatsioon puudub. See kinnitab veelkord, et RlmH on *E. coli* 23S rRNA m<sup>3</sup>Ψ1915-metüültransferaas. Kui rlmH- tüve rakkudesse viia metsiktüüpi RlmH valku ekspresseeriv plasmid, siis on näha 1915. positsiooni metülatsioonile vastavat

stopp-signaali, kusjuures stopp-signaali on tugevam kui metsiktüüpi tüve korral, viidates asjaolule, et metsiktüüpi tüves on alla 100% 23S rRNA molekulidest 1915. positsioonist metüleeritud. Võib oletada, et metsiktüüpi tüves ekspresseeritakse genoomselt DNA-lt (RlmH ekspressiooni kontrollib metsiktüüpi promooter) RlmH valku madalamal tasemel kui plasmiidilt arabinoosiga ekspressiooni indutseerimise korral. RlmH(E56A), RlmH(D73A), RlmH(G103A), RlmH(E106), RlmH(G107A), RlmH(E138A), RlmH(R142A), RlmH(R142K) ning RlmH(R154A) mutantsete valkude ekspresseerimisel rlmH- tüves oli 23S rRNA 1915. positsiooni metüleerituse tase võrreldav metsiktüüpi RlmH ekspresseerimisele rlmH- tüves. Metüleerituse tase oli madalam RlmH(R142L) valgu ekspresseerimise korral rlmH- tüves. RlmH(Y152A) mutantse valgu ekspresseerimisel rlmH- tüves aga 23S rRNA 1915. positsiooni ei metüleerita (Joonis 15).

