

Sisukord

Sisukord.....	1
Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
2. Ratchet-like liikumine eukarüootses 80S ribosoomis.....	12
3. <i>E. coli</i> 16S rRNA nukleotiidid, mis on kaitstud subühikute vahelisel assotsiatsioonil.....	16
4. 23S rRNA positsioonid, mis mängivad olulist rolli 70S ribosoomi assotsiatsioonis.....	17
5. Funktsionaalsed interaktsioonid 16S rRNA-s.....	21
6. Subühikute vaheliste interaktsioonide toimumine ajas.....	25
7. 16S rRNA mittersilduvate hapnike mõju 30S subühiku assambleerumisele ja 70S assotsiatsioonile.....	27
8. Eksperimentaalne osa.....	28
Töö eesmärk.....	28
8.1 Materjalid ja meetodid.....	28
8.2 Tulemused.....	30
8.3 Arutelu.....	34
Kokkuvõte.....	39
Summary.....	39
Viited.....	40
Lisa.....	47

Kasutatud lühendid

aa-tRNA – aminoatsüül-tRNA
B1a-B12 – subühikute vahelised sillad
CAT - klooramfenikoli atsüültransferaas
CMCT - 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p- toluene sulfonate
cryo-EM – cryo-elektronmikroskoopia
DEPC - dietüülpürokarbonaat
DMS - dimetüülsulfaat
E. coli – *Escherichia coli*
eEF2 - -eukarüoodi elongatsiooni faktor 2
EDTA - etüleen-diamiin-tetraatsetaat
EF-G – elongatsiooni faktor G
EF-Tu – elongatsiooni faktor Tu
fMet-tRNA^{fMet} – formüülmetioniin-tRNA
GAC – GTPaas-assotseerunud tsenter
GFP – roheline fluorestseeruv valk
GNRA – guaniin-suvaline nukleotiid-puriin-adeniin
GTP – guanosiintrifosfaat
H. marismortui – *Haloarcula marismortui*
IF1-3 – initsiatsiooni faktor 1-3
In vitro – katseklaasis (tehistingimustes)
In vivo – looduslikud tingimused
MBS – mRNA-d siduv sait
PEP - fosfoenoolpüruvaat
POST - ribosoomi post-lokatsiooniline seisund (pärast translokatsiooni)
PRE – ribosoomi pre-lokatsiooniline seisund (enne translokatsiooni)
RBS – ribosoomi sidumis sait
RRF – ribosoomi retsükleeriv faktor
rRNA – ribosomaalne ribonukleiinhape
SRL – sartsiiini-ritsiini luup
T. thermophilus – *Thermus thermophilus*

Sissejuhatus

Ribosoom on makromolekul, mis koosneb kahest subühikust. Palju on veel ebaselgust, kuidas subühikud assambleeruvad, assotseeruvad ja millised keemilised grupid osalevad kindlatel etappidel valgusünteesi ajal. Minu uurida oli see translatsiooni etapp, kus juba assambleerunud ribosoomi subühikud assotseeruvad omavahel. Seega ülesandeks oli vaja välja selgitada rRNA positsioonid, mis on hädavajalikud ribosoomi tekkeks ja subühikute koospüsimiseks. Kasutades keemilist footprintingu meetodit ja modifikatsiooni interferentsi meetodit, oli tehtud juba paarkümmend aastat tagasi kindlaks, et subühikute vahelises interaktsioonis osaleb rRNA (Chapman and Noller, 1977; Herr and Noller, 1979; Herr et al., 1979). Esimene konkreetne subühikute vaheline kontakt saadi 23S rRNA heeliksi 69 ja 16S rRNA heeliksi 44 ja 45 vahel. Selleks kasutati keemilise ristsidumise meetodit (Mitchell et al., 1992). Nüüdseks on keemilise footprintinguga identifitseeritud mitmed rRNA positsioonid, mis on kaitstud 70S ribosoomi formeerumisel (Merryman et al., 1999 a, b). Footprintinguga identifitseeritud subühikute vahelised kontaktid on kooskõlas subühikute vaheliste sildadega. Subühikute vahelised sillad on saadud *Thermus thermophilus*'e ribosoomi kristallstruktuuri mudelist (Yusupov et al., 2001) ja *Escherichia coli* cryo-elektronmikroskoopia (cryo-EM) mudelist (Gabashvili et al., 2000; Gao et al., 2003) ning *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi mudelist (Spahn et al., 2001; 2004). Need struktuuri uuringud identifitseerisid lisaks RNA-RNA kontaktidele ka mõned valk-RNA ja valk-valk interaktsioonid. Yusupov et al., (2001) ja Gao et al. (2003) mudelites on kokku 12 subühikute vahelist silda (B1a - B8), mis moodustavad vähemalt üle 30 erineva interaktsiooni 30S ja 50S subühikute vahel. Täheledatakse, et subühikute vahelised sillad on konserveerunud üle kolme organismide riigi (Spahn et al., 2001; Gao et al., 2003). Lisaks sellele, et subühikute vahelised sillad hoiavad füüsiliselt ribosoomi koos, on nad olulised ka dekodeerimise, translatsioon ja peptidüül-transferaases reaktsioonis (Yusupov et al., 2001; Belanger et al., 2004; Liiv et al., 2005). Hilisemates töödes on üha rohkem pööratud tähelepanu konkreetsetele rRNA positsioonidele ja nende funktsioonidele. Belanger et al., (2004) näitasid, et kui muteerida 16S rRNA heeliksi 27 positsioon A900 või heeliksi 24 aluspaar G769-C810, siis need mutatsioonid segavad subühikute assotsiatsiooni ja vähendavad translatsiooni täpsust. Maiväli and Remme, (2004) identifitseerisid modifikatsiooni-interferentsi meetotiga kolm *E. coli* 23S rRNA adeniini, millede N1 positsiooni metüleerimine DMS-ga (dimetüülsulfaadiga) vähendas 50S subühiku võimet moodustada 70S ribosoom. Nendest kaks adeniini olid 23S rRNA heeliksi 69 positsioonid A1912 ja A1918, mis moodustavad subühikute vahelise silla B2a. Kolmas adeniin oli heeliksi 34 positsioon A716, mis moodustab silla B4. Hannelly et al., (2005) kasutasid modifikatsiooni-interferentsi meetodit koos quench-flow aparaadiga ja genereerisid subühikute vahelisel assotsiatsioonil toimuvate 16S rRNA struktuursete muudatuste mudeli. Neid ajas lahutatud sündmusi võis käsitleda nii, et subühikute vahelisel assotsiatsioonil kontakteeruvad teatud rRNA piirkonnad initsiaalselt ja tekitavad struktuursete muudatusi, mis võimaldavad ülejäänud kontaktidel tekkida. Seega esimesed

subühikute vahelised interaktsioonid moodustuvad 16S rRNA positsioonides A892, A908, A909 (heeliks 27) ja A1408 (heeliks 44). Seejärel protekteerib 50S subühik 16S rRNA positsioone A1418 (sild B5, heeliks 44) ja A1413 (heeliks 44). Kõige aeglasemalt (viimasena) toimub 16S rRNA positsioonide A702 (sild B7a, heeliks 23) ja A1441 (heeliks 44) protekteerimine 50S subühiku poolt.

Ghosh and Joseph, (2005) leidsid, et 16S rRNA positsiooni C770 (sild B2c, heeliks 24) mittedilduvat Rp-hapniku on hädasti vaja 70S ribosoomi tekkeks.

Mina kasutasin oma töös modifikatsiooni-interferentsi meetodit. Seda meetodit kasutades suutsin tuvastada kuus 16S rRNA positsiooni, millede modifitseerimine segab 70S ribosoomi formeerumist *in vitro*. Seega identifitseeritud positsioonid on olulised stabiilse ribosoomi tekkeks ja koospüsimiseks. Modifitseeritud *E. coli* 16S rRNA nukleotiidid A702, A1418 ja A1483 positsioonidest N1 või U793, U1414 ja U1495 positsioonidest N3 takistasid 70S ribosoomi teket.

1. Kirjanduse ülevaade

Ribosoomi subühikute assotsiatsioon on oluline reaktsioon valgusünteesi initsiatsioonil. Kui eubakterite ribosoom on lõpetanud mRNA transleerimise, siis ta dissotseerub ribosoomi retsükleeruva faktori (RRF) ja EF-G-GTP kaasabil 50S ja 30S-mRNA-tRNA kompleksideks (Pavlov et al., 1997; Karimi et al., 1999). RRF on tRNA kujuga valk (Selmer et al., 1999; Kim et al., 2000; Toyoda et al., 2000; Yoshida et al., 2001) ja võib oletada, et EF-G suunab RRF-i ribosoomi A-saidist P-saiti ning seeläbi ribosoom vabaneb deatsetüleeritud tRNA-st (Hirokawa et al., 2002). Tulemuseks on subühikute dissotsiatsioon. Peale subühikute dissotsiatsiooni jääb 30S subühik seotuks mRNA ja tRNA-ga. IF3 on valk, mis kõrvaldab tRNA 30S subühikult (Karimi et al., 1999). Seega IF3 on vahelülis terminatsiooni ja initsiatsiooni etappide vahel. IF3 käitub kui anti-assotsiatsiooni faktor (Sabol et al., 1970; Subramanian et al., 1970), arvatavasti blokeerib ta 30S subühiku selle piirkonna, mis seostub 50S subühikuga (Dallas and Noller, 2001). IF3 takistab 70S ribosoomi teket ka siis, kui initsiaator tRNA on puudu 30S pre-initsiatsiooni kompleksist (Antoun et al., 2004). Valgusünteesi initsiatsiooni etapil IF3 suurendab translatsiooni täpsust. IF3 suurendab selliste ternaarsete komplekside dissotsiatsiooni taset, mis sisaldavad mitte-initsiaator koodonit ja mitte-initsiaator tRNA-d (Risuleo et al., 1976; Hartz et al., 1989; Sussman et al., 1996).

Translatsiooni initsiatsioonil 30S-IF3 kompleks komplekteerib mRNA start koodoni P-saiti, IF1 seondub A-saiti ja IF2-GTP moodustab kontakti mõnema saidiga. Seejärel IF2 kaasab kompleksi P-saiti fMet-tRNA^{fMet} (Gualerzi et al., 2000).

IF1, IF2 ja IF3 seostumiskiirkonnad 30S subühikul on kindlaks tehtud keemilise footprintinguga (Marzi et al., 2003; Dallas and Noller 2001), kristallograafiliselt (Carter et al., 2001) ja cryo-EM (McCutcheon et al., 1999).

Järgmises etapis assotseerub pre-initsiatsiooni kompleksiga 50S subühik, kõrvaldatakse IF1 ja IF3, mille tulemuseks on 70S initsiatsiooni kompleks (Gualerzi et al., 2000). Peale GTP hüdrolyüsi dissotseerub ribosoomilt ka IF2 (Antoun et al., 2003). Lõpuks jääb A-sait vabaks, et siduda aa-tRNA-EF-Tu-GTP ternaarne kompleks ja kui on moodustunud esimene peptiidside, siis algab valgusünteesi elongatsiooni protsess.

70S formeerumist võib pidada viimaseks suuremaks sündmuseks ribosoomi assambleerumisel. Ribosoomi assambleerumine on keeruline protsess, kus osaleb 57 erinevat komponenti, ribosoomi RNA-d (rRNA) ja ribosoomi valgud (r-valgud) (Nierhaus, 1991). Neid sündmusi, mis viivad 70S ribosoomi moodustumiseni on võimalik uurida atomaarsel tasemel, seda tänu viimastel aastatel ilmunud ribosoomi subühikute ja 70S ribosoomi atomaarsetele mudelitele (Ban et al., 2000; Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001; Gao et al., 2003; Spahn et al., 2004). Need kristallstruktuuri mudelid on näidanud, et subühikute vahelises interaktsioonis mängib olulist rolli rRNA ja märksa vähemal määral valgud.

Ribosoomi subühikute assotsiatsiooni analüüsid näitavad, et ribosoomi formeerumiseks (30S + 50S) on vaja ületada küllaltki suur aktivatsiooni energia ~ 80 kJ/mol. Kõige rohkem energiat kulutatakse 30S subühiku adaptatsiooniks ja see etapp on limiteeriv 70S ribosoomi moodustamiseks. 50S subühiku adaptatsiooniks ja assotsiatsiooni etapi enese toimumiseks on vaja suhteliselt vähe energiat, seega peamise komponendi aktivatsiooni energiast moodustab 30S subühiku kohandamine (konformatsioonilised muutused) assotsiatsiooniks (Blaha et al., 2002). Kui subühikud on aktiveeritud, siis 70S ribosoomi assotsiatsioon toimub suhteliselt kergelt, millele vastab aktivatsiooni energia ~ 23 ± 7 kJ/mol (Görisch et al., 1976; Hui Bon Hoa et al., 1977).

Subühikute vaheline interaktsioon sõltub olulisel määral ka Mg^{2+} kontsentratsioonist (Blaha et al., 2002). Maksimaalne *in vitro* assotsiatsioon saavutatakse 20 mM Mg^{2+} juuresolekul. Kui 6 mM Mg^{2+} kontsentratsiooni juures on 70S ribosoomi moodustunud 31%, siis 20 mM juures on ribosoomide hulk 77%. *In vivo* tingimustes on Mg^{2+} kontsentratsioon 2-4 mM ja assotsiatsioonile aitavad kaasa ka polüamiinid (olulisemad spermidiin ja spermiin) (Nierhaus et al., 2000). Optimaalne Mg^{2+} kontsentratsioon valgu sünteesiks polüamiinide puudumisel on 8-11 mM (Lucas-Lenard and Lipmann, 1967; Chinali and Parmeggiani, 1982) ja polüamiidide olemasolul 3-5 mM Mg^{2+} (Nierhaus et al., 2000).

Struktuursed dünaamilised muutused ribosoomis

Ribosoomi assotsiatsioonil ja teistel translatsiooni etappidel toimuvad ribosoomis konformatsioonilised muutused. Kahes erinevas funktsionaalses seisundis olevad *E. coli* 70S ribosoomi cryo-EM struktuurid näitavad, et ribosoomis toimuvad dünaamilised struktuursed muudatused (ratchet-like liikumine) (Gao et al., 2003). Kõrvutades neid kahte mudelit on näha, et ribosoom muutub kompaktselt struktuurist vabama struktuuriga kompleksiks. Selle tulemusena muutuvad paljude r-valkude konformatsioonid. Kontrastiks sellele, et RNA-st moodustunud subühikute vahelised sillad ei muutu ratchet-like liikumisel, aga muutujateks on just need subühikute vahelised sillad, mis on moodustunud valkudest. See viitab sellele, et ribosoomi valkudel on oluline roll translatsiooni dünaamilistes muutustes. Hiljutised ribosoomi cryo-EM uuringud (Frank and Agrawal, 2000; Gao et al., 2003; Spahn et al., 2004) näitavad suuri konformatsioonilisi ümberkorraldusi valgusünteesi elongatsiooni etapil. Kui ribosoomiga seotub elongatsiooni faktor G (EF-G), mis põhjustab tRNA ja mRNA translokatsiooni, siis kaasnevad nende sündmustega ka lokaalsed konformatsioonilised muutused nii väikeses kui suure subühikus. Praeguseks ajaks on cryo-EM mudelite lahutavus suudetud viia 10Å-ni. *T. thermophilus* 30S ja *H. marismortui* 50S subühikute kristallstruktuuride mudelite kaasabil on suudetud konstrueerida RNA-d ja valgu selgrooga sisaldav *T. thermophilus* e 70S ribosoomi 5,5Å kristallstruktuur (Yusupov et al., 2001). Hiljutised meetodid võimaldavad interpreteerida ja sobitada omavahel cryo-EM ja kristallstruktuuride mudeleid ning uurida ribosoomi dünaamikat lähemalt (Volkamann and Hanein, 1999; Roseman, 2000; Rossmann, 2000; Wriggers and Birmanns, 2001). Gao et al., (2003) analüüsisid kahte ribosoomi staadiumit, initsiatsiooni staadiumit (kus tRNA oli P-saiti seotud) ja EF-G-ga seotud staadiumit (kus EF-G oli seotud mittehüdrolüüsitav GTP analoog). Võrreldi nende kahe staadiumi cryo-EM mudeleid. Kaks mainitud staadiumit ei järgne üksteisele, nende vahele jäävad

dekodeerimis ja kohandumis protsessid. Aga on tõendeid, et initsiastiooni kompleksil on sarnane konformatsioon kui ribosoomil vahetult enne EF-G seostumist (Gao et al., 2003). *E. coli* ribosomaalne RNA struktuur modelleeriti *T. thermophilus* 30S (Ogle et al., 2001) ja *H. marismortui* 50S subühikute (Ban et al., 2000) kristallstruktuuridest, võttes arvesse liikidevahelisi erinevusi. Mudelite ehitamise aluseks olid cryo-EM plaanid. Saadud *E. coli* 70S ribosoomi mudelid näitavad, et kõige intensiivsemad molekulaarsed ümberkorraldused toimuvad ribosoomi valkudega ja eriti valkudega S13, S19, L2, L5 ja L14. Nimetatud valgud moodustavad valk-valk ja valk-RNA subühikute vahelisi interaktsioone.

Muutused subühikute vahelistes sildades

Subühikute vahelised sillad on olulised ribosoomi üldise struktuur säilitamiseks (Frank et al., 1995; Cate et al., 1999; Gabashvili et al., 2000), aga samas võivad osaleda ka translatsiooni dünaamilistes muutustes (Frank and Agrawal, 2000, 2001; Gao et al., 2003; Spahn et al., 2004). Yusupov et al., (2001) identifitseerisid *T. thermophilus*'e 70S kristallstruktuuri (5,5Å) mudelilt enam kui 30 individuaalset subühikute vahelist interaktsiooni, mis olid jaotunud 12 silla vahel.

Igal sillal, mis identifitseeriti *T. thermophilus*'es, esineb teisik *E. coli* ribosoomis (Gao et al., 2003). Lisaks sellele on paljud *E. coli* sillad identsed *T. thermophilus*'e omadega. Sarnasus viitab sellele, et subühikute vahelised sillad on kõrgelt konserveerunud ja atomaarne ehitus on oluline nende funktsioneerimiseks.

Enam kui 80% *E. coli* sildadest on moodustunud 30S subühiku heeliksiite 23, 24 (tsentraalne domään) ja 44 (3' minor domään) ning 50S subühiku heeliksiite 64, 67-71 (domään IV) vahel (Tabel 1). *E. coli* 70S ribosoomi struktuurilt identifitseeriti ka mõned lisa kontaktid sildades B1a (S19) ja B7b (heeliks 22) 30S poole pealt ja B8 (L19), B2c (heeliks 66) ja B5 (heeliks 71) 50S poole pealt.