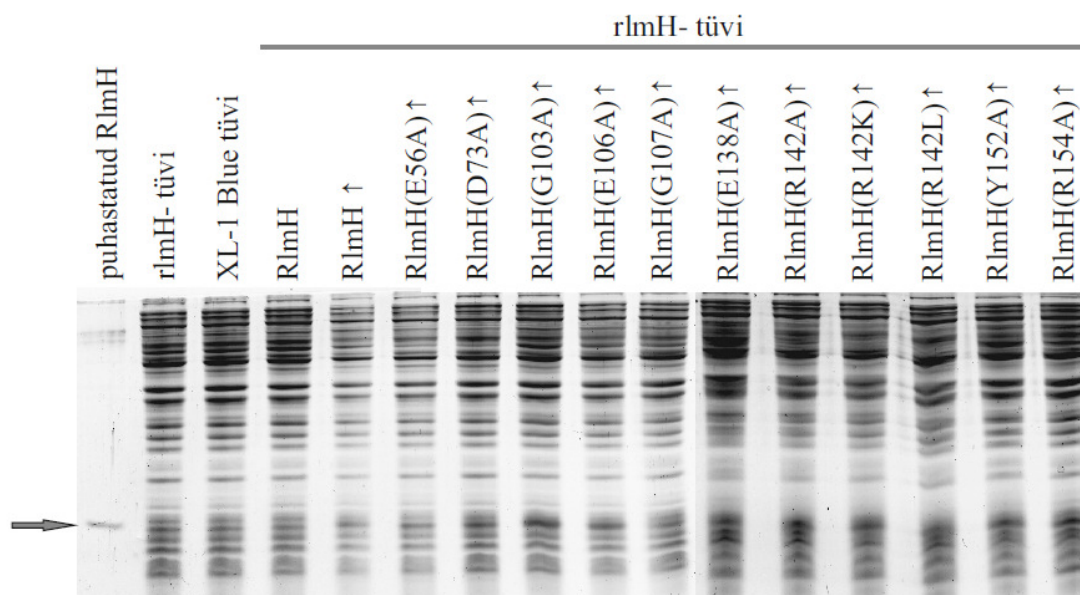


**Joonis 15. RlmH valgu mutatsioonide mõju 23S rRNA 1915. positsiooni metüleerimisele.** Joonisel on näidatud *E. coli* metsiktüüpi XL-1 Blue tüve, rlmH- tüve ning metsiktüüpi või mutantseid RlmH valke ekspresseeriva rlmH- tüve 23S rRNA heeliks 69 regiooni primerekstensiooni reaktsiooni produktid lahutatuna 7% urea-poliakrüülamiidgeelis elektrofooresil. Sulgudes on näidatud aminohappe asendus mutantsete RlmH valkude korral ning noolega (↑) on tähistatud arabinoosist sõltuv valkude ekspresseerimine pBAD plasmiidilt. Radadel T, G, C ja A on vastavate sekveneerimisreaktsioonide produktid. Heeliks 69 järjestus on toodud geelist vasakul. 1915. positsioonile vastav tugev stopp-signaali näitab metüülrühma olemasolu.

Tõenäoliselt mõjutavad mutatsioonid R142L ning Y152A RlmH valgu aktiivsust, samas on võimalik, et erinevused 23S rRNA 1915. positsiooni metüleerituses on põhjustatud sellest, et mingil põhjusel on häiritud RlmH(R142L) ja RlmH(Y152A) valkude ekspressioon rlmH-tüves.

#### 2.2.4. Mutantsete RlmH valkude ekspressiooni kontroll

Viimaks sooviti kontrollida metsiktüüpi ning mutantsete RlmH valkude ekspressiooni rlmH-tüves. RlmH valkude ekspressioon pBAD plasmidi araBAD promooterilt indutseeriti 1 mM arabinoosi lisamisega söötmele. Võrdluseks kasvatati pBAD plasmiidita rlmH- tüve ning metsiktüüpi XL-1 Blue tüve rakke. Rakud lüüsiiti ning analüüsiti SDS-poliakrüülamiidgeelis elektroforeesil, mille tulemusena rakkudes leiduvad valgud lahutatakse molekulmasside järgi. Tulemused on esitatud joonisel 16.



**Joonis 16. Mutantsete RlmH valkude arabinoos-sõltuv ekspressioon.** Joonisel on näidatud *E. coli* metsiktüüpi XL-1 Blue tüve, rlmH- tüve ning metsiktüüpi või mutantseid RlmH valke ekspresseerivate rlmH- tüvede valgu koostise analüüs 15% SDS-poliakrüülamiidgeelis elektroforeesil. Sulgudes on näidatud aminohappe asendus mutantsete RlmH valkude korral ning noolega (↑) on tähistatud arabinoosist sõltuv valkude ekspresseerimine pBAD plasmiidilt. Näidatud on RlmH valgu asukoht rakulüsaadis, mis on määratud puhastatud RlmH valgu järgi.

RlmH on väike valk (vaid 155 aminohapet pikk ning molekulmassiga 14.2 kDa), mis jääb isegi 15% poliakrüülamiidi kasutamise korral geelelektroforeesi lahutuvuse piirile. Sellele vaatamata on ekspressioonanalüüsi põhjal võimalik väita, et pBAD plasmiidilt toimub nii metsiktüüpi kui kõikide mutantsete RlmH valkude (seal hulgas kahtluse all olnud RlmH(R142L) ning RlmH(Y152A) valkude) ekspressioon (Joonis 16). Kusjuures RlmH

valgu ekspressiooni tase plasmiidilt on märgatavalt kõrgem ekspressiooni tasemest metsiktüüpi XL-1 Blue tüves, kus *rlmH* geen on kodeeritud genoomse DNA poolt ning RlmH valgu ekspressiooni kontrollib metsiktüüpi promooter. Kuigi RlmH valgu ekspressioonitaseme kohta metsiktüüpi rakkudes andmed puuduvad, on saadud tulemus kooskõlas varasemate tähelepanekutega, mille kohaselt RNA modifikatsiooniensüüme ekspresseeritakse rakkudes madalal tasemel. Samas on pBAD plasmid disainitud valkude efektiivseks ekspressiooniks ja puhastamiseks.