Lisaks sellele identifitseeriti silla positsioonid ka kompleksis 70S-EF-G-GTP (EF-G staadium). Võrreldes initsiatsiooni ja EF-G staadiumi sildade paigutumist, nähti, et muutused toimuvad sildadega, mis sisaldavad valk-valk ja valk-RNA vahelisi interaktsioone. Muutuvateks sildadeks olid B1a, B1b ja B7b. Sildade käitumist ratchet-like liikumisel võib jagada kaheks tüübiks:

- 1) sillad, mis on pigem stabiilsed ja muutumatud
- 2) sillad, millede molekulaarsed kontaktid on muutuvad või katkevad hoopiski

Esimesse tüüpi kuuluvad kõik RNA-RNA sillad, nagu B2a-c, B3, B5 ja B7a. Kui toimub ulatuslik liikumine 30S ja 50S subühikute vahel, siis nimetatud silla kontaktid jäävad stabiilseteks ja näitavad ainult väikest (< 3 Å) lokaalset ümberkorraldust. Enamus valku sisaldavad sillad käituvad vastupidiselt. Nagu näiteks sild B1b, mis on ainuke täielikult valgust moodustunud sild, kus kontaktid on moodustanud S13 ja L5 vahel. Nii S13 kui L5 teevad läbi suure muutuse, nende kontaktid B1b sillal vahetuvad välja teistsuguste kontaktidega nende kahe valgu vahel (Tabel 1). Võib arvata, et need interaktsioonid

Bridge	Type	30S Component	RNA or Protein Positions	50S Component	RNA or Protein Positions	<i>E. coli</i> Nomenclature ^a
B1a	p-R	S13	102-115	H38	881-883 ^c	(B1a)
	p-R	S19	83-84	H38	884-885,891-892	
B1b	p-p	S13	2-8	L5	110-114,130-136	(B1c)
	p-p	S13	56-67	L5	110-114,130-136	(B1b)
B2a	R-R	h44	1409-1410,1495-1496	H69	1912-1913	(B2a)
B2b	R-R	h24	783-786,791-792	H67	1836-1838,	(B2b)
		h45	1514-1516	H69	1922-1923,1928-1929	
B2c	R-R	h24	770-774	H67,H71	1833-1834,1932-1933	(B2c)
		h27	900-901	H66,H67	1793-1794,1830-1833	
		h44	1483-1486	H67	1832	
B3	R-R	h44	1483-1486	H71	1948-1949,1960-1962	(B3)
B4	R-R	h20	762	H34	715-716	(B4)
	p-R	S15	59-63,86-87	H34	714-716	
B5	R-R	h44	1418-1419	H64	1718-1719	(B3a,b)
	R-R	h44	1420-1421	H71	1950-1951	
	R-p	h44	1421-1423	L14	45-50	
	R-R	h44	1473-1476	H62	1689-1690,1702-1703	
B6	R-R	h44	1429-1431	H64	1988-1989	
	R-p	h44	1432-1433	H62	1704-1705	
	R-p	h44	1463-1465	L19	107-110	
B7a	R-R	h23	698-699,701-703	L19	108-113	
B7b	R-p	h23	712-714	H68	1847-1848,1896-1897	(B2d)
	R-p	h24	773-776	L2	240-244	(B2e)
	R-p	h22	669-671	L2	226-227,247-251	
B8	R-p	h14	339-340,345-346	L2	235-238	(B6)
	R-p	h14	345-346	L14	13,97-98	
				L19	39-43	

R, RNA; p, protein; h, helices in 30S; H, helices in 50S.
^aIn the EF-G.GTP bound state, B1a and B7b are broken, and residues involved in B1b change into:

p-p	S13	17-22	L5	141-145
p-p	S13	64-70	L5	110-113,132-135

Tabel 1. 30S ja 50S ribosoomi subühikute vahelised sillad (Gao et al., 2003).

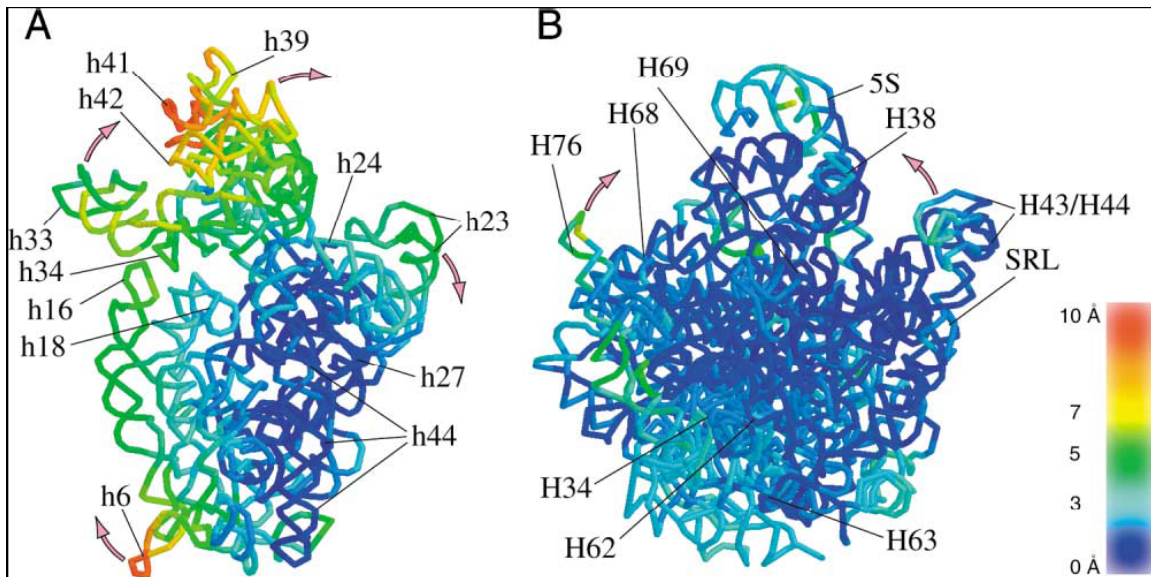
reguleerivad ja stabiliseerivad ribosoomi kui see läheb ühest staadiumist teise. Teise näitena või tuua silla kontaktid, mis initsiatsiooni staadiumis on olemas, aga EF-G•GTP staadiumis on katkenud ega pole uuesti tekkinud (puudu). Siia kuuluvad sillad B1a ja B7b. B1a sild on moodustunud 30S subühiku valkude S13, S19 ja 50S subühiku heeliksi 38 vahel. B7b sild on moodustunud 30S heeliksiite 22-24 ja 50S valgu L2 vahel. Need kaks silda on moodustunud RNA-valk interaktsioonidest ja liikuvaks osaks on nende sildade valgu osa. RNA on nendes sildades üsnagi liikumatu. Huvitav asjaolu on veel see, et sildades B5 ja B8, kus osaleb valk L14, mis teeb läbi 14^o pöörde, ei muutu nende sildade subühikute vahelised interaktsioonid. Lähemalt vaadates selgus, et nende sildade interaktsioonid on moodustunud L14 pöörlemis tsentriga ja seepärast ongi nende kahe silla muutumine suhteliselt väike.

Subühikute vahelised RNA-RNA sillad, mis paiknevad 70S ribosoomi tsentraalses osas on muutumatud, stabiliseerides 70S subühiku koospüsivust ratchet-like liikumisel.

Ratchet-like liikumise atomaarne interpretatsioon

Ratchet-like pöörlemine toimub suuremal määral 30S subühikus ja sellega kaasneb ka liikumine 50S subühiku suhtes. Üldine pöörlemine nurk on väiksem kui eelnevalt (Frank

and Agrawal, 2000) kindlaks tegid 6,5°. Gao et al., (2003) said selleks nurgaks 4°. Üldiselt jäävad 16S rRNA-s liikumised 0-10 Å vahele. Suuremad pöörlemised toimuvad 30S subühiku pea (4°), õla (3°) ja kannuse (8°) piirkondades. Kõige rohkem liiguvad pea domeeni 16S rRNA heeliksids 39, 41 ja 42 ning kannus (heeliks 6) (tähistatud punasega Joonis 1).



Joonis 1. RNA struktuursed muutused, mis kaasnevad ribsoomi minekul initsiatsiooni staadiumist EF-G•GTP seotud staadiumisse (Gao et al., 2003). (A) 16S rRNA, (B) 23S rRNA ja 5S rRNA. Igale RNA ahelale anti vastav värv, mis näitab kui palju konkreetne piirkond liikus kahe staadiumi vahel. Nooled näitavad liikumise suunda. Paremal ääres on värviriba, kus sinine värvus tähistab mitte liikumist (0 Å) ja punane 10 Å-st liikumist.

Regioonid, mis näitavad kõige väiksemat liikumist (sinised Joonis 1), paiknevad enamasti pöörlemis tsentris ja on moodustunud 16S rRNA heeliksitest 2, 7, 14, 19, 21, 26, 27 ja 44. Enamus nendest suhteliselt stabiilsetest 30S regioonidest osalevad tsentraalsete subühikute vaheliste sildade moodustamises. Üldiselt võib öelda, et kui liikuda 16S rRNA tsentrist perifeeriasse, siis selle käigus on näha, et lokaalne RNA struktuur muutub liikuvamaks. 30S subühiku piirkonnad, mis liiguvad osaliselt, paiknevad mRNA sisenemise ja väljumise kanalites ning pea piirkonnas, mis moodustab ainsa valk-valk silla.

mRNA sisenemise kanal on moodustunud peamiselt valkudest S3, S4 ja S5. Need kolm valku tekitavad kolmnurkse avavuse 30S subühiku pea ja õla vahele. S3, S4 ja S5 valgu suhtelise liikumise tulemusena initsiatsiooni staadiumist EF-G•GTP seotud staadiumisse avaneb mRNA sisenemise kanal. Sarnaselt laieneb ka mRNA väljumise kanal, mis on moodustunud S7, S11, S18 ja heeliksitest 23, 24, 28 ja 45. Laienemise tagavad valgud ja natukene aitab kaasa ka pea piirkonna 16S rRNA.

Kõige rohkem liigub 30S valk S13, mis asub 30S subühiku peas ja moodustab B1a ja B1b sildade kontakte. S13 N-terminaalne region liigub ~ 12 Å. S13 C-terminaalne ots on initsiatsiooni staadiumis P-saidi tRNA läheduses ja moodustab kontakti 50S subühiku

23S rRNA heeliksi 38 tipuga. EF-G•GTP seotud staadiumis on S13 C-terminus liikunud oma esialgsest asukohast ~ 15 Å kaugemale ja interaktsioon heeliksiga 38 on katkenud. Veel üks piirkond, mis sisaldab valke S6, S18 ja S11 teeb läbi suured konformatsioonilised muutused 30S subühikus. Initsiatsiooni staadiumis on see regioon kompaktse struktuuriga, aga EF-G•GTP seotud staadiumis on see region vabama struktuuriga.

S12 on ainuke valk, mis asub vahetus läheduses dekodeerivale tsentrile (Brodersen et al., 2002) ja on ka ainuke teadaolev 30S subühiku valk, mis interakteerub EF-G-ga (Agrawal et al., 1998). Seetõttu arvatakse S12 olevat oluline roll translokatsioonis. Ratchet-like liikumisel teeb S12 19° pöörde subühikute vahelise ruumi suunas. Arvatavasti positioneeritakse valk nii, et ta oleks võimeline kontakteeruma EF-G-ga. Huvitav on ka see, et kaks üksteisest sõltumatut cryo-EM tööd (Valle et al., 2002; Stark et al., 2002), nägid märkimisväärset S12 liikumist. Nendes töodes oli *E. coli* 70S ribosoomiga seotud aa-tRNA-EF-Tu•GTP kompleks.

Kõik 30S valgud peale S2 olid olemas nii initsiatsiooni kui EF-G•GTP seotud staadiumis. S2 oli täielikult olemas initsiatsiooni staadiumis, aga osa S2-st oli puudu EF-G•GTP staadiumis. S2 asub 30S subühiku liigend piirkonnas, mis ühendab 30S subühiku pead selle kehaga (Brodersen et al., 2002). Nimetatud piirkonnas toimuvad suhteliselt suured muutused ja see seletab ka asjaolu, miks osa sellest valgust on nähtamatu EF-G•GTP staadiumis.

50S subühikus ei toimu nii suuri ümberkorraldusi kui 30S subühikus. Enamus 23S rRNA ja 5S rRNA regioonidest on vähem mobiilsemad kui 16S rRNA. Nagu mainitud jääb üldine 50S rRNA liikumine alla 3 Å. Eranditeks on 23S rRNA heeliksid 43, 44, 76 ja 86 ning osa 5S rRNA-st.

23 S rRNA heeliks 76 (domeen V) moodustab koos heeliksiga 77, 78 ja valguga L1, niinimetatud L1 varre. L1 vars on väga liikuv (Joonis 1), erinevad cryo-EM mudelid on paigutanud teda erinevatesse konformatsioonidesse (Gomez-Lorenzo et al., 2000; Valle et al. 2003a; Gao et al., 2003, Spahn et al., 2004) ja kristallstruktuurides sama lugu (Harms et al., 2001; Yusupov et al., 2001). Oletatakse, et L1 vars aitab kaasa tRNA-l E-saidist vabaneda (Agrawal et al., 1999; Gomez-Lorenzo et al., 2000; Yusupov et al., 2001; Harms et al., 2001) ja osaleb aktiivselt translokatsiooni protsessis, kus liigutatakse tRNA P-saidist E-saiti (Valle et al., 2003a). Teised L1 varre komponendid (23S rRNA heeliksid 77, 78 ja 50S valk L1) puuduvad *E. coli* 70S ribosoomi cryo-EM mudelis (Gao et al., 2003). Jälgides heeliksi 76 paikenemist kahes staadiumis, võib öelda, et L1 vars pöörab end 15° tsentraalse tuubuli suunas ja blokeerib niiviisi subühikute vahelise ruumi. Teine 50S subühiku vars L7/L12 on samuti üsnagi paindlik (Joonis 1) (Harms et al., 2001; Agrawal et al., 2001; Gao et al., 2003). L7/L12 varre komponendid (heeliks 43, 44 ja L11) liiguvad üsnagi märkimisväärselt kahe staadiumi vahel. Heeliksid 43 ja 44 liiguvad heeliksi 38 poole (Joonis 1) ja sellega kaasneb ka L11 N-terminuse liikumine EF-G G-domeeni suunas (Agrawal et al., 2001). L11 C-terminus, mis on tugevalt kontaktis heeliksiga 43 ja 44, liigub nendega kaasa. Lisaks sellele näitab heeliks 38 tipp osalist liikumist kahe staadiumi vahel. Nende liikumistega on seotud subühikute vahelise silla B1a kontaktide muutused.

50S subühiku valkudest liiguvad kahe staadiumi vahel kõige rohkem polüpeptiidi väljumistunneli vahetusläheduses olevad valgud (L22, L23, L24 ja L29).

Valgud L5, L2 ja L14, mis asetsevad 50S subühiku subühikute vahelisel pinnal, teevad samuti läbi lokaalsed muutused. L5 on ainuke valk 50S subühikus, mis moodustab valk-valk silla (B1b) (Tabel 1). Üldkokkuvõttes teeb L5 läbi 13° liikumise. Nagu juba varem mainitud, liiguvad L5 ja 30S subühiku valk S13 üksteise suhtes ja nende vahelised kontaktid sillal B1b muutuvad (Tabel 1). Sarnast mobiilsust näitavad ka valgud L2 ja L14, mis osalevad sildades B5, B7b ja B8.

Ribosomaalsete valkude roll

Ribosoomi subühikute kristallstruktuurid (Ban et al., 2000; Wimberly et al., 2000) näitasid, et ribosoomi funktsionaalsed alad (dekodeeriv tsepter ja peptidüül-transferaas tsepter) koosnevad peamiselt RNA-st. Ribosoomi valkude rolli peetakse nüüd peamiselt abistavaks, aidates kaasa 70S ribosoomi täielikus assambleerumises ja stabiliseerides tekkinud struktuuri (Ban et al., 2000; Moore and Steitz, 2002). Nagu näha Gao et al., (2003) töös, osalevad paljud valgud otse ja aktiivselt konformatsioonilistes ümberkorraldustes. Valgud, milles need konformatsioonilised muutused toimuvad, paiknevad ribosoomi sellistes funktsionaalselt olulistes piirkondades, nagu mRNA sisenemise ja väljumise kanal, polüpeptiidi väljumis tunnel ja mõnedes subühikute vahelistes sildades. 30S subühiku mRNA kanali avamine EF-G•GTP seotud konformatsioonis aitab arvatavasti mRNA liikumist translatsioonil (Frank and Agrawal, 2000; Gao et al., 2003). Üldine 50S subühiku valkude väljaspoole liikumine vähedab EF-G•GTP seotud staadiumis oleva subühiku kompaktsust.

Valgu struktuuril on alati rohkem vabadust kui RNA-l. Võimalik seletus valkude käitumisele ribosoomis on see, et suured muutused valkudes on indutseeritud väikeste muutuste poolt RNA-s (selle väitega võib paralleele tõmmata sellise kuulsa lausega, nagu väike samm inimese jaoks, aga suur samm inimkonna jaoks). Näiteks 50S subühiku valk L14 on ainuke, kes interakteerub otse SRL-ga (sartsiini-ritsiini luup). SRL on vahetus läheduses GTPaas-assotseerunud tseptriga (seob G-valke). L14 roteerub 14° võrra, aga SRL liigub vähem kui 3Å, seega L14 suur liikumine on arvatavasti indutseeritud väikesest liikumisest SRL-is.

2. Ratchet-like liikumine eukariootses 80S ribosoomis

Hiljuti ilmus töö (Spahn et al., 2004), kus suudeti konstrueerida pärmi 80S•eEF2 11,7 Å lahutuvusega cryo-EM struktuur. 80S•eEF2 kompleksi cryo-EM mudel saadi antibiootikumi sordariin juuresolekul. Nende struktuurilt on näha, et nii eEF2-ga kui ka 80S ribosoomiga toimuvad suured konformatsioonilised muutused, kaasaarvatud funktsionaalselt olulistes subühikute vahelistes sildades. Sordariin positsioneerib eEF2 III domeeni nii, et see suudaks interakteeruda 23S rRNA sartsiini-ritsiini luubiga (SRL) ja valguga rpS23 (S12b). Selline eEF2 konformatsioon sarnaneb GTPaas aktiveeritud olekule, eEF2 jääb 80S ribosoomile kinni ja see seletab ära miks sordariin inhibeerib translatsiooni. 80S•eEF2•sordariin kompleksis toimub ratchet-like liikumine nagu ka *E. coli* 70S ribosoomis. Erinevus on see, et tühi (ei ole seotud faktoritega) 80S ribosoom on ratchet-like konformatsioonis. *E. coli* tühi ribosoom ei ole seda. Arvatakse, et ratchet-like liikumine on osa mehhanismist, mis liigutab tRNA-sid translatsioonilise reaktsiooni.

Translokatsiooni reaktsiooniga kaasnevad ribosoomis suurelatuslikud liikumised. Selle etapi ajal muutub ribosoom pre-lokatsioonilisest (PRE) seisundist post-lokatsioonilisse seisundisse (POST). A- ja P-saidi tRNA-d liiguvad vastavalt P- ja E-saiti. Translokatsiooni etappi katalüüsib prokarüootides elongatsiooni faktor G (EF-G) ja eukarüootides eEF2. Eksperimendid on näidanud, et GTP hüdroolüüs EF-G poolt eelneb tRNA translokatsioonile (Rodnina et al., 1997; Rodnina et al., 2001) ja inorgaanilise fosfaadi (P_i) vabanemine on ühendatud tRNA translokatsiooni etapiga. See viitab sellele, et GTP hüdroolüüsil vabanevat keemilist energiat kasutatakse ribosoomis mehhaanilise töö tegemiseks. Tuleb arvesse võtta ka seda, et EF-G seostumine ilma GTP hüdroolüüsita põhjustab tRNA translokatsiooni ribosoomil ja tRNA translokatsioon ilma GTP hüdroolüüsita on kiirem kui hüdroolüüsiga (vastavalt 1000x versus 50x; Rodnina et al., 2001).

eEF2 ja 80S ribosoomi vaheline interaktsioon

eEF2•sordariin ja pärimi 80S ribosoomi vahelises interaktsioonis osalevad mõnemed ribosoomi subühikud ja kõik viis eEF2 domeeni. 60S subühikust osalevad eEF2 interaktsioonis SRL (25S rRNA heeliks 95), GAC (GTPaas-assotseerunud tsenter, rpL12, H43, H44) ja P valgud (P0, P1 α , P1 β , P2 α ja P2 β ; Ballesta and Ramacha, 1996). eEF2 interakteerub 40S subühiku pea ja keha regioonidega, 18S rRNA heeliksiga h5, h15, h33, h34, h44 ja valguga rpS23 (S12p).

eEF2 IV domeeni tipp võib interakteeruda P-saidi tRNA-ga (Spahn et al., 2001; Spahn et al., 2004). eEF2 His694-Ile698 on piisavalt ligidal koodon-antikoodon dupleksile, et interakteeruda P-saidi tRNA ja mRNA-ga (Spahn et al., 2004). His694-Ile698 naabruses asuv His699 on post-translatsiooniliselt modifitseeritud diptamiiniks ja diptamiini ADP ribosüleerimine bakteri toksiini poolt inaktiveerib eEF2-e. Mutatsioonid, mis hoiavad ära diptamiini tekke kahjustavad faktori funktsiooni (Foley et al., 1995). On teada, et A-saidi koodon-antikoodon interaktsiooni täpsust suurendab interaktsioon koodon-antikoodon aluspaari väikse vao ja väikse subühiku positsioonide A1492 ja A1493 vahel (Ogle et al., 2002). Need A-minor interaktsioonid peab ära lõhutama, et tRNA liiguks A-saidist P-saiti. eEF2 domeeni IV tipp võib üle võtta translokatsiooni ajal selle funktsiooni, koodon-antikoodon paar interakteerub eEF2 IV domeeni tipuga ja stabiliseerib seda vaheolekut. Nii viisi eEF2 võimaldaks mRNA-l liikuda koos tRNA-ga ja vähendaks raaminihke võimalust.

Ratchet-like liikumine eukarüootsetes subühikutes

Eelnevalt ei ole suudetud detekteerida ratchet-like liikumist 17,5 Å 80S•eEF2•sordariin kompleksis, kui seda võrreldi tühja pärimi 80S ribosoomi mudeliga (Gomez-Lorenzo et al., 2000). Põhjuseks oli see, et tühja 80S ribosoomi mudelid olid juba ratchet-like konformatsioonis. Pärimi ribosoomi konformatsioonilised omadused on natuke erinevad kui *E. coli* ribosoomil (Spahn et al., 2004). Pärimi ribosoomid võivad stabiilselt

adopteerida ratchet-like konformatsiooni, ilma eEF2 olemasoluta. See viib küsimusele, et miks tühja 70S ribosoomi ja tühja 80S ribosoomi konformatsioonid erinevad?

Üks seletus on, et nende kahe ribosoomi konformatsiooni seisundite vahel esineb tasakaal. Prokarüootides on see tasakaal nihutatud ühe seisundi poole ja eukarüootides teise seisundi suunas. Eukarüootides võib esineda teine faktor, mis mõjutab ribosoomi dünaamilist käitumist. Enamus evolutsiooniliselt konserveerunud subühikute vahelisi sildu, eriti tsentraalselt paiknevad RNA-RNA sillad, ei katke ratchet-like liikumisel. Molekulaarsed interaktsioonid, mis peavad ajutiselt katkema ja reformeeruma võivad olla eukarüootide spetsiifilised, nagu näiteks perifeersed sillad. Need sillad võivad vajada suurt aktivatsiooni energiat, et vastavad muutused toimuksid. Seetõttu võivad tühjad 80S ribosoomid olla kineetilises lõksus ratchet-like konformatsioonis. Kahe konformatsiooni vahelist üleminekut ei toimu ilma õige katalüsaatorita.

Lokaalsed konformatsioonilised muutused 40S subühikus

Ühe osa 80S•eEF2•sordariin kompleksi ratchet-like liikumisest moodustab 40S subühiku pea liikumine keha/platformi suhtes. See pööre peab toimuma ümber kahela piirkonna, mis ühendab neid kahte 40S subühiku osa. Selle liikumise käigus peavad mõned mittekovalentsed interaktsioonid katkema või ümber paigutatama. Sellised 40S subühiku pea-keha mittekovalentsed interaktsioonid paiknevad mRNA sisenemise kanalis ja on moodustunud keha heeliksi 18 ja pea h34, valgu rpS3 vahel (Schlünzen et al, 2000; Wimberly et al, 2000; Spahn et al, 2001a). Heeliks 34 liigub ~ 15Å 40S subühiku sisemuse poole. See liikumine lõhub kontakti heeliksi 34 väikse vao ja heeliksi 18 vahel. Peale seda on heeliksi 18 interaktsioon ennekõike rpS3-ga. See interaktsioonide muutumine näib olevat soodustatud valgu rpS3 liikumisest. Pärmi 40S subühiku pea liikumine (~ 15Å) on märkimisväärselt suurem kui prokarüootses 30S subühikus (Gao et al., 2003).

Lokaalsed konformatsioonilised muutused 60S subühikus

60S subühiku konformatsioonilised muutused toimuvad peamiselt kolmes protuubulis. eEF2•sordariin seostumine indutseerib GAC (GTPaas-assotseerunud tsener) liikumise tsentraalse protuubuli suunas (Gomez-Lorenzo et al., 2000; Spahn et al., 2004). H42 roteerumine põhjustab H43 ja H44 otste liikumise ~ 15Å võrra, selle piirkonnaga interakteerub ka eEF2. Sarnane, aga väiksem liikumine toimus ka *E. coli* 70S ribosoomis (Frank and Agrawal, 2001; Valle et al. 2003a; Rawat et al., 2003). GAC liikumine võib olla osa mehhanismist, mis laeb translatsiooni faktoreid ribosoomi faktoreid siduvasse saiti.

Teine 60S subühiku mobiilne region on L1 vars. L1 varre otsmine osa on moodustunud rpL1, H77 ja H78-st. L1-e 60S subühiku kehaga ühendab H76. Nagu juba eelnevalt oli juttu, on L1 vars väga liikuv ning pikemalt sellel enam ei peatu.

80S ribosoomi subühikute vahelised sillad

Enamus subühikute vahelisi sildu on ühesugused nii prokarüootses kui eukarüootses ribosoomis. Samuti ratchet-like liikumisel toimuvad ümberkorraldused on sarnased

mõnema ribosoomi puhul. Siiski on ka midagi erinevat, nimelt eukarüootne ribosoom sisaldab perifeerias paiknevat lisa sildu (Spahn et al., 2001; Spahn et al., 2004). Ainuke eukarüootide spetsiifiline sild, mis katkeb ratchet-like liikumisel on eB9. Teised eukarüootide spetsiifilised sillad on olemas mõnemas 80S•eEF2•sordariin konformatsioonis ja nendes toimuvad interaktsioonide ümberpaigutumised (eB8, eB10 ja eB12).

Sordariini toime 80S•eEF2 kompleksile

Interaktsioon ribosoomi ja eEF2/EF-G vahel on tavatingimustes muutuv. Mittehüdrolüüsitava GTP analoogi või teatud ravimi lisamine, lukustab ribosoomi vastavasse staadiumisse. Fusiidhappe inhibeerib nii prokarüootse kui eukarüootse ribosoomi translokatsiooni etappi, takistades eEF2/EF-G•GDB dissotsiatsiooni POST ribosoomidelt (Spahn and Prescott, 1996). Sordariin on väga spetsiifiline seente eEF2-le. Sordariin samuti takistab eEF2 dissotseerumist ribosoomidelt (Justice et al., 1998). Tegelik translokatsiooni inhibeeriv mehhanism fusiidhappe ja sordariini puhul on erinev (Dominguez et al., 1999). Sordariini seostumis sait eEF2-l asub domeenide III, IV ja V vahel (Capa et al., 1998; Jørgensen et al., 2003). Kusjuures fusiidhappe sidumis sait eEF2-l asub G, II ja III domeeni vahel (Laurberg et al., 2000). Võtme roll on täita sordariini inhibitsioonil eEF2 III domeeni kindlal konformatsioonil, mis võimaldab III domeenil interakteeruda SRL-ga. Sordariin arvatavasti takistab III domeenil SRL-st ära liikuda ja seeläbi takistab ka eEF2-e dissotsiatsiooni ribosoomilt. Kui EF-G III domeen on deleteeritud, siis on kahjustatud ka GTPaasne aktiivsus, aga interaktsioonid ribosoomi ja EF-G•GDP vahel ei ole mõjutatud.

tRNA translokatsiooni mehhanism

tRNA liikumiseks ribosoomil on vaja, et lõhutaks A- ja P-saidi tRNA interaktsioonid ribosoomiga ja tekiks uued interaktsioonid vastavalt P- ja E-saidis. tRNA translokatsioonil aset leidvad ribosoomi konformatsioonilised muutused toimuvad seetõttu, et soodustada tRNA liikumist. 30S subühiku ratchet-like liikumine toimub tRNA liikumise suunas (Frank and Agrawal, 2000). Kineetilised eksperimendid on näidanud, et tRNA translokatsioonile eelneb ribosoomi konformatsiooniline muutus (Savelsberg et al., 2003). *E. coli* 70S ribosoomi ratchet-like liikumisega käib kaasas deatsetüleeritud-tRNA liikumine P-saidist P/E hübriid-saiti (Valle et al., 2003b). Analoogselt võib ratchet-like liikumine osaleda A-saidi peptidüül-tRNA liigutamisel A/P hübriid-saiti (Valle et al., 2003b; Zavialov and Ehrenberg, 2003). Vastavalt originaalsele hübriid-saidi mudelile (Moazed and Noller, 1989; Noller et al., 2002) on hübriid-saitide tekkeks vaja EF-G seostumine ribosoomile ja see protsess ei toimu spotnaanselt peale pepdiidsideme sünteesi.

Sarnaselt *E. coli* mudelile võib ka pärms ratchet-like liikumine olla seotud tRNA translokatsiooniga. Osa pärmi ribosoomi ratchet-like liikumisest moodustab 40S subühiku pea liikumine, mis on oma ulatuselt suurem kui *E. coli*'s. Üks võimalus on selline, et esimesena toimub väikse subühiku liikumine suure subühiku suhtes ning sellele järgneb 40S subühiku pea liikumine. Kuna tRNA-d on tihedalt seotud keha/platformi ja pea domeenidega, siis esimese liikumise jõud mõjub tRNA-le ja lõhub ära tRNA

küünarnuki ja suure subühiku vahelise interaktsiooni. tRNA 3'-CCA ots on küllaltki paindlik ja liigub faktorist sõltumatult. Võimalik, et see osa ratchet-like liikumisest viib hübriid-saidi tekkele. Sellele järgnev lisa liikumine (pea domeeni liikumine) võib osaleda translokatsioonil. Pea liikumine väikse subühiku kaela piirkonnast põhjustab ribosoomi ja tRNA interaktsioonide liikumise tRNA liikumise suunas. *T. thermophilus*'e pea domeeni 16S rRNA heeliks 34 ja luup 965 interakteeruvad A-saidi tRNA antikoodon varrega (Yusupov et al., 2001). 80S•eEF2•sordariin kompleksis on homoloogsed ahelad ligemal P-saidile kui A-saidile ja sama kehtib ka pea kohta, mis interakteerub P-saidi tRNA-ga (Spahn et al., 2001; Yusupov et al., 2001). 80S•eEF2•sordariin kompleksi 11,7 Å mudelis on need ahelad liikunud E-saidile lähemale (Spahn et al., 2004).

Seega selle mudeli kohaselt liigub 40S pea domeen koos tRNA-ga ja kontaktid nende vahel jäävad muutumatudeks. 40S subühiku pea käituks kui mehhaaniline konveier, transportides tRNA antikoodon stem-luupi. Kuna eEF2 IV domeen okupeerib A-saiti, siis ratchet-like liikumisel võib ta ära hoida tRNA liikumise tagasi suunas. See seletaks ära ka asjaolu, miks peab translokatsiooni toimumiseks olema A-saidis vähemalt tRNA antikoodon stem-luup (Joseph and Noller, 1998). Kuna see moodustab minimaalse märklaua eEF2 IV domeenile.

3. *E. coli* 16S rRNA nukleotiidid, mis on kaitstud subühikute vahelisel assotsiatsioonil

Merryman et al., (1999) uurisid 30S subühiku 16S rRNA interaktsioone 50S subühikuga. Selleks kasutasid nad erinevaid keemilisi ühendeid, milledega saab jälgida RNA aluste ja selgroo kättesaadavust modifikaatorile. Nendeks keemilisteks ühenditeks olid 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p- toluene sulfonate (CMCT, et jälgida uratsiili N-3 ja guaniini N-1 positsioonide kättesaadavust), dietüülpürokarbonaat (DEPC, et jälgida adeniini N-7 positsiooni), dimetüülsulfaat (DMS, et jälgida adeniini N-1 ja tsütosiini N-3 positsioone), ketoxal (et jälgida guaniini N-1 ja N-2 positsioone), Fe(II)-EDTA poolt genereeritud hüdroksüül radikaalid (et jälgida selgroo riboside kättesaadavust) ja Pb(II) (et jälgida võimalikke Mg²⁺ kordinatsioonidemeid). RNA reaktsiooni saidid identifitseeriti praimer ekstensiooniga. Subühikute vaheline assotsiatsioon protekteerib 16S rRNA 12 nukleotiidi ja üle 90 riboosi grupi. Lämmastik aluste spetsiifiliste modifikaatoritega identifitseeritud nukleotiidid paiknevad sageli üksteise naabruses ja on ümbritsetud suhkur-fosfaat selgroo protektsioonidega. Enamus protekteeritud positsioonidest paiknevad 16S rRNA nukleotiidide 250, 700, 790, 900 ja 1408-1495 ümbruses. Need regionid paiknevad 30S subühiku subühikute vahelisel pinnal ja osalevad 30S-50S subühik-subühik interaktsioonides.

Juba paarkümmend aastat tagasi näidati, et 16S rRNA on kaitstud 50S subühiku poolt keemilise modifitseerimise eest (Chapman and Noller, 1977; Herr et al., 1979). Samuti on näidatud, et rRNA suhkur-fosfaat selgroog on kaitstud 50S subühikuga etüülnitroosouurea (Baudin et al., 1989) ja ensümaatilise lõikamise eest (Vassilenko et al., 1981).

Nukleotiidid, mis olid protekteeritud 50S subühiku poolt, identifitseeriti võrreldes 30S subühiku praimer ekstensiooni mustrit 70S ribosoomi omaga. Kui vastava 70S ribosoomi 16S rRNA positsiooni bändi intensiivsus oli märkimisväärselt madalam kui vastava

positsiooni intensiivsus 30S subühiku 16S rRNA autoradiograafilisel geelipildil, siis loeti see positsioon protekteerituks 50S subühiku poolt. See tähendan, et kui 16S rRNA positsioon on modifitseeritud, siis pöördtranskriptaas ei suuda seda positsiooni läbi lugeda ja sünteesib vastava pikkusega rDNA fragmente, mis geelelektrofooresil lahutatakse.

Protekteeritud nukleotiidid paiknevad 16S rRNA sekundaarstruktuuril viies erinevas regioonis. Kolm protekteeritud regiooni asuvad 16S rRNA tsentraalses domeenis, heeliksites 23, 24 ja 27 (Joonis 2). 16S rRNA heeliksi 23 positsioon A702 on protekteeritud 50S subühiku poolt nii DEPC kui ka DMS modifikatsiooni eest. (Moazed and Noller, 1989; Merryman et al., 1999). Heeliksi 24 positsioonid A790, G791 ja U793 on protekteeritud vastavalt DMS-i, ketoxali ja CMCT modifikatsiooni eest (Joonis 2). Heeliksi 27 positsioonid A908 ja A909 on kaitstud DMS modifikatsiooni eest (Joonis 2). 50S subühiku protektsioone on näha ka 16S rRNA heeliksis 44. Nukleotiidid A1394, A1413, A1418 ja A1483 on protekteeritud DMS-i eest, A1441 on protekteeritud DEPC eest ja G1487 on protekteeritud ketoxali eest (Joonis 2). Lisaks sellele on veel 16S rRNA positsioonid 1412-1414 ja 1432 kaitstud Pb(II) lõikava toime eest. Kuna subühikute assotsiatsioon on magneesiumist sõltuv ja kuna Pb(II) seostub sageli Mg^{2+} seostumis saidiga, on võimalik, et nukleotiidid 1413-1415 kordineerivad magneesium ionide paiknemist subühikute vahelisel interaktsioonil (Merryman et al., 1999).

Enamus hüdroksüül ionide protektsioone (üle 90) asuvad eelpool mainitud 16S rRNA regioonide ümbruses (h11, h23, h24, h27 ja h44).

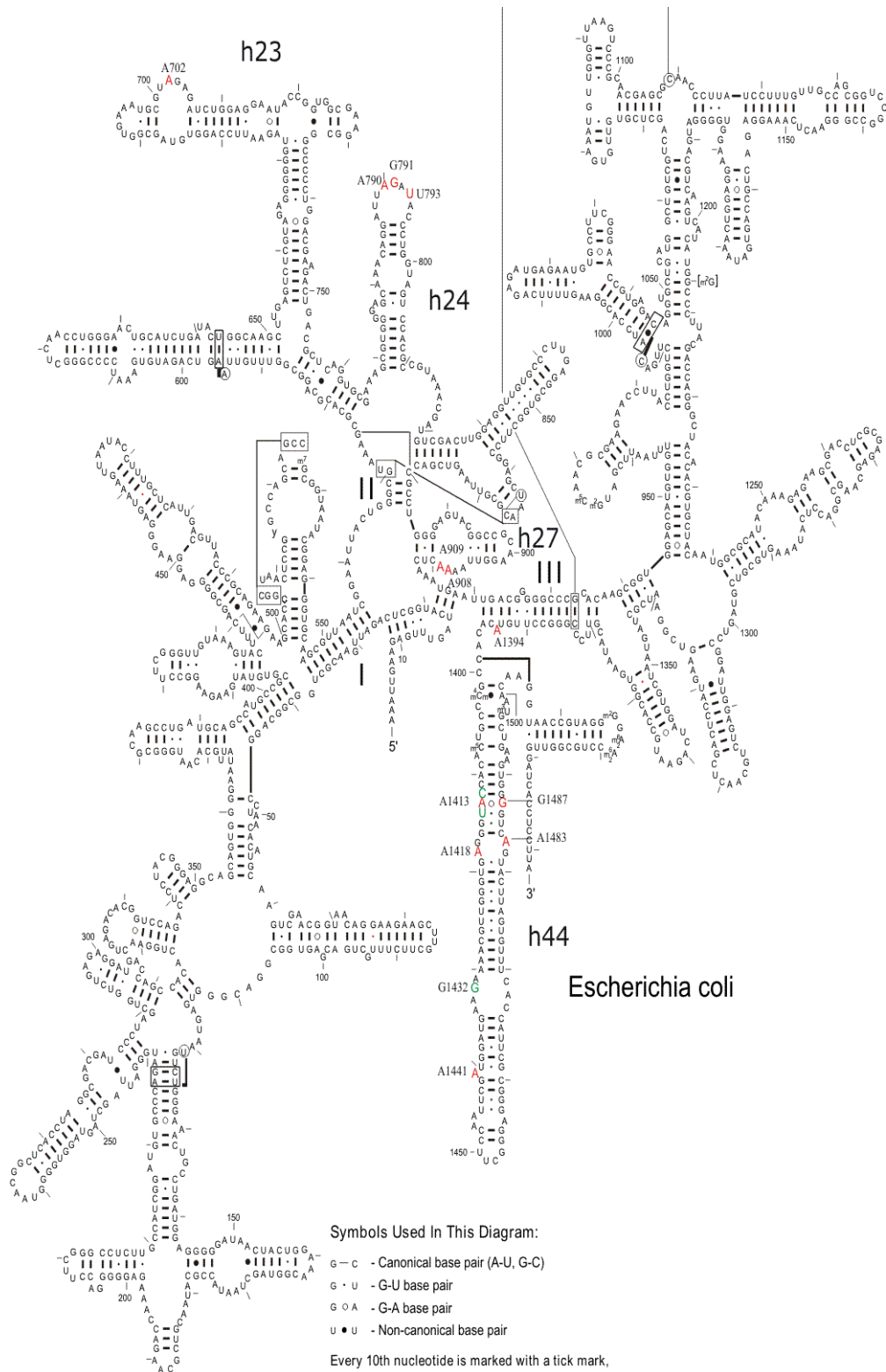
Nendest 12-st aluse spetsiifilisest protektsioonist neljale vastab konkreetne subühikute vaheline sild kristallstruktuuril või cryo-EM struktuuril (Yusupov et al., 2001; Gao et al., 2003). 16S rRNA positsioon A702 moodustab silla B7a, mis interakteerub 23S rRNA heeliksiga 68. Teine 16S rRNA positsioon G791 moodustab silla B2b, interakteerudes 23S rRNA heeliksiga 69. Kolmandaks positsiooniks on A1418, mis moodustab kontakti 23S rRNA heeliksiga 64 (B5). Neljas positsioon on A1483, mis osaleb sillas B3 ja interakteerub suure subühiku 23S rRNA heeliksiga 71.