Kirjeldatud katsetulemustest lähtuvalt võib väita, et 142. positsiooni arginiini asendamine leutsiiniga muudab RlmH valgu vähem aktiivseks ning 152. positsiooni türosiini asendaminealaniiniga inaktiveerib valgu täielikult. See omakorda viitab asjaolule, et arginiin-142 ning eelkõige türosiin-152 on olulised RlmH valgu katalüütilises aktiivsuse tagamisel ning neid võib pidada katalüütilisteks aminohapeteks.

### 2.2.5. Arutelu

Kõikide elusorganismide ribosoomid sisaldavad hulgaliselt erinevaid modifitseeritud nukleotiide. Lisaks uridiinide isomeriseerimisele pseudouridiinideks on laialdaselt levinud rRNA post-transkriptsiooniliseks modifitseerimiseks metüülrühma lisamine. Metüülrühma võib lisada nii lämmastikaluste aromaatses tsüklis olevatele kui ka mitte-tsüklilistele süsiniku ja lämmastiku aatomitele. Lisaks metüleeritakse rRNA ribooside 2'-positsiooni hapniku aatomeid (Ofengand ja Del Campo 2006; Lapeyre 2005).

*Escherichia coli* RlmH on ensüüm, mis lisab metüülrühma 23S rRNA heeliks 69-s paikneva pseudouridiin-1915 3. positsiooni aromaatses lämmastiku aatomile, moodustades  $m^3\Psi1915$  (Ero jt 2008; Purta jt 2008). 23S rRNA  $m^3\Psi1915$  on ainus metüleeritud pseudouridiin bakteris ning, veelgi enam, ainus teadaolev pseudouridiini 3. positsiooni aromaatses lämmastiku metülatsioon terves eluslooduses (Kowalak jt 1996; Ero jt 2008). Seega on intrigeeriv, kuidas RlmH valk suudab eristada oma substraati pseudouridiini struktuuri poolest väga sarnasest uridiinist, ning millise mehhanismiga toimub metüülrühma ülekande kofaktorilt S-adenosüül-L-metioniinilt (SAM) pseudouridiini N3 aatomile.

RlmH valgu substraadispetsiifika ning katalüüsimehhanismi analüüsil lähtuti sarnasusest TrmD valguga. TrmD valk on RlmH valgu lähim teadaoleva ülesandega sugulane SPOUT RNA metüültransferaaside super-perekonnas (Tkaczuk jt 2007). Sarnaselt RlmH-ga katalüüsib TrmD lämmastikaluse aromaatses lämmastiku metüleerimist. Ent erinevalt RlmH-st on TrmD substraadiks tRNA, mitte rRNA, ning metüülrühm kantakse pseudouridiini 3.

positsiooni lämmastiku asemel guanosiini 1. positsiooni lämmastikule (Elkins jt 2003; Christian ja Hou 2007). TrmD katalüüsimehhanismi kohta on küllaltki palju teada, lisaks on kirjeldatud TrmD kristallstruktuuri kompleksis kofaktoriga (Ahn jt 2003; Elkins jt 2003; Christian ja Hou 2007). Kahjuks ei ole kumbagi valku õnnestunud kristalliseerida kompleksis substraadiga.

Kristallstruktuuri põhjal ennustati, et TrmD katalüüsimehhanism on järgmine: tRNA G37 nukleotiid seondub ensüümi aktiivsai, konserveerunud asparagiinhape (D169) osaleb prootoni eemaldamisel, misjärel 1. positsiooni lämmastik muutub nukleofiilseks ning atakeerib SAM-i metüülrühma. TrmD konserveerunud arginiin-154 (R154) on vajalik negatiivse laengu kompenseerimiseks ning konserveerunud glutamiinhape-116 (E116) osaleb substraadi sidumisel (Ahn jt 2003; Elkins jt 2003). TrmD valgu D169, R154 ja E116 aminohapete olulisus katalüüsis leidis kinnitust mutageneesanalüüsil, kui selgus, et D169 või R154 asendaminealaniiniga inaktiveerib TrmD valgu täielikult ning E116 asendaminealaniiniga pärsib TrmD aktiivsust märgatavalt (Elkins jt 2003).