4. 23S rRNA positsioonid, mis mängivad olulist rolli 70S ribosoomi assotsiatsioonis

Nagu juba eelnevalt korduvalt juttu oli, esineb subühikute vahel hulgaliselt interaktsioone, milledest enamus moodustavad subühikute vahelisi sildu (B1a-B12) (Merryman et al., 1999; Yusupov et al., 2001, Gao et al., 2003; Spahn et al., 2004). Küsimus on selles, et kui vajalik on mingi konkreetne individuaalne rRNA või valgu positsioon 70S ribosoomi moodustamises ja struktuuri stabiliseerimises? Võib arvata, et mitme subühikute vahelise interaktsiooni kõrvaldamine vähendab 70S ribosoomi moodustamist ja stabiilsust. Subühikute vaheline interaktsioon on tagatud mittekovalentsete interaktsioonidega ja komplekside mittekovalentsete interaktsioonide tugevus seisneb kontaktide rohkusest. Kas leidub ka selliseid üksikuid positsioone, mille modifitseerimine või muteerimine kahjustab 70S ribosoomi assotsiatsiooni või stabiilsust? Sellele viimasele küsimusele vastust saada, kasutasid Maiväli and Remme, (2004) modifikatsiooni-interferentsi meetodit. Modifikatsiooni-interferentsi meetod põhineb sellel, et kui modifitseerida kompleksi, mis osaleb mingisuguses (näiteks seostumises ligandidega) protsessis, siis on meil võimalik kindlaks teha selles protsessis osalevad funktsionaalselt olulised ahelad/positsioonid.

Maiväli and Remme, (2004) proovisid identifitseerida 23S rRNA funktsionaalselt olulisi subühikute vahelisi kontakte. Neil õnnestus leida kolm 23S rRNA nukleotiidi, mille modifitseerimine DMS-ga takistab 70S ribosoomi moodustumist. Nendeks *E. coli* 23S rRNA nukleotiidideks olid A716, A1912 või 1918, millede N-1 positsioonide modifitseerimine takistas ribosoomi formeerumist. Need positsioonid asuvad 23S rRNA heeliksites 34 ja 69 ning moodustavad subühikute vahelisi interaktsioone sildades B2a ja B4.

Lisaks subühikute vahelistele sildadele aitab ribosoomil koos püsida ka tRNA-subühik interaktsioonid. Sellest hoolimata toimub subühikute assotsiatsioon ka ilma tRNA-ta (Blaha et al., 2002). 80% subühikute vahelistest interaktsioonidest on moodustunud tsentraalsetest RNA-RNA kontaktidest (Gao et al., 2003). Perifeersetele kontaktidele (peamiselt RNA-valk ja valk-valk interaktsioonid) omistatakse regulatoorset rolli ja tsentraalsetele kontaktidele 70S ribosoomi stabiliseerivat rolli. Seega, Maiväli and Remme, (2004) keemiliselt modifitseerisid 50S subühikuid, nii et enamuse 50S subühikutest säilitaksid oma võime seostuda 30S subühikuga. Selleks kasutasid nad madalat modifikaatori kontsentratsiooni, ühe molekuli 23S rRNA kohta tuleb paar modifikatsiooni (Stern et al., 1988). Modifikaatoritena kasutasid nad DMS-i ja CMCT-d. Nagu juba mainitud, DMS metüleerib kõige tugevamini adeniini N-1 positsiooni ja vähemal määral tsütosiini N-3 positsiooni, lisaks sellele modifitseerib DMS ka guaniini N-7 positsiooni, aga selle detekteerimiseks praimer ekstensiooniga, tuleb eelnevalt teha RNA-le aniliini töötlus. CMCT modifitseerib kõige tugevamini uratsiili N-3 positsioonist ja vähemal määral guaniini N-1 positsiooni. Seejärel, modifitseeritud 50S subühikud assotseeriti natiivsete 30S subühikutega ja fraktsioneeriti sahharoosi gradiet tsentrifuugimisel. Assotsiatsioonil ja fraktsioneerimisel kasutati 6 mM Mg^{2+} kontsentratsiooni, et tagada osaline 70S ribosoomi teke. Kõrgematel Mg^{2+} kontsentratsioonidel toimuks assotsiatsioon peaaegu täielikult ja kogu 50S läheks 70S fraktsiooni. Mg^{2+} kõrgematel kontsentratsioonidel moodustaks subühikute vahel hulgaliselt kordinatsiooni sidemeid, mis stabiliseeriks 70S struktuuri ja me ei näeks RNA modifitseerimise efekte. Tuleb veel mainida seda, et kui reassotsiatsioonis kasutada tRNA-d, siis samuti 50S subühik läheb täielikult 70S fraktsiooni. Nii et tRNA-d ega polüamiine ei kasutatud ja selline *in vitro* assotsiatsioon sõltub ainult subühikutest ja Mg^{2+} kontsentratsioonist. Sellistes tingimustes toimub natiivsete subühikute reassotsiatsioon 50-60% efektiivsusega ja assotseerunud subühikud sedimenteervad ~ 60S-na. Modifitseeritud 50S subühikud assotseerusid natiivsete 30S subühikutega 30-40% efektiivsusega ja sedimenteerusid sarnaselt mittemodifitseeritud subühikutega.



Joonis 2. *E. coli* 16S rRNA sekundaarstruktuur (Comparative RNA Web Site; <http://www.ma.icmb.utexas.edu>). Struktuuril on tähistatud heeliks 23, 24, 27 ja 44 (h23, h24, h27 ja h44). Punasega on tähistatud need positsioonid, millede alused annavad 50S protektsiooni ja rohelisega need, mis on protekteeritud Pb(II) lõikamise eest.

Kuna enamuse 23S rRNA subühikute vahelistest interaktsioonidest on moodustunud domeenidega II ja V, siis skaneerisid nad primer ekstensiooniga neid kahte 23S rRNA domeeni.

Esiteks, A1912 ja A1918 N-1 positsioonide modifitseerimine DMS-ga, segas tugevalt 70S ribosoomi moodustumist 6 mM Mg²⁺ juuresolekul. 13 mM Mg²⁺ juuresolekul takistasid need positsioonid vähem 70S ribosoomi formeerumist. A1912 ja A1918 asuvad 23S rRNA heeliksis 69 ning moodustavad subühikute vahelisi interaktsioone sillal B2a.

Teiseks, A716 modifitseerimine DMS-ga samuti segas 70S ribosoomide teket 6 mM Mg²⁺ juuresolekul, aga mitte 13 mM Mg²⁺ kontsentratsioonil. A716 paikneb heeliksi 34 luubis ja moodustab interaktsioone sillal B4.

Mailväli and Remme, (2004) ei leidnud ühtegi CMCT spetsiifilist interferentsi, kuigi mõned CMCT modifikatsioonid esinesid.

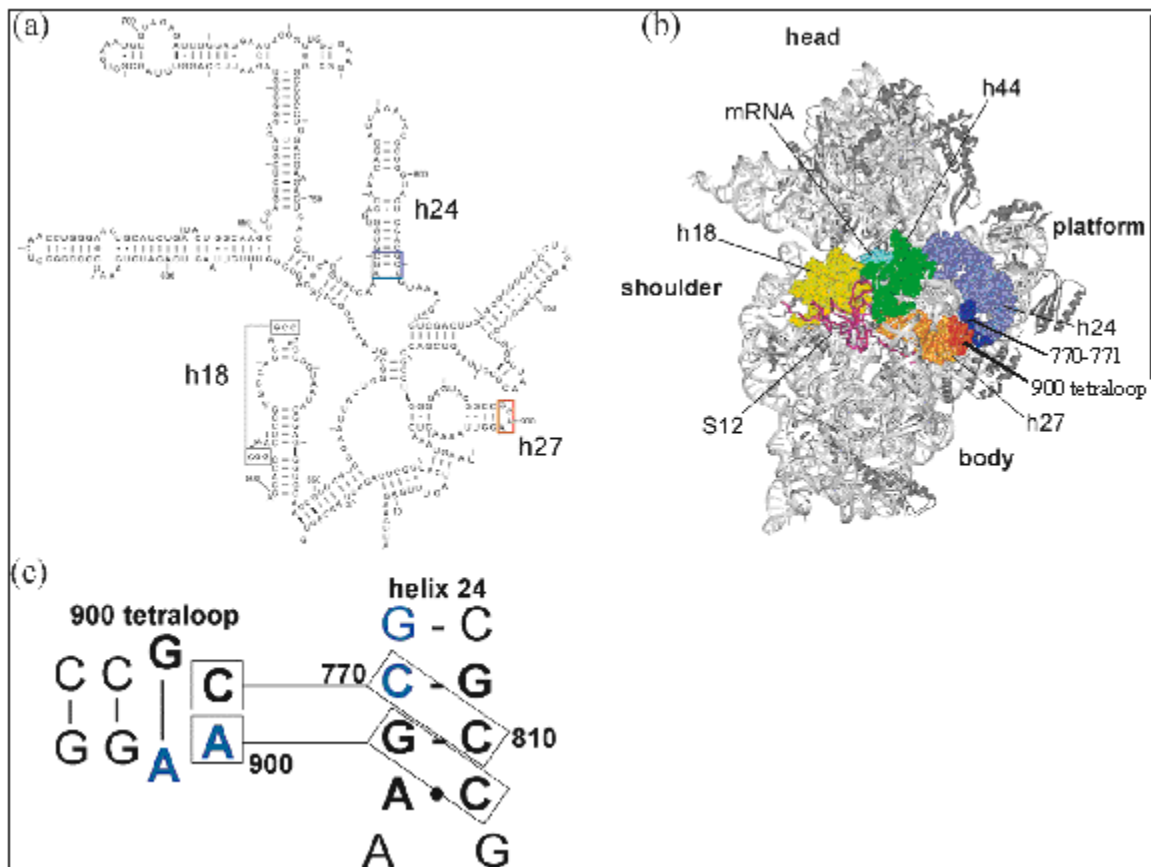
Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et sildadel B2a ja B4 on tsentraalne roll 70S ribosoomi stabiliseerimisele. Ratchet-like liikumisel ei muutu nende sildade interaktsioonid ja nende rRNA ahelad on liikumatud (Gao et al., 2003; Valle et al., 2003). B2a sild on moodustunud ainult RNA-st ja paikneb tsentraalselt (Yusupov et al., 2001). B4 sild paikneb natuke rohkem perifeerselt ja liskas RNA interaktsioonidele (23S rRNA heeliks 34 ja 16S rRNA heeliks 20) esineb selles sillal ka RNA-alk interaktsioone (23S rRNA heeliks 34 ja S15) (Gao et al., 2003). Ühine on mõõnemale sillale see, et interfereeruvad positsioonid tungivad 50S subühikust välja.

On näidatud, et adeniini N-1 positsioonid osalevad RNA väikse vao interaktsioonides (Nissen et al., 2001). Sild B2a on moodustunud 50S subühiku heeliksis 69 (23S rRNA positsioonid 1912-1918) ja on leitud, et see heeliks sildub 16S rRNA heeliksigi 44 väike vagu- väike vagu interaktsiooniga (Yusupov et al., 2001). Seetõttu võib uskuda, et nähtud interferents 23S rRNA positsioonides 1912 ja 1918 on põhjustatud spetsiifiliste interaktsioonide katkemisest.

23S rRNA heeliks 69 sisaldab kolme pseudouridiini (Ψ 1911, m Ψ 1915 ja Ψ 1917) (Ofengand, 2002). Modifitseeritud nukleosiidid asuvad tavaliselt funktsionaalselt olulistes rRNA regioonides (Ofengand, 2002). Ψ 1915 ja Ψ 1917 on konserveerunud üle kolme organismide riigi ja see näitab, et heeliks-luup 69 on ribosoomi funktsioneerimiseks oluline. Sellele annab tõestust heeliksi 69 kontakteerumine nii A- kui P-saidi tRNA-ga (Yusupov et al., 2001; Stark et al., 2002; Bashan et al., 2003). See teeb 70S ribosoomi heeliksis 69 tsentraalse struktuuri komponendi ja kandidaadi signaali edastamisel (elongatsioonil) 50S ja 30S subühikute vahel. Heeliks 69 mutandid mõjutavad translatsiooni täpsust (O'Connor and Dahlberg, 1995). Lisaks sellele, on näidatud hüdroksüül-radikaal footprintinguga, et anti-aasotsiatsiooni faktor IF3 ja 23S rRNA heeliks 69 kontakteeruvad ühesugustele kohtadele 30S subühikus (Dallas and Noller, 2001). Võib oletada, et silla B2a kahjustamine osaleb ribosoomide subühikute dissotsiatsioonis *in situ*. Heeliks 69 konformatsiooniline paindlikkus (Ban et al., 2000; Harms et al., 2001; Yusupov et al., 2001) võib aidata kaasa A-saidi peptidüül-tRNA aktseptor otsa liigutamisel translokatsiooni ajal, käitudes kui molekulaarne kraana (Bashan et al., 2003). Mailväli and Remme, (2004) tulemused näitavad, et heeliks 69 osaleb subühikute vahelises interaktsioonis ka tRNA juuresolekuta.

5. Funktsionaalsed interaktsioonid 16S rRNA-s.

16S rRNA heeliks 27 tetraluup 900 on üks konserveerunumaid rRNA regioone (Belanger et al., 2004). Heeliks 27 tetraluup 900 moodustab GNRA motiivi (N tähistab kõiki nukleotiide ja R puriine), mis sildub 30S subühiku heeliksiga 24. Nii tetraluup kui ka tema retseptor heeliksis 24 kontakteeruvad 23S rRNA-ga ja moodustavad silla B2c (Yusupov et al., 2003; Gao et al., 2003). Belanger et al., (2004) uurisid 900 tetraluubi ja selle retseptori vahelisi interaktsioone, kasutades selleks geneetilise komplementatsiooni meetodit. Kombineerides spetsiaalse ribosoomi süsteemi (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; Morosyuk et al., 2001) kiire *in vivo* evolutsiooniga, püüdsid nad välja selekteerida heeliks 24 mutandid, mis kompenseerivad 900 tetraluup mutatsiooni (A900G). A900G mutatsioon vähendab ribosoomide aktiivsust, kahjustab subühikute assotsiatsiooni ja translatsiooni täpsust (Belanger et al., 2002). Nad suutsid selekteerida kaks mutanti, milles heeliksi 24 G769-C810 aluspaar oli vahetatud välja U-A või C·A aluspaariga. Kui neid heeliksi 24 mutante vaadati metsiktüüpi 900 tetraluubi kontekstis, siis mutatsioon C•A vähendas ribosoomide aktiivsust, subühikute assotsiatsiooni ja translatsiooni täpsust. U-A mutandil neid tagajärgi ribosoomile ei olnud. A900G mutatsiooni juuresolekul mõned heeliks 24 mutandid suurendasid ribosoomi aktiivsust.



Joonis 3. *E. coli* 16S rRNA heeliksi 24 ja 900 tetraluubi vahelised interaktsioonid (Belanger et al., 2004). (a) 900 tetraluubi ja selle retseptori paiknemine *E. coli* sekundaarstruktuuril. 900 tetraluup ja selle retseptor heeliksis 24 on tähistatud, vastavalt punase ja sinise kastiga. (b) *Thermus thermophilus*'e 30S kristallstruktuur kompleksis mRNA fragmendiga (Ogle et al., 2001). RNA on hall ja valgud tumehallid. RNA heeliksid 18, 44, 24 ja 27 on space-fill struktuuris. 900 tetraluup ja selle retseptor heeliks 24 on vastavalt punane ja tumesinine. Ribosoomi valk S12 ja mRNA fragment A-saidis on samuti näidatud. (c) Skeem 900 tetraluubi ja heeliks 24 vahelisest interaktsioonist. 900 tetraluup sildub heeliks 24 väikse vaoga. Tetraluubi C899 ja A900 (kastis) interakteeruvad heeliks 24 kastis olevate positsioonidega. Positsioonide 900 ja 901 (900 tetraluup) ja 770 ning 771 (heeliks 24) riboos-fosfaat grupid (sinised) interakteeruvad 23S rRNA-ga, moodustavad silla B2c (Yusupov et al., 2001).

E. coli 16S rRNA-s on 900 tetraluubi järjestus GCAA (Joonis 3a). *Thermus thermophilus* 30S subühiku kristallstruktuuril GNRA motiiv sildub heeliks 24 väikse vao kolme nukleotiidi vahele (Joonis 3b, 3c). Heeliks 27 alumine osa interakteerub heeliksiga 44 ja on lähedal dekodeerivale tsentrile ning S12-le (Joonis 3b). *Thermus thermophilus*'e 70S ribosoomi kristallstruktuuril moodustavad tetraluubi positsioonid 900 ja 901 ning heeliksi 24 positsioonid 770 ja 771 selgroo kontakte 23S rRNA heeliksiga 67 (positsioonid 1832-1833) (Yusupov et al., 2001). Need kontaktid moodustavad silla B2c. Cryo-EM uuringud on näidanud heeliks 27 olulisust, mutatsioonid selles heeliksis põhjustavad struktureid ümberkorraldusi terves ribosoomis (Gabashvili et al., 1999). tRNA selektsiooni esimeses etapis aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA), elongatsiooni faktor EF-Tu ja GTP kompleks seostub ribosoomiga ja aa-tRNA antikoodon põgusalt interakteerub A-saidi koodoniga (Rodnina and Wintermeyer, 2001; Ramakrishnan, 2002; Ogle et al., 2003). Sobiva tRNA seondumine põhjustab konformatsioonilisi muutusi dekodeerivas tsentris (Ogle et al., 2001; Pepe et al., 2000; Ogle et al., 2002). Kusjuures 16S rRNA positsioonid A1492, A1493 ja G530 kontrollivad koodon-antikoodon dupleksi väikse vao struktuuri. Korrektned koodon-antikoodon dupleks käivitab 30S subühikus konformatsioonilised ümberkorraldused, mille tulemusena läheb 30S subühik avatud konformatsioonist suletud konformatsiooni (Vila-Sanjurjo et al., 2003; Ogle et al., 2002). Suletud konformatsioonis on 30S subühiku keha ja õlg lihtsalt tihedamini kokku pakitud. tRNA selektsiooni teises etapis kantakse signaal 50S subühikusse, et stimuleerida EF-Tu GTPaaset aktiivsust. EF-Tu•GDB vabanemine aitab aa-tRNA-l sobituda 50S subühiku A-saiti. Mitte sobiv tRNA ei suuda indutseerida 30S subühiku konformatsioonilisi muutusi (suletud konformatsiooni) ja seetõttu ebaõnnestub ka EF-Tu GTPaasse aktiivsuse aktiveerimine. Sobivale tRNA-le lähedased tRNA-d suudavad aktiveerida GTPaasi, kuigi aeglaselt. Need tRNA-d kes suudavad algse selektsiooni läbida, võidakse proofreedingu etapis (peale EF-Tu GTP hüdrolyüüsi) ikkagi välja visata. Kuidas 30S subühiku avatud-suletud konformatsiooni muutused viivad 50S subühiku GTPaasse tsentri aktivatsioonile ei ole teada. tRNA võib ise osaleda subühikute vahelises signalisatsioonis (Yarus and Smith, 1995; Piepenburg et al., 2000; Stark et al., 2002; Valle et al., 2002; Valle et al., 2003), aga samas võivad signalisatsioonis osaleda ka subühikute vahelised sillad (Yusupov et al., 2001; Gabashvili et al., 2000), kaasaarvatud B2c. B2c silla interaktsioonid ei muutu ratchet-like liikumisel ja seetõttu võib see sild osaleda subühikute vahelise interaktsiooni säilitamises (Gao et al., 2003; Tama et al., 2003; Valle et al., 2003).

Spetsiaalses ribosoomi süsteemis kasutati pRNA123 plasmidi, mis sisaldab ribosomaalse RNA operoni (*rrnB*) indutseeritava *lac* promootori kontrolli all. Plasmid sisaldab ka kahte reportergeeni, üks geen kodeerib rohelist fluorestseeruvat valku (GFP) ja teine klooramfenikoli atsüültransferaasi (CAT). Plasmidi poolt kodeeritud 16S rRNA mRNA-d siduv sait (MBS) ja reportergeenide ribosoomi siduv sait (RBS) on muteeritud komplementaarselt. Ainult 30S subühikud, mis sisaldavad plasmidset 16S rRNA-d suudavad initsieerida CAT ja GFP mRNA-de translatsiooni. See süsteem võimaldab uurida 16S rRNA mutatsioone, nii et peremeesorganismi ei kahjustataks. CAT reportergeen tagab resistentsuse klooramfenikolile ja võimaldab *in vivo* mutantsete 16S rRNA-de selektsiooni. GFP reportergeen võimaldab kiirelt ja täpselt hinnata mutantide aktiivsust. Kahe-etapilise juhusliku PCR-ga genereeriti heeliks 24 positsioonidesse 768-770 ja 809-811 mutatsioonid (kõik võimalikud kombinatsioonid nendest 6 positsioonist). Lõppkokkuvõttes jäid ellu 44 kolooniat ja nende sekveneerimisel identifitseeriti 2 erinevat mutatsiooni heeliks 24. Mutatsioonid toimusid heeliks 24 aluspaaris G769-C810 (Joonis 3c). G-C aluspaar on asendatud Watson-Crick U-A paariga või mitte-Watson-Crick paariga C•A. Mutantide GFP aktiivsused on toodud Tabelis 2.

Helix 24			
	C - G ⁷⁶⁹ G - C ⁸¹⁰ A • C WT	C - G C • A A • C G769C/C810A	C - G U - A A • C G769U/C810A
A900	100	10 ± 1	72 ± 5
A900G	10 ± 1	32 ± 2	39 ± 2

Tabel 2. Heeliks 24 mutatsioonide aktiivsused, mis kompenseerivad A900G mutatsiooni (Belanger et al., 2004). Ülemine paneel näitab metsiktüüpi ja mutantsete heeliks 24 järjestust. Muteerunud positsioonid on tähistatud punasega. Iga järjestuse GFP aktiivsused on toodud %-s, vastavalt A900G mutatsiooni olemasolul või mitte. 3-5 sõltumatu katse standardhälve on toodud ±-ga.

A900G mutatsioon üksi põhjustab ribosoomide aktiivsuse languse 10% peale. Watson-Crick U-A aluspaari ja metsiktüüpi tetraluupi sisaldavatel mutantidel oli 72% aktiivsus, võrreldes metsiktüüpi järjestusega. Mitte-Watson-Crick C•A aluspaari mutandil oli 10% aktiivsus. Seega võib oletada, et Watson-Crick interaktsioon aluspaaris 769-810 on oluline ribosoomide funktsioneerimiseks. Kui heeliks 24 mutatsioone uuriti koos A900G mutatsiooniga, siis oli mõnemat mutandil sarnane translatsiooni aktiivsus (U-A 39% ja C•A 32%).

Tetraluubi positsioonid C899 ja A900 on kõige tähtsamad tetraluup-retseptor interaktsioonis (Joonis 3c). GNRA tetraluubid on ribosoomis suhteliselt paindlikud (Correll and Swinger, 2003), aga tänu tihedatele struktuursetele kontaktidele ei ole seda 900 tetraluup. Kõige paindlikum positsioon tetraluup-retseptor interaktsioonis on 769.

Nii tetraluubi kui retseptori positsioonid on konserveerunud. A900 on konserveerunud kolmes fülogeneetilises domeenis 99,8 % ulatuses ja G769-C810 aluspaar 99,3% ulatuses (Belanger et al., 2004). Siinkohal on sobilik öelda, et komplementatsiooni mutantsed

ribosoomid on ainult mõõdukalt aktiivsed ja ei pruugi olla elujõulised looduses. Veelgi enam, komplementatsiooni mutatsioonid heeliksis 24 vajavad dopelt mutatsioonide teket ning sellised evolutsiooni sündmused ei toimu eriti sageli *in vivo*.

Heeliksi 24 mutatsioonide efekti subühikute assotsiatsioonile saab seletada silla B2c mõjutamisega. Tetraluubi positsioonid 900-901 ja heeliks 24 positsioonid 770-771 interakteeruvad suhkur-fosfaat selgrooga pidi 23S rRNA-ga (B2c). Pole teada täpselt, mis sündmused viivad kõigi subühikute vaheliste interaktsioonide tekkele, aga oletatakse, et esineb mingisugune hierarhia sildade moodustumises (millest tuleb juttu hiljem). Kuna silla B2c interaktsioonide takistamine segab subühikute vahelist interaktsiooni, siis võib B2c sild olla üks esimesi selles hierarhias (Belanger et al., 2004).

Heeliks 27 mängib olulist rolli tRNA selektsioonis ja 30S subühiku konformatsioonilistes muutustes (Ramakrishnan, 2002). 30S subühiku muutumisel avatud konformatsioonist suletud konformatsiooni, järgneb sobiva koodon-antikoodon interaktsiooni tuvastamine. Suletud konformatsioonis on 30S subühiku heeliksid 27 ja 44 üksteisele lähemale liikunud (tihedam pakkumine) ning sama asi toimub ka heeliksi 18 ja valguga S12 vahel (Ogle et al., 2002). Mõningad mutatsioonid 16S rRNA-s või r- Valkudes muudavad translatsiooni täpsust. Arvatavasti soodustades või takistades 30S subühiku suletud konformatsiooni teket. Mutatsioonid heeliks 27 alumises osas põhjustavad hüper-täpse fenotüübi teket (Lodmell and Dahlberg, 1997; Velichutina et al., 2000). Need mutatsioonid arvatavasti takistavad heeliksite 27 ja 44 vahelisi kontakte, mille tulemusena heeliksite vaheline interaktsioon väheneb ja ei teki 30S subühiku suletud konformatsiooni. Mutatsioonid valgus S12, samuti põhjustavad hüper-täpse fenotüübi teket. S12 kontakteerub heeliksite 27 ja 44-ga ning seetõttu on jällegi suletud konformatsiooni teke takistatud. Teisest küljest, vigu indutseeriv antibiootikum streptomütsiin vähendab translatsiooni täpsust. Streptomütsiin seostub heeliksitega 27, 44, 18 ja valguga S12 ning toob need ahelad üksteisele lähemale. See soodustab suletud konformatsiooni teket (Carter et al., 2000). Belanger et al., (2004) heeliksisse 24 ja 900 tetraluupi indutseeritud mutatsioonid tekitavad vigaderohke fenotüübi tekke. 900 tetraluubi ja heeliks 24 vaheliste interaktsioonide kahjustamine soodustab heeliks 27 mobiilsust ning mille tulemusena see interakteerub heeliks 44-ga ja 30S subühik läheb suletud konformatsiooni.

Heeliksi 24 ja 900 tetraluubi mutatsioonide efekti translatsiooni täpsusele võib seletada ka teist moodi. Nimelt kui 30S subühik on läinud suletud konformatsiooni, peab signaal jõudma 50S subühikusse ja aktiveerima EF-Tu GTPaasse aktiivsuse, et aa-tRNA paigutataks 50S subühiku A-saiti. Heeliks 27 kontakteerub nii dekodeerivas tsentris oleva heeliks 44-ga kui ka 23S rRNA-ga. Seetõttu võib ta osaleda signaali ülekandmisel 30S subühiku dekodeerivast tsentrist 50S subühikusse. Kui signaal kantaks mööda B2c silda, siis 900 tetraluubi ja heeliks 24 mutandid aeglustavad signaali ülekannet (B2c sild on kahjustatud). See peaks mutandid muutma hüper-täpseteks, kuna neil oleks rohkem aega ebasobiva tRNA väljutamiseks, enne kui see paigutataks A-saiti. Kuna mutandid olid vigasid indutseeriva fenotüübiga, siis vähenenud translatsiooni täpsus ei ole seotud B2c silla kahjustamisest (Belanger et al., 2004).

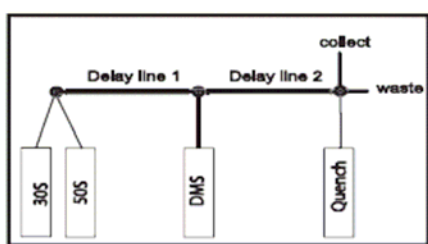
900 tetraluubi ja heeliks 24 interaktsiooni takistamine võib mõjutada ratchet-like liikumist ja seeläbi ka translokatsiooni.

6. Subühikute vaheliste interaktsioonide toimumine ajas.

16S rRNA erinevate regioonide assotsiatsioon on järk-järguline, multi-etapiline protsess, millega kaasnevad konformatsioonilised muutused 30S subühikus. 16S rRNA regioonide struktuur muutub 50S subühiku assotsiatsioonil (Hennelly et al., 2005). Kõige esmalt muutuvateks regioonideks on 16S rRNA dekodeerimisel ja A-sait tRNA sidumisel osalevad piirkonnad, nende struktuur muutub ajas.

Hennelly et al., (2005) kasutasid uutset lähenemist subühikute vaheliste interaktsioonide uurimiseks. Nad proovisid jälgida 16S rRNA positsioonide keemilist kättesaadavust reaalajas, kui subühikud assotseeruvad. See tehnika ühendab endas quench-flow aparati ja keemilise footprintingu meetodit. Selline ajas lahutatud info subühikute vahelisest interaktsioonist võimaldab koostada mudeli, kus mõned rRNA regioonid seostuvad initsiaalselt ja genereerivad struktuursed muutused, mis omakorda võimaldavad järgmistel interaktsioonidel tekkida.

Selles katses kasutati standardset quench-flow aparati, mis sisaldas nelja nõela (Joonis 4). Kaks esimest süstalt sisaldavad subühikuid, kolmas keemilist modifikaatorit (DMS) ja



Joonis 4. Skeem quench-flow aparati töö põhimõttest. Esimesed kaks süstalt sisaldavad 30S ja 50S subühikuid, need segatakse ühel ja samal ajal kokku. Seejärel lastakse subühikutel mingi aeg (delay line 1) assotseeruda ja ühel hetkel tühjendatakse reaktsioonisegusse modifikaator (DMS). DMS-i reaktsioon kustutatakse/peatatakse stoplahuse lisamisega (quench). Delay line 2 näitab modifitseerimise aega.

neljas quench lahust, et kustutada modifikatsiooni reaktsioon. Aparaat võimaldas järjestikuliselt ja kiirelt (millisekundite jooksul) segada reaktsioonisegud kokku. 300 mM DMS kontsentratsiooni juures oli modifikatsiooni kiire faas lõppenud 6 ms jooksul. Quench lahuse kasutasid nad 1:1 (v/v) etanool (Et-OH)/β-merkaptotoetanooli, mida tuli lisada kahe kordses ülehulgas. Kui modifitseerida lasti kauem kui 20 ms, siis toimus ülemodifitseerimine, mille tulemusena tekkisid ebaspetsiifilised muutused rRNA struktuuris.

Selle meetodiga jälgiti 16S rRNA kolme regiooni. Need kolm regiooni moodustavad subühikute vahelisi interaktsioone. Nendeks regioonideks olid heeliks 23, 27 ja 44. Pärast 30S ja 50S subühikute kokku segamist viivitati 25 ms – 5 sekundit (need ajad sisaldavad ka modifikatsiooni aega, milleks oli 12-25 ms) ja seejärel peatati modifikatsiooni reaktsioon. Kogutud fraktsioonidest eraldati 16S rRNA, mida sekveneeriti primer ekstensiooni kasutades.

16S rRNA heeliks 44 positsioonid A1408, A1413, A1418 ja A1441 olid ajast sõltuvalt protekteeritud 50S subühiku poolt. Positsioonide A1408, A1413 ja A1418 protektsioon oli kiire (alla 100 ms jooksul protekteeriti 50S subühiku poolt).

Kõige varajasemaid muutusi nähti 16S rRNA heeliksis 27. Heeliks 27 asub kristallstruktuuril heeliks 44 taga ja moodustab kontakte 1413 regiooniga. Nagu ennist sai räägitud, omistatakse heeliks 27-le regulatoorset rolli 30S subühiku dünaamikale (Belanger et al., 2004). Heeliks 27 positsiooni A908 reaktiivsus DMS-le on vähenenud juba 25 ms juures. A909 protektsioon on sarnane A1408-le. Kuna H27 protektsioon toimub enne A1413 ja A1418 protektsioone, siis arvatavasti H27 interakteerub otse 50S subühikuga ja moodustab silla B2c, interakteerudes 23S rRNA heeliksiga 67. B2c on moodustunud H27 GNRA tetraluubi, H24 tetraluubi retseptori ja 23S rRNA H67 vahel. Nagu eelnevalt juttu oli, on need interaktsioonid tähtsad ribosoomi stabiliseerimisel ja funktsioneerimisel (Belanger et al., 2002; Belanger et al., 2004). 70S ribosoomi kristallstruktuuril ei ole näha positsioonide A908 ja A909 otseseid interaktsioone 50S subühikuga. Konformatsioonilised muutused H27-mes on põhjustatud B2c interaktsioonidest ja kuna H27 asub H44 taga, siis on H27-l võime repositionsioneerida H44 ja soodustada H44 interaktsioone 50S subühikuga. A909 moodustab tripletse interaktsiooni mitte-kanonilise H44 aluspaariga A1413-G1487 (Wimberly et al., 2000), need interaktsioonid on klass III protektsioonid (Moazed and Noller, 1987). Klass III protektsioonid on sellised 30S subühiku protektsioonid, mis moodustuvad neomütsiin klassi antibiootikumide, tRNA või 50S subühiku seondumisel (Yusupov et al., 2001; Moazed et al., 1987; Moazed and Noller, 1990).

Aeglasemalt toimub heeliks 23 positsiooni A702 ja heeliks 44 positsiooni A1441 protektsioon 50S subühiku poolt. Nende positsioonide protektsioon kasvas järk-järgult. Seega esmalt toimuvad muutused heeliksis 27 ja sellele järgnevad muutused heeliksis 44 (väljaarvatud A1408, mis protekteeritakse sama kiirelt kui heeliks 27 positsioonid). Sellele vastavalt toimuvad initsiaalsed kontaktid sildades B2c (A908 ja A909) ja B2a (1408). Seejärel levib protektsioon silda B5 (A1418) ja moodustub interaktsioon heeliks 44 ja heeliks 27 vahel (A1413). Lõpetuseks protekteeritakse dekodeerivast tsentrist kaugemale jääv sild B7a (A702) ja heeliks 44 positsioon A1441. A702 protektsioon 50S subühiku poolt võib olla märk konformatsiooniliste muutuste lõpetamisest 30S subühikus. Sama võib kehtida ka A1441 puhul. A1441 asub suhteliselt kaugel dekodeerivast tsentrist (nagu ka A702). A702 ei osale otseses interaktsioonis 50S subühikuga. A1441 positsiooni protektsioon on arvatavasti põhjustatud selle piirkonna rRNA strukturi muutustest, mis omakorda on põhjustatud naabruses olevatest sillaelementidest.

Natiivsetes tingimustes võib IF1 soodustada kirjeldatud *in vitro* 30S subühiku struktuurset muudatusi (Hannelly et al., 2005). 30S-IF1 kristallstruktuuril on näha muutusi dekodeerivas tsentris (Carter et al., 2001). Nende muutuste hulka kuulub A1492 ja A1493 positsioonide välja hüppamine heeliksis 44, A1493-A1408 interaktsiooni lõhkumine ja ~ 70Å pikkune heeliks 44 venitumine. Arvestades neid muutuseid ja IF1 stimuleerivat efekti subühikute vahelisele interaktsioonile (Grunberg-Mango et al., 1975), võib oletada, et IF1 katalüüsib 30S subühiku assotsiatsiooni eelse konformatsiooni teket ja valmistab 30S subühiku ette tRNA seondumiseks A-saiti (Hannelly et al., 2005).

7. 16S rRNA mittesilduvate hapnike mõju 30S subühiku assambleerumisele ja 70S assotsiatsioonile

Üks vähestest meetoditest rRNA suhkur-fosfaat selgroo uurimisel on α -fosforotioaat nukleotiididel põhinev footprinting või modifikatsiooni-interferentsi meetod (Maiväli et al., 2002; Ghosh and Simpson, 2005). Selle meetodi puhul inkorporeeritakse transkriptsiooni käigus α -fosforotioaat nukleotiidid rRNA ahelasse. Kusjuures modifitseeritud RNA-l säilib ka bioloogiline aktiivsus (Dabrowski et al., 1995; Rudinger et al., 1992).

Ghosh and Joseph, (2005) identifitseerisid 16S rRNA mittesilduvad hapnikud, mis mängivad olulist rolli *E. coli* 30S subühiku assambleerumises ja 70S ribosoomi assotsiatsioonis. 30S subühikud rekonstrueeriti fosforotioaat-modifitseeritud 16S rRNA-st ja 30S valkudest. Aktiivsed 30S subühikud selekteeriti nende võimega seonduda 50S subühikutega ja formeerida 70S ribosoomid. Leitud mittesilduvate hapnike paiknemine kristallstruktuuril, näitas, et osad hapnikud seovad r-valke, kordineerivad metallioone ja moodustavad subühikute vahelise silla. Mõned identifitseeritud hapnikud ei andnud ühtegi interaktsiooni kristallstruktuuril ja seetõttu arvati, et need hapnikud osalevad varajases 30S subühiku assambleerumises.

16S rRNA selgroo interaktsioone esineb 30S assambleerumises ja 70S assotsiatsioonis tunduvalt rohkem kui lämmastikaluse spetsiifilisi interaktsioone (Baudin et al., 1989; Merryman et al., 1999b). See tekitab küsimuse, kas meil on võimalik funktsionaalselt olulisi individuaalseid selgroo positsioone identifitseerida? Ühe selgroo positsiooni modifitseerimine molekulis ei pruugi mängida mingisugust rolli, kuna stabiilsus on tagatud mitmete mittekovalentsete interaktsioonidega.

Ghosh and Joseph, (2005) identifitseerivad ~ 20 mittesilduvat hapniku, mis on hädavajalikud 30S subühiku assambleerimiseks ja ühe hapniku, mis osaleb subühikute vahelisel interaktsioonil. 16S rRNA heeliks 24 positsiooni C770 mittesilduv hapnik on oluline subühikute vahelisel assotsiatsioonil. C770 osaleb B2c silla interaktsioonides. 16S rRNA selgroo nukleotiidid 770-771 interakteeruvad väikest vagu pidu 23S rRNA selgroo positsioonidega 1832-1833. Nagu varasemalt juttu on olnud, mängib B2c sild olulist rolli 70S ribosoomi stabiliseerimisel kui funktsioneerimisel.