TrmD aminohapetele R154 ja E116 vastavad RlmH valgu struktuuris konserveerunud R142 ning mitte-konserveerunud E106, ent TrmD aminohapetele D169 vastavat aminohapet RlmH kristallstruktuuris ei esine (Joonis 8; Purta jt 2008). Selle asemel võivad katalüütilise aluse rolli omada näiteks glutamiinhape-56 (E56), asparagiinhape-73 (D73), või glutamiinhape-138 (E138), mis on RlmH valgu primaarjärjestuses kõrgelt konserveerunud ning võivad konformatsiooniliste muutuste tulemusena sattuda aktiivsai sobivasse positsiooni prootoni eemaldamiseks pseudouridiinilt. Lisaks paiknevad RlmH valgu oletatava aktiivsai vahetusläheduses kõrgelt konserveerunud aminohapped glütsiin-103 (G103), glütsiin-107 (G107), türosiin-152 (Y152) ja arginiin-154 (R154), millest G103 ja G107 osalevad tõenäoliselt kofaktori SAM sidumisel (Anantharaman jt 2002) ning Y152 ja R154 võivad olulised olla substraadi sidumisel.

RlmH valgu substraadi sidumise ning katalüüsi seisukohast huvipakkuvate aminohapete asendamiselalaniiniga (väike ja hüdrofoobne aminohape) selgus, et ainult asendus Y152A inaktiveeris valgu täielikult (Joonis 15). Kuna TrmD valgus Y152 vastav aminohape puudub, võib oletada, et RlmH valgu 152. positsioonis paiknev universaalselt konserveerunud türosiin on oluline RlmH valgu spetsiifilise substraadi (pseudouridiini) äratundmisel ning katalüütilise saidi stabiliseerimisel. Kui TrmD korral R154 asendaminealaniiniga inaktiveeris valgu täielikult, siis vastava RlmH arginiini (R142) asendamine struktuurselt ja funktsionaalselt sarnase lüsiini (K) või erinevaalaniiniga (A) ei pärssinud märgatavalt valgu aktiivsust (Joonis 15). Küll aga vähendas RlmH valgu aktiivsust R142 asendamine leutsiiniga

(L), mis on suurem hüdfoobne aminohape kuialaniin. Tundub, et RlmH valgu korral on R142 tähtsus substraadi sidumisel ning negatiivse laengu stabiliseerimisel väiksem R154 omast TrmD valgu korral. Huvitava kombinatsioon ühegi potentsiaalse katalüütilise aluse (E56, D73 ja E138) asendamine alaniniga ei inaktiveerinud RlmH valku (Joonis 15). Kuna rohkem konserveerunud negatiivselt laetud katalüütilise aluse kandidaatide aktiivsaiidi läheduses ei paikne, on vägagi tõenäoline, et RlmH poolt läbiviidav metülatsioonireaktsioon erineb TrmD omast ning vajab edasist uurimist.

*Escherichia coli* RlmH valgu katalüütilise mehhanismi kirjeldamisest võib olla abi Bowen-Conradi sündroomi molekulaarsete tagamaade mõistmisel. Hiljuti avastati, et mutatsioon inimese Nep1 valgus põhjustab Bowen Conradi sündroomi: väga varases lapsepõlves surmaga lõppevat pärilikku haigust, mis väljendub tugevas vaimses ja füüsilises väärarengus (Armistead jt 2009). Nep1 valk katalüüsib metüülrühm ülekannet kofaktorilt SAM inimese ribosoomi 18S rRNA 1911. positsioonis paikneva pseudouridiini 1. positsiooni aromaatsesse lämmastikule, kuid täpne reaktsioonimehhanism ei ole veel teada. (Meyer jt 2010). Nep1 valk kuulub samuti SPOUT RNA metüültransferaaside perekonda ning on struktuuri ja substraadispetsiifika (teadaolevalt on RlmH ja Nep1 ainukesed pseudouridiini metüleerivad valgud) poolest väga sarnane bakteriaalse RlmH valguga (Tkaczuk jt 2007).