8. Eksperimentaalne osa

Töö eesmärk

- Töö eesmärgiks oli välja selgitada funktsionaalselt olulised 16S rRNA positsioonid, millele modifitseerimine takistab 70S ribosoomi assotsiatsiooni. Kuna eelnevalt oli sama meetodit edukalt (modifikatsiooni-interferentsi meetodit) kasutatud 23S rRNA positsioonide kindlaks tegemisel, siis minu ülesanne oli seda meetodit rakendada 30S subühikutele.
- Lisaks sellele proovisin ma välja selgitada minimaalse modifikaatori kontsentratsiooni, mille juures oleks veel võimalik primer ekstensiooniga detekteerida modifikatsiooni-spetsiifilisi signaale.
- Eesmärgiks omaette oli modifitseeritud 70S ribosoomide translatsioonilise aktiivsuse määramine.

8.1 Materjalid ja meetodid

30S subühikute modifitseerimine

Ribosoomi subühikud olid dissotseeritud *E. coli* 70S ribosoomidest 1 mM Mg^{2+} sahharoosi-gradient tsentrifuugimisel (Aivari ja Kai poolt). Mina kasutasin oma töös juba dissotseeritud subühikuid. 300 μ l modifikatsiooni reaktsioon sisaldas 380 pmol 30S subühikuid, 2 mM DTE, 1 x RB (10 mM Mg^{2+} / 80 mM K-Cacodylate/ 100 mM NH_4Cl / 12 mM KOH) või 1 x RBC (10 mM Mg^{2+} / 70 mM K-borate pH 8,1/ 100 mM NH_4Cl) ja modifikaatorit DMS või CMCT. Puhvrit RB kasutasin DMS reaktsioonis ja RBC-d CMCT reaktsioonis. DMS kontsentratsioonid olid 17 mM, 8 mM, 4 mM ja 2 mM (lahustina kasutasin 96% etanooli). CMCT modifikatsiooni kontsentratsioon oli 126 mg/ml. Modifikatsiooni reaktsioon toimus 5 min 37° C ja seejärel peatasin reaktsiooni geelfiltratsiooniga (DMS reaktsiooni peatamiseks lisasin 30 μ l 1% adeniini). Geelfiltratsiooni kolonnile lisasin 800 μ l Sephacryl S400 (Amersham Pharmacia) ja tasakaalustasin 1 x puhvriga P6 (6 mM Mg^{2+} /60 mM NH_4Cl /30 mM Tris-HCl pH 7,5/60 mM KCl/5 mM β -merkaptotanool). Panin reaktsioonisegu kohe peale 5 min inkubeerimist geelfiltratsiooni kolonnile ja tsentrifuugisin 30 sek 2000 rpm. Geelfiltratsioon puhastas reaktsioonisegud reageerimata jäänud modifikaatorist ja sooladest.

Modifitseeritud 30S subühikute reassotsiatsioon natiivsete 50S subühikutega

Assotsiatsioon toimus 1 ml ruumalas. Peale geelfiltratsiooni jäi alles 35-45% 30S subühikutest. Seega assotsiatsioonisegu sisaldab 150 pmol modifitseeritud subühikuid, 180 pmol 50S subühikuid ja 1 x P6. Reassotsiatsiooni viisin läbi 37⁰ C 30 min. Seejärel pipeteerisin proovid 10-20% sahharoosi-gradiendile (1x puhver P6). Sahharoosi-gradient tsentrifugimine Beckmann rootor Sw28, 20.4K rpm, 17h. 70S ja 30S fraktsioonid sadestasin 3 mahu 96% etanooliga, -20⁰ C, üleöö.

16S rRNA eraldamine fraktsioonidest

Üleöö sadenema pandud 70S ja 30S fraktsioonid tsentrifugisid RC-5B rootor SS34, 13 000 rpm, 40 min, 4⁰ C. Sademe võtsin üles 190 µl ddH₂O. Lisasin 1 ml PN, sisaldab kaatroopseid sooli ja alkohole (aitab nukleinhappel seonduda räniga ja vababeda valkudest). 20 min raputasin shaker'is ja seejärel lisasin 10µl 50% ränisuspensiooni. Inkubeerisin reaktsioonisegu aeg-ajalt segades 10 min, 4⁰ C. Tsentrifugimine 6000 rpm 10 sek. Pesin sadet 2 x 70% etanooliga ja elueerisin 50µl ddH₂O. Saadud 16S rRNA-d kasutasin praimer ekstensioonis.

Praimer ekstensioon

Kasutasin 10. erinevat praimerit, milledega skaneerisin 16S rRNA positsioone 1- 1507. Katsesse mille ruumala oli 9µl võtsin 1µg 16S rRNA-d, 1-5 pmol praimerit ja 2µl hübridisatsiooni puhvrit (4 x HB: 225 mM K-Hepes pH 7,5/450 mM KCl). Inkubeerisin 90⁰ C, 30 sek. Jahutasin reaktsioonisegu toatemperatuurile. Lisasin 4µl ekstensioonisegu (14 x ekstensioonisegu: 18,8µl 10xRB/9,2µl dNTP-C/8µl [α -³²P]dCTP/2U Seikagaku AMV pöörtranskriptaas/21,3µl ddH₂O). 10xRB (1,3M Tris-HCl pH 7,5/100 mM MgCl₂/100 mM DTT). DNTP-C (110 µM dAGT/6 µM dCTP). Inkubeerisin reaktsiooni 42⁰ C, 30 min. Lisasin 2µl Chase lahust (1 mM dNTP). Inkubeerisin 42⁰ C, 15 min. Reaktsiooni peatasin 240µl STOP lahusega (300 mM NaOAc pH 4,5, 3 mahtu 96% etanool). Sadestasin proovid üleöö, -20⁰ C. Tsentrifugisid sademe põhja 13 000 rpm, 15 min, 4⁰ C. Beckmann rootor Sw28, 20,4K rpm, 17h. Sademe võtsin üles 10µl formamiidi lahuses. Lahutasin rDNA-d 7% urea-PAAG elektrofooresil.

Praimerid:

16SR1 5'- TTGGAGGTGATCCAACCGCAGG-3'

16SR2 5'-GATCCAACCGCAGGTTCCCC-3'

16ST 5'-CGGCGTGGACTACCAGGG-3'

16SR 5'-TAAGGAGGTGATCCAACC-3'

16SU 5'GCGGCATGGCTGCATCAGGC-3'

16SV 5'-GGGCCATGATGACTTGACG-3'

16SX 5'-CCCTCCATCAGGCAGTTTCCC-3'

16SY 5'-CCAGTAATTCCGATTAACGC-3'

16SZ 5'-CGCTTGTGCGGGCCCCCG-3'

16SW 5'-CCTTGTTACGACTTACC-3'

Polü(U)-sõltuv rakuvaba translatsioon

70S ribosome (10pmol) inkubeerisin 50µl mix A-s (0.06 mg polü(U)/20 mM Hepes pH 8/ 150 mM NH₄OAc pH 6/2 mM spermidiin ja 6 mM MgOAc) 37⁰C, 15 min. Seejärel lisasin 50µl faktoreid sisaldavat mix B-d (20 mM Hepes pH 8;150 mM NH₄OAc pH 6;2

mM spermidiin;6 mM MgOAc;0.07 mg bulk tRNA (Boehring Mannheim);6 mM ATP;4 mM GTP;16 mM phosphoenolpyruvate (PEP);16 μ M Phe;0.02 mM [¹⁴C]Phe (150cpm/pmol, Amersham);2 μ M pyruvate kinase;5,3mg/ml Phe synthetase (PheRS);8,4mg/ml EF-Tu; 12,2mg/ml EF-G;1,1mg/ml EF-Ts). Peale 30 min inkubatsiooni 37⁰ C peatasin reaktsiooni 1ml 5% triklooräädikhappega (TCA) ja kuumutasin 20 min, 95⁰ C. Sademe kogusin GF/A filtrile (Whatman) ja mõõtsin radioaktiivsuse.

8.2 Tulemused

Modifikatsiooni-interferentsi meetod põhineb sellel, et assambleeritakse juhuslikult modifitseeritud makromolekulid funktsionaalsetesse kompleksidesse ja füüsiliselt selekteeritakse aktiivsed ja inaktiivsed subpopulatsioonid (Strobel, 1999). Modifikatsioonid, mis esinevad inaktiivses subpopulatsioonis, aga aktiivses subpopulatsioonis on alaesindatud, nimetatakse interfereeruvaks positsiooniks. Interfereeruv positsioon takistab mingi huvipakkuva makromolekuli funktsiooni. Minu katses oli uuritavaks makromolekuliks 16S rRNA ja huvipakkuvaks funktsiooniks subühikute vaheline assotsiatsioon.

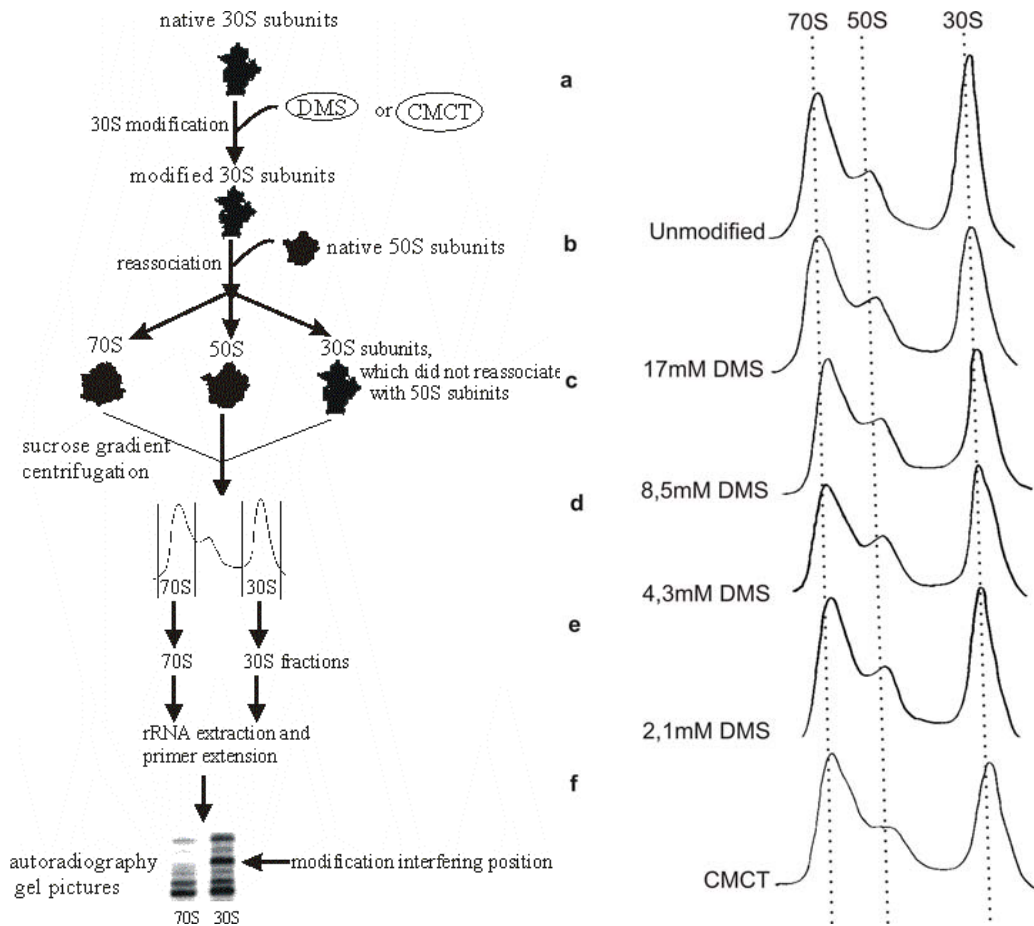
E. coli 30S subühikuid modifitseerisin dimetüülsulfaadiga (DMS; metüleerib adeniini N-1 positsiooni, guaniini N-7 positsiooni ja tsütosiini N-3 positsiooni) või 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p- toluene sulfonaadiga (CMCT; modifitseerib uratsiili N-3 positsiooni ja guaniini N-1 positsiooni). Modifitseeritud 30S subühikud reassotseerisin mitte-modifitseeritud 50S subühikutega. 70S ja 30S populatsioonid lahutasin sahharoosi-gradient tsentrifuugimisel (Joonis 5). 30S subühikute modifitseerimine 2.1, 4.3, 8.5 ja 17 mM DMS-ga või 149 mM CMCT-ga ei muutnud 30S subühiku ega 70S ribosoomi sedimentatsiooni taset (Joonis 5b). Seega 30S subühiku modifitseerimise tulemusena tekkiv 30S populatsioon on struktuurselt homogeenne ja funktsionaalselt aktiivne.

Modifitseeritud nukleotiidide positsioonid tegin kindlaks 70S ja 30S fraktsioonidest eraldatud 16S rRNA praimer ekstensioon analüüsiga. 70S ribosoomi moodustamist takistavateks modifikatsioonideks on need positsioonid, kus modifikatsioon esines 30S subühikus, aga puudus 70S ribosoomis.

Keemilise modifikatsiooni reaktsiooni optimeerimine

DMS on RNA suhtes rohkem reaktiivsem kui CMCT. See suurendab ülemodifikatsiooni ohtu DMS-i poolt. Selle tulemusena tekivad laiahaardelised struktuuri muutused 30S subühikus. CMCT modifikatsioonil kasutasin standardset modifikaatori kontsentratsiooni, mille tulemusena tekib paar modifikatsiooni 16S rRNA molekuli kohta (Stern et al., 1988). Praimer ekstensiooniga detekteeritava DMS-i minimaalse modifikatsiooni kontsentratsiooni välja selgitamiseks, tiitrisin ma DMS kontsentratsiooni. 4.3 mM DMS vastab DMS/30S molaarsele suhtele $3,3 \times 10^3$ (on 2,5 korda madalam standardsest DMS-i kontsentratsioonist; Stern et al., 1988). 4.3 mM DMS kontsentratsioon on minimaalne praimer ekstensiooniga detekteeritav modifikaatori kontsentratsioon.

Kui meie poolt kasutatav keemilise modifikatsiooni tase põhjustaks ebaspetsiifilisi 30S struktuuri katkeid, siis formeerunud ribosoomid oleksid inaktiivsed. Ma kasutasin polü(U)-sõltuvat rakuvaba translatsiooni süsteemi, et testida modifitseeritud 30S subühikute aktiivsust. Kõik modifitseeritud 30S subühikud näitasid maksimaalset polü(Phe) sünteesi (Tabel 3). Need tulemused näitavad, et enamus modifitseeritud 30S subühikutest on funktsionaalselt aktiivsed ja nendes ei ole toimunud ebaspetsiifilisi struktuuri katkemisi. DMS-ga inaktiveerunud 30S fraktsioon ei ületa



Joonis 5. (A) Modifikatsiooni-interferentsi skeem. (B) Modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikute sahharoosi-gradiendi profiilid. (a) Mitte-modifitseeritud 30S subühikute reassotsiatsioon, 6 mM Mg²⁺. (b) 17 mM DMS-ga modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikud. (c) 8,5 mM DMS-ga modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikud. (d) 4,3 mM DMS-ga modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikud. (e) 2,1 mM DMS-ga modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikud (f) CMCT-ga modifitseeritud ja reassotseeritud 30S subühikud.

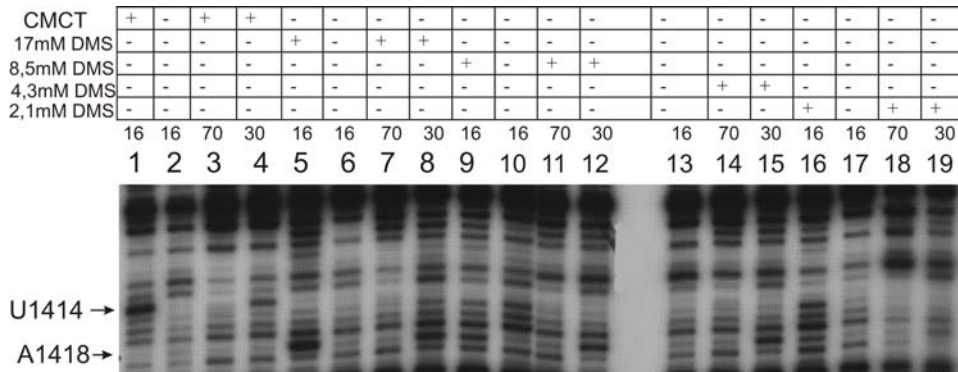
Reassotsiatsioonis kasutatud 30S subühikud	natiivne 30S + natiivse 50S	modifitseeritud 30S + natiivse 50S		
		2 mM DMS	4 mM DMS	8 mM DMS
CPM	10 600 ± 407	10 800 ± 360	11 200 ± 610	11 490 ± 1000

Tabel 3. Polü(U)-sõltuv rakuvaba translatsioon. Natiivne 30S subühik või 2-8 mM DMS-ga modifitseeritud 30S subühik oli reassotseeritud natiivse 50S subühikuga. Ribosoomi partiklid olid lahutatud sahharoosi-gradient tsentrifuugimisel, 70S ribosoomi fraktsioon koguti kokku ja mõõdeti nende aktiivsust polü(U) translatsioonil. ± tähistab kolme erineva katse standardhälvet.

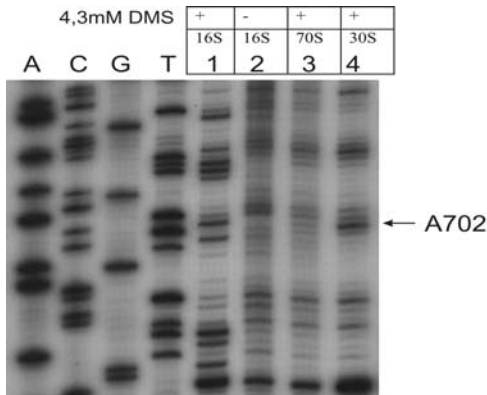
polü(U)-translatsiooni vea taset, mis on <10%. Arvestades, et 8 mM DMS ei vähenda 30S subühikute translatsiooni aktiivsust, siis võib arvata, et 4 mM DMS-i töökonsentratsioonil on inaktiivsete 30S subühikute fraktsioon väiksem. See väike inaktiivsete 30S subühikute fraktsioon on tõenäoliselt inaktiveerunud spetsiifilise üksiku modifikatsiooni tulemusena. Kuna praimer ekstensiooni tehnika on kõrge sensitiivsusega, siis on meil võimalik identifitseerida see väike inaktiivne subpopulatsioon.

16S rRNA positsioonid, mis takistavad 70S ribosoomi reassotsiatsiooni.

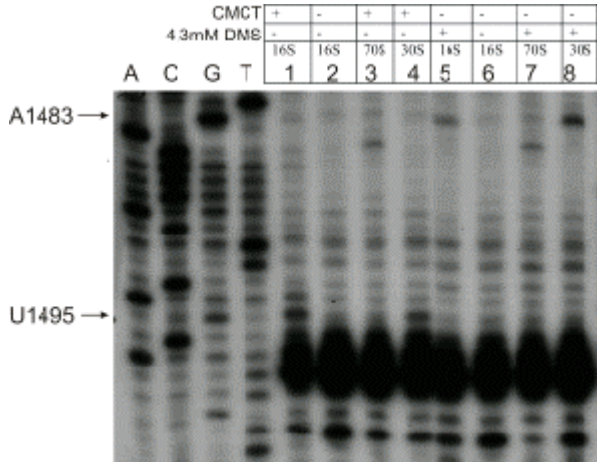
DMS- või CMCT-spetsiifiliste praimer ekstensiooni stoppide leidmiseks skaneerisin läbi 16S rRNA positsioonid 1-1507. Selle tulemusena identifitseerisin ma 141 DMS- ja 48 CMCT-spetsiifilist praimer ekstensiooni stoppi. 189-st modifikatsioonist 6 olid alaesindatud 70S populatsioonis (Joonis 6-9).