Laiemas perspektiivis on rRNA modifikatsioonensüümide struktuuri ja katalüütiliste mehhanismide tundmine erinevates organismides oluline biomeditsiinis, olles aluseks näiteks uue põlvkonna (kõrge spetsiifilisusega ja afiinsusega) antibiootikumide väljatöötamisel.

Bakter, eelkõige *Escherichia coli*, on hea mudelorganism, uurimaks kogu eluslooduse ulatuses konserveerunud molekulaarseid protsesse. Kuna *E. coli* kasvab laboritingimustes kiiresti ja on suhteliselt kergesti geneetiliselt manipuleeritav, on seda mudelorganismina kasutatud aastakümneid, seetõttu ei tohiks alahinnata *E. coli* panust teaduse ja meditsiini arengusse. Ribosoomide biosünteesi, translatsiooni ja erinevate ensüümide töömehhanismide uurimine kõrgemates organismides, sealhulgas inimeses, on ebaeetiline ja tehniliselt komplitseeritud, ent teadmised nende protsesside kohta on vajalikud molekulaarmeditsiini seisukohalt, leidmaks uusi ning tõhusamaid viise inimeste ravimiseks.

## KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli välja selgitada, millised on *Escherichia coli* metüültransferaasi RlmH katalüütilised aminohapped. RlmH katalüüsib 23S rRNA heeliks 69-s positsioonis 1915 asuva pseudouridiini metüleerimist. Kui RlmH oletatavas aktiivsaiidis või selle läheduses paiknevate

konserveerunud aminohapete asendamine pädib 23S rRNA 1915. positsiooni pseudouridiini metülatsiooni osalise või täieliku puudumisega, on alust arvata, et vastavate aminohapete puhul on tegu RlmH katalüütiliste aminohapetega.

RlmH valgu aminohappelise järjestuse muutmiseks sisestati punktmutatsioonid *rlmH* geeni vastavatesse koodonisse. Mutatsioone sisaldavad *rlmH* geenid kloneeriti valgu ekspressioonivektorisse ning mutantsed RlmH valgud ekspresseeriti *E. coli* tüves, mis ei tooda metsiktüüpi RlmH valku. Erinevaid mutantseid RlmH valke tootvatest tüvedest eraldati ribosomaalne RNA ning analüüsiti 23S rRNA 1915. positsiooni metüleeritust.

Selgus, et 142. positsiooni arginiini asendamine leutsiiniga (R142L) vähendas RlmH valgu aktiivsust ning 152. positsiooni türosiini asendaminealaniiniga (Y152A) muutis valgu inaktiivseks. Sellest lähtuvalt on RlmH katalüütilisteks aminohapeteks R142 ning eelkõige Y152. Lisaks selgus, et RlmH-i reaktsioonimehhanism erineb kõigist seni kirjeldatud metülatsioonimehhanismidest. RlmH valgu unikaalne reaktsioonimehhanism on kooskõlas asjaoluga, et tõenäoliselt on tegu ainsa valguga eluslooduses, mis tunneb ära pseudouridiini ning kannab metüülrühma 3. positsiooni lämmastikule.

Hoolimata teaduse ja tehnika kiirest arengust on RNA modifikatsioonidega seotud veel palju mõistatusi, mille lahendamine aitaks paremini mõista nii universaalset valgu biosünteesiprotsessi kui ka seda mõjutavate ensüümide tööd ning metabolismi. Metüültransferaasi RlmH katalüütiliste aminohapete kindlakstegemine võimaldab selgitada reaktsioonimehhanismi, mille tulemusena toimub 23S rRNA heeliks 69 1915. positsioonis paikneva pseudouridiini metüleerimine. Metüültransferaasi RlmH tööprotsessi detailne kirjeldamine ning selle tulemusena tekkiva rRNA modifikatsiooni rolli mõistmine on oluline teadmine nii molekulaaribioloogia kui ka biomeditsiini seisukohalt.

## KASUTATUD ALLIKAD

**Ahn, H. J., Kim, H. W., Yoon, H. J., Lee, B. I., Suh, S. W., Yang, J. K.** (2003) Crystal Structure of tRNA(m1G37)Methyltransferase: Insights into tRNA Recognition, *EMBO J.*, Vol 22, lk 2593–2603

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. et al.** (2002) *Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* New York: Garland Science

**Ali, I.K., Lancaster, L., Feinberg, J., Joseph, S., Noller, H.F.** (2006) Deletion of a Conserved, Central Ribosomal Intersubunit RNA Bridge, *Mol Cell.*, Vol 23, lk 865–874

**Anantharaman, V., Koonin, E.V., Aravind, L.** (2002) SPOUT: a Class of Methyltransferases that Includes spoU and trmD RNA Methylase Superfamilies, and Novel Superfamilies of Predicted Prokaryotic RNA Methylases, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, Vol 2, lk 71–75

**Armistead, J., Khatkar, S., Meyer, B., Mark, B.L., Patel, N., Coghlan, G., Lamont, R.E., Liu, S., Wiechert, J., Cattini, P.A., Koetter, P., Wrogemann, K., Greenberg, C.R., Entian, K.D., Zelinski, T., Triggs-Raine, B.** (2009) Mutation of a gene essential for ribosome biogenesis, EMG1, causes Bowen-Conradi syndrome, *Am J Hum Genet.*, Vol 84, lk 728–739

**Benach, J., Shen, J., Rost, B., Xiao, R., Acton, T., Montelione, G., Hunt, J.F.** (2003) X-Ray Structure Of Ybea From *E.Coli*, Northeast Structural Genomics Research Consortium (Nesg) Target Er45

**Byström, A.S., Björk, G.R.** (1982) Chromosomal Location and Cloning of the Gene (trmD) Responsible for the Synthesis of tRNA (m1G) Methyltransferase in *Escherichia coli* K-12, *Mol Gen Genet.*, Vol 188, lk 440–446

**Christian, T. ja Hou, Y.** (2007) Distinct Determinants of tRNA Recognition by the TrmD and Trm5 Methyl Transferases, *Journal of Molecular Biology*, Vol 373, lk 623–632

**Elkins, P.A., Watts, J.M., Zalacain, M., van Thiel, A., Vitazka, P.R., Redlak, M., Andraos-Selim, C., Rastinejad, F., Holmes, W.M.** (2003) Insights Into Catalysis by a Knotted TrmD tRNA Methyltransferase, *J Mol Biol.*, Vol 333, lk 931–949

**Ero, R., Leppik, M., Liiv, A** (2010) Specificity and Kinetics of 23S rRNA Modification Enzymes RlmH and RluD, *RNA*, Vol 11, lk 2075–2084

**Ero, R., Peil, L., Liiv, A.** (2008) Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*, *RNA*, Vol 10, lk 2222–2233

**Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chaprnan, M.S., Frank, J.** (2003) Study of the structural dynamics of the *E coli* 70S ribosome using real-space refinement, *Cell*, Vol 113, lk 789–801

**Grosjean, H.** (2005) Modification and Editing of RNA: Historical Overview and Important Facts to Remember, *Current Genetics*, Vol 12, lk 1–22