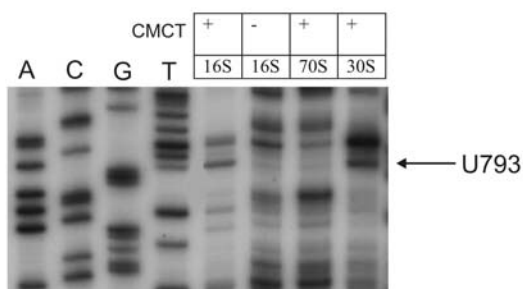
Joonis 6. 16S rRNA praimer ekstensiooni anlüüsi tulemused. Positsioonide U1414 ja A1418 modifitseerimine takistab 70S ribosoomi teket (näidatud nooltega). (+) või (-) tähistab vastavalt, millist modifikaatori kontsentratsiooni on kasutatud või ei ole. 16 tähistab paljast rRNA-d, 70 tähistab 70S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d ja 30 tähistab 30S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d.



Joonis 7. 16S rRNA praimer ekstensiooni anlüüsi tulemused. Positsiooni A702 modifitseerimine takistab 70S ribosoomi teket (näidatud noolega). (+) või (-) tähistab vastavalt, kas on kasutatud 4,3 mM DMS-i või ei ole. 16S tähistab paljast rRNA-d, 70S tähistab 70S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d ja 30S tähistab 30S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d. Sekventsi rajad on märgitud A, C, G ja T-na.



Joonis 8. 16S rRNA praimer ekstensiooni anlüüsi tulemused. Positsioonide A1483 ja U1495 modifitseerimine takistab 70S ribosoomi teket (näidatud noolega). (+) või (-) tähistab vastavalt, kas on kasutatud 4,3 mM DMS-i või CMCT-d. 16S tähistab paljast rRNA-d, 70S tähistab 70S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d ja 30S tähistab 30S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d. Sekventsi rajad on märgitud A, C, G ja T-na.



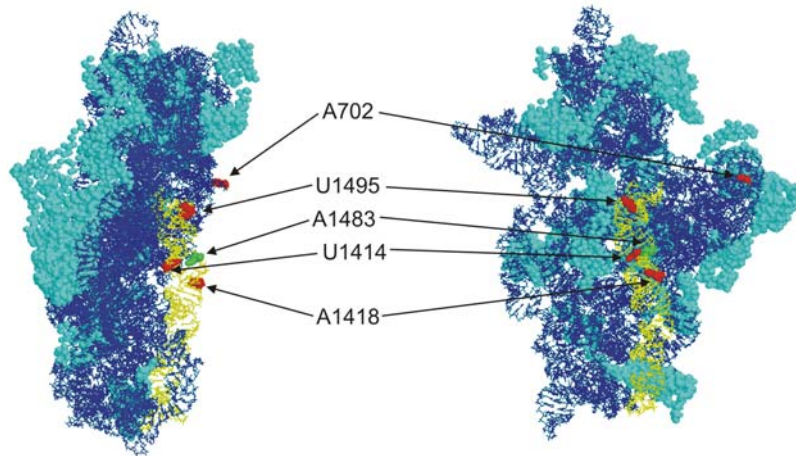
Joonis 9. 16S rRNA primer ekstensiooni anlüüsi tulemused. Positsiooni U793 modifitseerimine takistab 70S ribosoomi teket (näidatud noolega). (+) või (-) tähistab vastavalt, kas on kasutatud CMCT-d või ei ole. 16S tähistab paljast rRNA-d, 70S tähistab 70S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d ja 30S tähistab 30S fraktsioonist eraldatud 16S rRNA-d. Sekventsi rajad on märgitud A, C, G ja T-na.

16S rRNA adensiinid 702, 1418 ja 1483 näitavad DMS-spetsiifilisi primer-ekstensiooni stoppe 30S fraktsioonis, samas 70S fraktsioonis need stopid puuduvad (Joonis 6-8). Seega nende positsioonide metüleerimine segab 30S subühiku võimet reassoitseeruda 50S subühikuga. Sarnaselt, CMCT modifitseerimine 16S rRNA positsioonidest 793, 1414 ja 1495 takistab 70S reassoitsiooni (Joonis 6, 8 ja 9). Mainitud 6 positsiooni segavad 70S reassoitsiooni ka juhul kui üks subühikutest on limiteeritud reassoitsiooni reaktsioonis (andmeid pole esitatud). Kõik DMS-spetsiifilised interferentsid olid reprodutseeruvad erinevatel DMS kontsentratsioonidel (Joonis 6-9, andmeid pole näidatud). Lõppkokkuvõttes saab järeldada nendest tulemustest seda, et 16S rRNA positsioonid 702, 793, 1414, 1418, 1483 ja 1495 on funktsionaalselt olulised 70S ribosoomi stabiilsuse tagamiseks.

8.3 Arutelu

Ma olen näidanud, et kuue positsiooni modifitseerimine 16S rRNA-s (A702, U793, U1414, A1418, A1483 ja U1495) oluliselt vähendab modifitseeritud 30S subühikute võimet moodustada 70S ribosoomi *in vitro*. Kõik interfereeruvad positsioonid asuvad tuntud silla positsioonides või nende ligidal (Chapman and Noller, 1977; Herr and Noller, 1979; Merryman et al., 1999 a, b; Yusupov et al., 2001; Gabashvili et al., 2000; Gao et al., 2003). Mitte kõik keemiliselt modifitseeritud silla positsioonid ei takista 70S ribosoomi formeerumist. 16S rRNA-s on 23 adensiini ja 11 uratsiili, mis moodustavad subühikute vahelisi silde 50S subühikuga. Modifikatsiooni-interferentsi meetod võimaldab identifitseerida funktsionaalselt olulisi subühikute vahelisi interaktsioone ja seda ilma tRNA olemasoluta.

A702 N-1 positsiooni metüleerimine takistab 70S ribosoomi teket (Joonis 7). A702 paikneb 16S rRNA heeliksis 23 ja moodustab subühikute vahelise silla B7a (Joonis 10).



Joonis 10. Interfereerivate positsioonide paiknemine *Thermus thermophilus*'e 30S subühiku kristallstruktuuril (Schluenzen et al. 2000; Wimberly et al. 2000; PDB accession code 1FKA). Vasak vaade on 30S subühiku A-saidi poolsest küljest ja parem vaade on subühikute vahelisest pinnas. Nooled näitavad interfereerivate positsioonide asukohta (*E. coli* numeratsioon). RasWin molekulaarset graafikat kasutati interfereerivate positsioonide välja toomiseks 30S struktuuril (punased ja rohelised spacefillid). Kogu rRNA on sinine traatjas struktuur, väljaarvatud heeliks 44 (kollane). r-valgud on cyan spacefilli struktuuris.

Veel spetsiifilisemalt, A702 moodustab A-minoorse interaktsiooni 23S rRNA heeliks 68 väikse vaoga (Yusupov et al., 2001). A702 on protekteeritud modifikatsiooni eest kui tRNA on seotud 70S ribosoomi P/P saiti (Moazed and Noller, 1989a), aga huvitaval kombel saab kättesaadavaks kui tRNA liigub P/E hübriid-saiti. See viitab struktuursetele muutustele sillas B7a või selle ümbruses. EF-G•GTP seondumine soodustab ribosoomi hübriid konformatsiooni teket (Zavialov and Ehrenberg, 2003). *S. cerevisiae*'s põhjustab EF-G•GTP seondumine ribosoomiga B7a silla konformatsioonile muutuse 5-5,5Å ulatuses (Spahn et al., 2004), aga seda arvatavasti mitte *E. coli*'s (Valle et al., 2003b).

Feinberg and Joseph, (2001) näitasid, et peptidüül-tRNA positsiooni 71 2'-hüdrosüülrühma metüleerimine takistab EF-G vahendatud translokatsiooni. Ainuke kontakt on moodustunud peptidüül-tRNA positsiooni 71 ja 50S E-saidi heeliks 68 vahel (Yusupov et al., 2001). Huvitav on asjaolu, et 71 riboos kontakteerub 23S rRNA heeliksiga 68 ja see kontakt on lähedal 16S rRNA A702 kontaktile 23S rRNA heeliksis 68. On raske otse seletada peptidüül-tRNA riboos 71 metülatsiooni efekti translokatsioonile, kuna EF-G interaktsioon ribosoomiga paikneb 70Å kaugusel riboosist 71. tRNA riboos 71 metüleerimine võib taksitada translokatsiooni, inhibeerides P/E hübriid-saidi teket. 23S rRNA heeliks 68 ja tRNA riboos 71 vaheline interaktsioon võib stabiliseerida P/E hübriid-saiti. Või siis on takistatud tRNA seostumine kanoonilisse E-saiti (Feinberg and Joseph, 2001).

Subühikute vaheline interaktsioon protekteerib A702 ka ajast sõltuvalt (Hannelly et al., 2005). Selle positsiooni protektsioon kasvas järk-järgult aina tugevamaks. Hannelly et al., (2005) oletavad, et A702 positsiooni protektsioon soodustab või signaleerib 30S

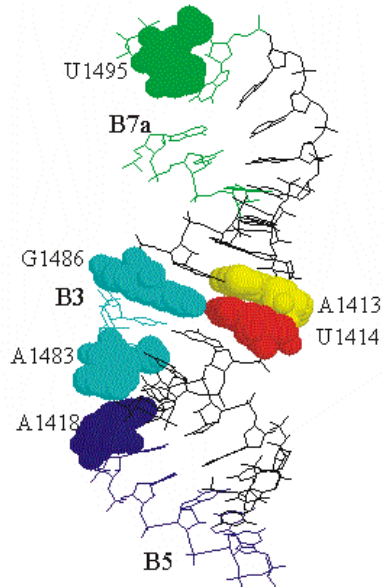
subühikutes toimuvate konformatsiooniliste muutuste lõpetamist. Minu tulemused näitavad, et sild B7a (Lisa: Joonis 1) aitab kaasa 70S ribosoomi formeerumisele ja seda ka ilma tRNA-ta.

Heeliks 44 A1418 ja A1483 metüleerimine N-1 positsioonist takistab 70S reassotsiatsiooni (Joonis 6, 8, Lisa: Joonis 1). A1418 ja A1483 ei osale intramolekulaarsetes interaktsioonides (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). *Thermus thermophilus*'e 30S kristallstruktuuril asetsevad A1418 ja A1483 üksteisest ~3,1Å kaugusel. (Joonis 6-7). A1418 osaleb subühikute vahelise silla B5 interaktsioonides, kontakteerudes 23S rRNA heeliksi 64 väikse vaoga (Yusupov et al., 2001). A1483 moodustab silla B3, interakteerudes 23S rRNA heeliksi 71 positsiooniga 1947 (Yusupov et al., 2001). Subühikute vaheline assotsiatsioon protekteerib ajas lahutatult ka positsiooni A1418 (Hannelly et al., 2005). A1418 protektsioon oli aeglasem kui 16S rRNA 900 regiooni positsioonide protektsioon, aga samas toimus A1418 protektsioon kiiremini kui A702 ja A1441 (Hannelly et al., 2005). A1418 ja A1483 on osaliselt protekteeritud. tRNA seondumine ribosoomile suurendab nende positsioonide interaktsiooni tugevust 50S subühikuga. Kui 50S subühikut ei ole, siis tRNA ei mõjuta nende positsioonide interaktsioone, tRNA ei seostu ostse A1418 ja A1483-ga (Moazed and Noller, 1990).

Alus-spetsiifiliste keemiliste modifikaatoritega on kindlaks tehtud IF2 lokaliseerimine 70S ribosoomil (LaTeana et al., 2001). IF2 protekteeris positsioone A1418 ja A1483, aga seda ainult 70S ribosoomis (IF2, 70S ribosoomid). IF2 ei protekteerinud neid positsioone 30S subühikus (IF2, 30S subühikud). IF2-l on sama efekt kui tRNA-l, toimub subühikute vahelise interaktsiooni suurenemine. 16S rRNA keemilise footprintingu ja sahharoosi tihedusgradiendi analüüsid (Grunberg-Mango et al., 1975; Prestova et al., 2000) kinnitavad, et IF2 soodustab subühikute vahelist interaktsiooni (LaTeana et al., 2001). IF2 ja tRNA seondumine ribosoomiga suurendab subühik-subühik interaktsioone läbi 16S rRNA positsioonide A1418 ja A1483. Need tulemused näitavad, et A1418 ja A1483 on oluline roll subühikute vaheliste interaktsioonide reguleerimises. Minu tulemused näitavad, et subühikute vaheliste interaktsioonide funktsioneerimiseks ei ole vaja tRNA kontakte. 23S rRNA heeliksi 71 ja 16S rRNA heeliksi 44 vahelistes kontaktides on olulised 16S rRNA positsioonid A1418 ja A1483. Sildade B3 ja B5 interaktsioonid märkimisväärselt ei muutu ratchet-like liikumisel (Gao et al., 2003; Spahn et al., 2004).

Ma leidsin ka CMCT-spetsiifilisi interferentse. 16S rRNA U1414 N-3 positsiooni modifitseerimine segab 70S ribosoomi assotsiatsiooni. (Joonis 6, Lisa: Joonis 1). U1414 aluspaardub G1486-ga, mis moodustab silla B3. (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001). U1414 on protekteeritud 50S subühiku poolt Pb(II) lõikamise eest (Merryman et al., 1999b). Kuna subühikute vaheline interaktsioon on Mg²⁺ sõltuv ja kuna Pb(II) seostub sageli magneesiumi seostumise saiti, siis võib U1414 osaleda magneesiumiooni kordineerimises (Merryman et al., 1999b). Teisest küljest on leitud, et A1413 on protekteeritud 50S subühiku poolt (Merryman et al., 1999b) ja A1413 on protekteeritud subühikute vahelisel assotsiatsioonil ka ajast sõltuvalt (Hannelly et al., 2005). Mitte-kanooniline aluspaar A1413-G1487 moodustab tripletse interaktsiooni 16S

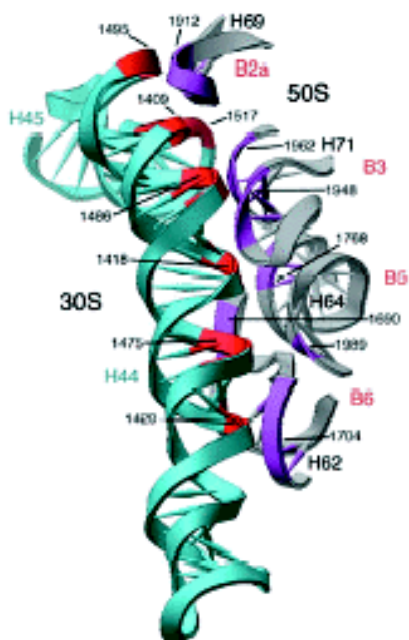
rRNA positsiooniga A909 (Wimberly et al., 2000). A909 on ajast-sõltuvalt protekteeritud 50S subühiku poolt (Hannelly et al., 2005). U1414 modifitseerimine CMCT-ga võib kahjustada neid interaktsioone. Kaugus U1414 N-3 positsiooni ja G1487 N-2 vahel on ~3Å (Schluenzen et al. 2000; PDB accession code 1FKA).



Joonis 11. Interfereerivate positsioonide paiknemine *Thermus thermophilus*'e 30S subühiku kristallstruktuuril (Schluenzen et al. 2000; Wimberly et al. 2000; PDB accession code 1FKA). Joonisel on heeliks 44 ülemine osa. Lilla värv tähistab B5 sillapositsioone, cyan B3 ja roheline B7a. Interfereerivad positsioonid U1414, A1418, A1483 ja U1495 on vastavalt nummerdatud (*E. coli* numeratsioon) ja spacefillis. A1413 (kollane) on protekteeritud ajasõltuvalt (Hannelly et al., 2005). G1486 (cyan spacefill) aluspaardub U1414-ga ja samas moodustab subühikute vahelise silla B3. Ülejäänud rRNA on mustas traatjas struktuuris.

CMCT-spetsiifilist modifikatsiooni-inteferentsi oli näha ka positsioonis U793 (Joonis 9). U793 on protekteeritud subühikute vahelisel interaktsioonil (Merryman et al., 1999b). U793 paikneb 16S rRNA heeliksist 24 (Lisa: Joonis 1). U793 ei ole lahutatud *Thermus thermophilus*'e kristallstruktuuril (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001). U793 naabrid heeliksis 24 moodustavad subühikute vahelise silla B2b (Yusupov et al., 2001; Gao et al., 2003). B2b silla komponendid 23S rRNA poole pealt on heeliks 69. U793 protektsioon 50S subühikuga (nagu A702, A1418 ja A1483) tugevneb tRNA seostumisega ribosoomile (Moazed and Noller, 1990).

Viimasena käsitlen ma 16S rRNA heeliks 44 positsiooni U1495, mis samuti, nagu eelmised viis positsiooni takistab 70S ribosoomi teket. (Joonis 8). U1495 modustab heeliksis 44 kõrgelt konserveerunud aluspaari U1406-ga. Lisaks sellele interakteerub U1495 otse 23S rRNA positsiooniga A1912 (Joonis 12) (Yusupov et al., 2001). Maiväli



Joonis 12. Subühikute vaheliste sildade paiknemine *Thermus thermophilus*'e 70S ribosoomi kristallstruktuuril (Yusupov et al., 2001). 16S rRNA heeliks 44 on kujutatud rohelise lindina ja 16S rRNA subühikute vahelised sillaposisioonid on värvitud punaseks. 23S rRNA heeliksid 62, 64, 69, 71 on kujutatud hallide lintidena ja 23S rRNA sillaposisioonid on värvitud violetselt. 16S rRNA positsioon U1495 ja 23S rRNA positsioon A1912 moodustavad subühikute vahelise silla B2a.

and Remme, (2004) leidsid, et 23S rRNA A1912 modifitseerimine DMS-ga segab subühikute vahelist interaktsiooni. See näitab, et sild B2a mängib olulist rolli 70S ribosoomi struktuuri stabiliseerimisel. Lisaks sellele, osaleb B2a sild A- ja P-saidi tRNA seostumise reguleerimises (Yusupov et al., 2001). Kusjuures, punktmutatsioon A1912G põhjustab ranga translatsiooni aktiivsuse vähenemise, nii *in vivo* kui *in vitro* (Liiv et al., 2005). U1495:U1406 aluspaar moodustab ribosoomis aminoglükosiidide seostumise tasku (Pfister et al., 2003). Mutatsioonid aluspaaris U1495:U1406 tekitavad resistentsuse aminoglükosiididele. U1495:U1406 muteerimine tsütosiiniks või adeniiniks, põhjustab madala kuni mõõduka resistentsuse aminoglükosiidide suhtes. U1406C/U1495A dopelmutant põhjustab kõrgetasemelise resistentsuse tekke (väljaarvatud neomütsiin), mis viitab sellele, et aminoglükosiidide seostumine A-saiti oleneb U1495:U1406 paari kindlast geometriast (Pfister et al., 2003). Kristallstruktuuril on U1495:U1406 paar erinevates asendites kui nendega on seotud erinevad aminoglükosiidid (Vicens and Westhof, 2003). Seega A1495 geometria võib mängida olulist rolli *in vivo* 70S ribosoomide translatsiooni täpsusele (Pape et al., 2000; Carter et al., 2000; Ogle et al., 2001).

Kokkuvõte

Positiivsed tulemused näitavad, et modifikatsiooni-interferentsi meetodiga on võimalik selekteerida funktsionaalselt olulisi positsioone. Mina uurisin 70S ribosoomi assotsiatsiooni protsessi ja selekteerisin välja 6 funktsionaalset olulist 16S rRNA positsiooni, millede modifitseerimine takistab nende funktsioneerimist reassotsiatsiooni protsessis. Enamus nendest positsioonidest moodustavad subühikute vahelisi sildu. Seega sillad B2a, B3, B5 ja B7a tagavad 70S ribosoomile stabiilsuse. Lisaks võivad subühikute vahelised sillad osaleda ka translokatsioonis, subühikute vahelises signaalisatsioon, translatsiooni täpsuse reguleerimisel jne. Ribosoomi dünaamiliste protsesside mõistmiseks on vaja kokku viia nii cryo-EM, kristallstruktuuride kui ka keemiliste meetoditega saadud tulemused.