- 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*, Vol 11, lk 1141–1152
- Hamma, T. ja Ferré-D'Amaré, A.** (2006) Pseudouridine Synthases, *Chemistry and Biology*, Vol 13, lk 1125–1135
- Hirabayashi N., Sato N.S., Suzuki T.** (2006) Conserved Loop Sequence of Helix 69 in *Escherichia coli* 23 S rRNA Is Involved in A-site tRNA Binding and Translational Fidelity, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 281, lk 17 203–17 211
- Huang L., Ku J., Pookanjanatavip M., Gu X., Wang D., Greene P.J., Santi D.V.** (1998) Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry*, Vol 37, lk 15951–15957
- Ibba, M. ja Söll, D.** (2001) The Renaissance of Aminoacyl-tRNA Synthesis, *EMBO reports*, Vol 21, lk 382–387
- Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M.** (2007) Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*, *Microbiol Mol Biol Rev*, Vol 71, lk 477–494
- Kowalak, J.A., Bruenger, E., Hashizume, T., Peltier, J.M., Ofengand, J., McCloskey, J.A.** (1996) Structural Characterization of U<sup>\*</sup>-1915 in Domain IV from *Escherichia coli* 23S Ribosomal RNA as 3-methylpseudouridine, *Nucleic Acid Research*, Vol 24, lk 688–693
- Lapeyre, B.** (2005) Conserved Ribosomal RNA Modification and Their Putative Roles in Ribosome Biogenesis and Translation, *Current Genetics*, Vol 12, lk 263–284
- Leppik, M., Peil, L., Kipper, K., Liiv, A., Remme, J.** (2007) Substrate Specificity of the Pseudouridine Synthase RluD in *Escherichia coli*, *FEBS*, Vol 274, lk 5759–5766
- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, Ü, Remme, J.** (2005) Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis, *BMC Molecular Biology*, Vol 6, lk 6–18
- Limbach, A.P., Crain, P.F., McCloskey, J.A.** (1994) Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acid Research*, Vol 22, lk 2183–2196
- Maiväli, Ü. ja Remme, J.** (2004) Definition of Bases in 23S rRNA Essential for Ribosomal Subunit Association, *RNA*, Vol 10, lk 600–604
- Meyer, B., Wurm, J.P., Kötter, P., Leisegang, M.S, Schilling, V., Buchhaupt, M., Held, M., Bahr, U., Karas, M., Heckel, A., Bohnsack, M.T., Wöhnert, J., Entain, K.** (2010) The

Bowen-Conradi Syndrome Protein Nep1 (Emg1) Has a Dual Role in Eukaryotic Ribosome Biogenesis, as an Essential Assembly Factor and in the Methylation of Ψ1191 in Yeast 18S rRNA, *Nucleic Acid Research*, Vol 1, lk 1–12

**Moore, P.B. ja Steitz, T.A.** (2003) The Structural Basis of Large Ribosomal Subunit Function, *Annual Review of Biochemistry*, Vol 72, lk 813–850

**Ofengand, J., Remme, J., Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L., Kaya, Y.** (2001) Pseudouridines and Pseudouridine Synthases of the Ribosome, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol 66, lk 147–159

**Purta, E., Kaminska, K.H., Kasprzak, J.M., Bujnicki, J.M., Douthwaite, S.** (2008) YbeA is the m<sup>3</sup>Ψ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA, *RNA*, Vol 14, 2234–2244

**Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B.G., Ofengand, J.** (1998) A Pseudouridine Synthase Required for the Formation of Two Universally Conserved Pseudouridines in Ribosomal RNA Is Essential for Normal Growth of *Escherichia coli*, *RNA*, Vol 4, lk 1407–1417

**Tkaczuk, K.L., Dunin-Horkawicz, S., Purta, E., Bujnicki, J.M.** (2007) Structural and Evolutionary Bioinformatics of the SPOUT Superfamily of Methyltransferases, *BMC Bioinformatics*, Vol 73, lk 1–31

**Vaidyanathan, P.P., Deutscher, M.P., Malhotra, A.** (2007) RluD, a Highly Conserved Pseudouridine Synthase, Modifies 50S Subunits More Specifically and Efficiently than Free 23S rRNA, *RNA*, Vol 12, lk 1868–1876

**Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R.** (2004) *Molecular Biology of the Gene. 5th edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Wilson D.N., Nierhaus K.H.** (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation, *Crit Rev Biochem Mol Biol.* ,Vol 42, lk 187–219.

**Wilson, D.N. ja Nierhaus, K.H.** (2003) The Ribosome through the Looking Glass, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol 42, lk 3464–3486

**Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., 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*, Vol 9, lk 883–896

**Ofengand ja Del Campo** (2006) *Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and Molecular Biology:

[http://ecosal.aptaracorp.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=526&catid=44&Itemid=139](http://ecosal.aptaracorp.com/index.php?option=com_content&view=article&id=526&catid=44&Itemid=139) (külastatud 27.02.2011)

Modomics, RNA modifikatsioonide andmebaas: <http://modomics.genesilico.pl/> (külastatud 27.02.2011)