Summary

The ribosome consist of two subunits wich make intersubunit bridges. Intersubunit contacts participate in 70S ribosome formation, stabilization and during dynamic translocation. We used modification interference approach to determine *Escherichia coli* 16S rRNA positions that are essential for the association of functionally active 70S ribosome. Modification of the N-1 position of A702, A1418 and A1483 with DMS and modification of the N-3 position of U793, U1414 and U1495 with CMCT in *Escherichia coli* 30S subunits interfere 70S ribosome formation. These bases localize 16S rRNA helices 23, 24 and 44. Four of these positions participate formation of intersubunit bridges, namely B2a (U1495), B3 (A1483), B5 (A1418) and B7a (A702). U1414 does not participate directly in formation of intersubunit bridges but forms G•U base pair with G1486 which occupies bridge B3. The results help to specify chemical groups involved in the inter-subunit contacts and are essential for ensuring stability of the 70S ribosome.

Viited

- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., and Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6134–6138.
- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., and Frank, J. (1999). Effect of buffer conditions on the position of tRNA on the 70S ribosome as visualized by cryo-electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **274**, 8723-8729.
- Arnez, J.G., and Steitz, T.A. (1996). Crystal structures of three misacylating mutants of *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA (Gln) and ATP. *Biochemistry* **35**, 14725-14733.
- Ballesta, J.P., Remacha, M. (1996) The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**, 157–193.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B, and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Bashan, A., Agmon, I., Zarivach, R., Schlutzen, F., Harms, J., Berisio, R., Bartels, H., Franceschi, F., Auerbach, T., Hansen, H.A., et al., (2003). Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol. Cell* **11**, 91-102.
- Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Eyermann, F., Ebel, J.P., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1989). Probing the phosphates of the *Escherichia coli* ribosomal 16S rRNA in its naked form, in the 30S subunit, and in the 70S ribosome. *Biochemistry* **28**, 5847-5855.
- Belanger, F., Le'ger, M., Saraiya, A. A., Cunningham, P. R. and Brakier-Gingras, L. (2002). Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **320**, 979–989.
- Belanger, F., Gagnon, M. G., Steinberg, S.V., Cunningham, P.R., and Braker-Gingras, L. (2004). Study of the functional interaction of the 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome. *J. Mol. Biol.* **338**, 683-693.
- Blaha, G., Burkhardt, N., and Nierhaus, K.H. (2002). Formation of 70S ribosomes: large activation energy is required for the adaptation of exclusively the small ribosomal subunit. *Biophysical Chemistry* **96**, 153-161.
- Bommer, U., Burkhard, N., Jünemann, R., Spahn, C.M.T., Triana-Alonso, F.J., and Nierhaus, K.H. (1996). Ribosomes and polysomes. In *Subcellular fractionation. A practical approach* (eds. J. Graham and D. Rickwoods), pp. 271-301. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2002). Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J. Mol. Biol.* **316**, 725–768.
- Capa, L., Mendoza, A., Lavandera, J.L., Gomez de las Heras, F., Garcia-Bustos, J.F. (1998). Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2694–2699.
- Carter, A.P., Clemons, M.W., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348.

- Carter, A. P., Clemons, W. M., Jr, Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30 S ribosomal subunit. *Science* **291**, 498–501.
- Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., and Noller, H.F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**, 2095–2104.
- Chapman, N.M., and Noller, H.F. (1977) Protection of specific sites in 16S rRNA from chemical modification by association of 30S and 50S ribosomes. *J. Mol. Biol.* **109**, 131-149
- Chinali, G., and Parmeggiani, A. (1982) Differential modulation of the elongation-factor-G GTPase activity by tRNA bound to the ribosomal A-site or P-site. *Eur. J. Biochem.* **125**, 415-421.
- Dabrowski, M., Spahn, C.M.T., and Nierhaus, K.H. (1995). *EMBO J* **14**, 4872-4882.
- Dallas, A., and Noller, H.F. (2001). Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol. Cell* **8**, 855-864.
- Dominguez, JM., Gomez-Lorenzo, MG., Martin, JJ. (1999). Sordarin inhibits fungal protein synthesis by blocking translocation differently to fusidic acid. *J Biol Chem* **274**, 22423–22427.
- Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Grassucci, R., Squires, C. L., Dahlberg, A. E. & Frank, J. (1999). Major rearrangements in the 70 S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16 S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**, 6501–6507.
- Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Svergun, D. I., Frank, J. & Penczek, P. (2000). Solution structure of the *E. coli* 70 S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* **100**, 537–549.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M. et al. (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70 S ribosome using real-space refinement. *Cell* **113**, 789–801.
- Ghosh, S. and Joseph, S. (2005) Nonbridging phosphate oxygens in 16S rRNA important for 30S subunit assembly and association with the 50S ribosomal subunit.
- Gomez-Lorenzo, M.G., Spahn, C.M.T., Agrawal, R.K., Grassucci, R.A., Penczek, P., Chakraburttu, K., Ballesta, J.P., Lavandera, J.L., Garcia-Bustos, J.F., and Frank, J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17,5 Å resolution. *EMBO J.* **19**, 2710-2718.
- Grunberg-Manago, M., Dessen, P., Pantaloni, D., Godefroy-Colburn, T., Wolfe, A.D., and Dondon, J. (1975). Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* **94**, 461-478.
- Gualerzi, C.O. and Pon, C.L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.
- Görisch, H., Goss, D.J., and Parkhurst, L.J. (1976) Kinetics of ribosome dissociation and subunit association studied in a light-scattering stopped-flow apparatus. *Biochemistry* **15**, 5743-5753.
- Feinberg, J.S., and Joseph, S. (2001). Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc. Natl Acad. Sci.* **98**, 11120-11125.
- Foley, BT., Moehring, JM., Moehring, TJ. (1995). Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A. Genetic and biochemical analyses. *J Biol Chem* **270**, 23218–23225

- Frank, J. and Agrawal, R.K. (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**, 318-322.
- Frank, J., and Agrawal, R.K. (2001). Ratchet-like movements between the two ribosomal subunits: their implications in elongation factor recognition and tRNA translocation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. (Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 67–75.
- Frank, J., Verschoor, A., Li, Y., Zhu, J., Lata, R.K., Radermacher, M., Penczek, P., Grassucci, R., Agrawal, R.K., and Srivastava, S. (1995). A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 757–765.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-688.
- Hartz, D., Binkley, J., Hollingsworth, T. and Gold, L. (1990). Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF-3. *Genes Dev.* **4**, 1790-1800.
- Hartz, D., McPheeters, D. S. and Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev.* **3**, 1899-1912.
- Hennelly, S.P., Antoun, A., Ehrenberg, M., Gualerzi, C.O., Knight, W., Lodmell, J.S., and Hill, E.W. (2005). A Time-resolved investigation of ribosomal subunit association. *J. Mol. Biol.* **346**, 1243-1258.
- Herr, W., Chapman, N.M., and Noller, H.F. (1979) Mechanism of ribosomal subunit association: discrimination of specific sites in 16S rRNA essential for association activity. *J. Mol. Biol.* **130**, 433-449.
- Herr, W., and Noller, H.F. (1979) Protection of specific sites in 23S rRNA and 5S rRNA from chemical modification by association of 30S and 50S ribosomes. *J. Mol. Biol.* **130**, 421-432
- van der Hofstad, G.A.J.M., Buitenhek, A., van den Elsen, P., Voorma, H.O., and Bosch, L. (1979). Binding of labeled initiation factor IF1 to ribosomal particles and the relationships to the mode of IF1 action in ribosome dissociation. *Eur. J. Biochem.* **89**, 221-228.
- Hui Bon Hoa, G., Graffe, M., and Grunberg-Manago, M. (1977) Thermodynamic studies of the reversible association of *Escherichia coli* ribosomal subunits. *Biochemistry* **16**, 2800-2805
- Joseph, S., Noller, HF. (1998). EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome. *EMBO J* **17**, 3478–3483.
- Jørgensen, R., Ortiz, PA., Carr-Schmid, A., Nissen, P., Kinzy, TG., Andersen, GR. (2003). Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat Struct Biol* **10**, 379–385.
- Justice, MC., Hsu, MJ., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D., Nielsen, J. (1998). Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J Biol Chem* **273**, 3148–3151.
- Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, AT., Nagaev, I., Hughes, D., Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J Mol Biol* **303**, 593–603.
- Lee, K., Varma, S., SantaLucia, J., Jr and Cunningham, P. R. (1997). In vivo determination of RNA structure–function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **269**, 732–743.

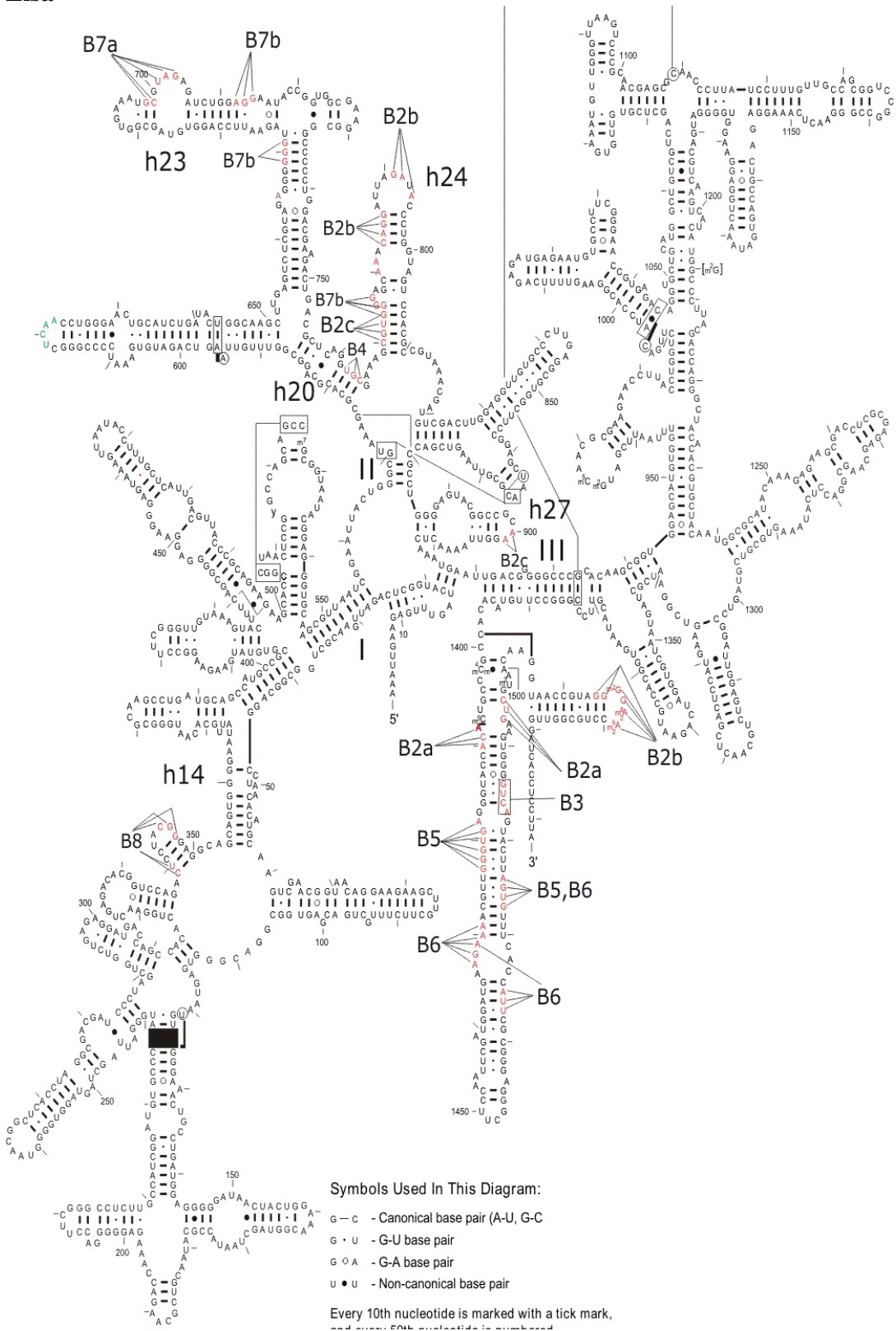
- Lodmell, J. S. and Dahlberg, A. E. (1997). A conformational switch in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science*, **277**, 1262–1267.
- Lucas-Lenard, J., and Lipmann, F. (1967). Initiation of polyphenylalanine synthesis by N-acetylphenylalanyl-SRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1050-1057.
- Maiväli, Ü., Pulk, A., Loogväli, E., and Remme, J. (2002). Accessibility of phosphates in domain I of 23S rRNA in the ribosomal 50S subunit as detected by R_p phosphorothioates. *Biochem. Biophys. Acta* **1579**, 1-7.
- Maiväli, Ü. and Remme, J. (2004). Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *RNA* **10**, 600-604.
- Merryman, C., Moazed, D., Daubresse, G, Noller, H.F. (1999a) Nucleotides in 23S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **285**, 107-113.
- Merryman, C., Moazed, D., McWhirter, J., and Noller, H.F. (1999b). Nucleotides in 16S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **285**, 97-105.
- Mitchell, P., Oswald, M., and Brimacombe, R. (1992) Identification of intermolecular RNA cross-links at the subunit interface of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry* **31**, 3004-3011.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16 S ribosomal RNA. *Nature*, **327**, 389–394.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1989a). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**, 142-148.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1989b). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P and E sites. *Cell* **57**, 585-597.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1990). Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16S rRNA. *J. Mol. Biol.* **211**, 135-145.
- Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**, 229–235.
- Morosyuk, S. V., Lee, K., SantaLucia, J., Jr and Cunningham, P. R. (2000). Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J. Mol. Biol.* **300**, 113–126.
- Morosyuk, S. V., SantaLucia, J., Jr and Cunningham, P. R. (2001). Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. Functional analysis of the 690 loop. *J. Mol. Biol.* **307**, 213–228.
- Muralikrishna, P. and Wickstrom, E. (1989). *Escherichia coli* initiation factor 3 protein binding to 30S ribosomal subunits alters the accessibility of nucleotides within the conserved central region of 16S rRNA. *Biochemistry* **28**, 7505-7510.
- Nierhaus, K.H. (1991) The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie* **73**, 739-755.
- Nierhaus, K.H., Spahn, C.M.T., Burkhardt, N., et al., Ribosomal elongation cycle, in: Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B., Noller, H.F. (Eds.) (2000), The ribosome.

- Structure, function, antibiotics and cellular interactions. *ASM Press, Washington DC, USA* pp. 319-335.
- Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunits: The A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4899-4903.
- Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., and Cate, J.H.D. (2002). Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Letters* **514**, 11-16.
- O'Connor, M., and Dahlberg, A.E. (1995). The involvement of two distinct regions of 23S ribosomal RNA in tRNA selection. *J. Mol. Biol.* **254**, 838-847.
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* **514**, 17-25.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr, Tarry, M. J., Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30 S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902.
- Ogle, J.M., Murphy, F. V., Tarry, M. J. & Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, **111** 721-732.
- Ogle, J. M., Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2003). Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 259-266.
- Pape, T., Wintermeyer, M., Rodnina, V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 104-107.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E, and Hellen, C.U.T. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**, 332-335.
- Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Böttger, E.C., and Westhof, E. (2003). The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: Relationship between ribosomal susceptibility and X-Ray crystal structures. *ChemBioChem* **4**, 1078-1088.
- Piepenburg, O., Pape, T., Pleiss, J. A., Wintermeyer, W., Uhlenbeck, O. C. & Rodnina, M. V. (2000). Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry* **39**, 1734-1738.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**, 557-572.
- Risuleo, G., Gualerzi, C., and Pon, C. (1976) Specificity and properties of the destabilization, induced by initiation factor IF-3, of ternary complexes of the 30S ribosomal subunit, aminoacyl-tRNA and polynucleotides. *Eur. J. Biochem.* **67**, 603-613
- Rodnina, M., Savelsbergh, A., Katunin, VI., Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385**, 37-41
- Rodnina, MV., Semenov Iu, P., Savelsbergh, A., Katunin, VI., Peske, F., Wilden, B., Wintermeyer, W. (2001) Mechanism of tRNA translocation on the ribosome. *Mol Biol (Mosk)* **35**, 655-665
- Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2001). Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 415-435.
- Roseman, A.M. (2000). Docking structures of domains into maps from cryo-electron microscopy using local correlation. *Acta Crystallogr.* **D56**, 1332-1340.
- Rossmann, M.G. (2000). Fitting atomic models into electron-microscopy maps. *Acta Crystallogr.* **D56**, 1341-1349.

- Rudinger, J., Puglisi, J.D., Putz, J., et al., (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5882-5886.
- Savelsbergh, A., Katunin, V.I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2003). An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol Cell* **11**, 1517-1523.
- Schlutzen, F., Tociji, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**, 615-623.
- Shapkina, T.G., Dolan, A.M., Babin, P. and Wollenzien, P. (2000). Initiation factor 3-induced structural changes in the 30S ribosomal subunit and in complexes containing tRNA^{Met} and mRNA. *J. Mol. Biol.* **299**, 615-628.
- Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*- RNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**, 373-386.
- Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jorgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., Frank, J. (2004) Domain movement of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *ENBO J.* **23**, 1008-1019.
- Spahn, C.M.T., Prescott, C.D. (1996) Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J Mol Med* **74**, 423-429
- Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., Zemlin, F., Wintermeyer, W. & van Heel, M. (2002). Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nature Struct. Biol.* **9**, 849-854.
- Stern, S., Moazed, D., and Noller, H.F. (1988). Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Methods Enzymol.* **164**, 481-489.
- Strobel, S.A. (1999) A chemogenetic approach to RNA function/structure analysis. *Curr Opin Struct Biol.* **9**, 346-351.
- Susmann, J.K., Simons, E.L., and Simons, R.W. (1996) *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **21**, 347-360
- Tama, F., Valle, M., Frank, J. & Brooks, C. L., 3rd (2003). Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 9319-9323.
- Teana, A.L., Gualerzi, C.O., and Dahlberg, A.E. (2001). Initiation factor IF2 binds to the α-sarcin loop and helix 89 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA* **7**, 1173-1179.
- Valle, M., Sengupta, J., Swami, N. K., Grassucci, R. A., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H. et al. (2002). Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.* **21**, 3557-3567.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S. M., Sengupta, J., Nielsen, R. C. et al. (2003a). Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nature Struct. Biol.* **10**, 899-906.

- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. & Frank, J. (2003b). Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**, 123–134.
- Vassilenko, S.K., Carbon, P., Ebel, J.P., and Ehresmann, C. (1981). Topography of 16S rRNA in 30S subunits and 70S ribosomes: accessibility to cobra venom ribonuclease. *J. Mol. Biol.* **152**, 699-721.
- Velichutina, I. V., Dresios, J., Hong, J. Y., Li, C., Mankin, A., Synetos, D. and Liebman, S. W. (2000). Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18 S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* **6**, 1174–1184.
- Vicens, Q., and Westhof, E. (2003). Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of X-ray crystal structures. *Biopolymers* **70**, 42-57.
- Vila-Sanjurjo, A., Ridgeway, W. K., Seymaner, V., Zhang, W., Santoso, S., Yu, K. & Cate, J. H. (2003). X-ray crystal structures of the WT and a hyperaccurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 8682–8687.
- Volkman, N., and Hanein, D. (1999). Quantitative fitting of atomic models into observed densities derived by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **125**, 176-184.
- Weiel, J., and Hershey, J.W.B. (1981). Fluorescence polarization studies of the interaction of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor 3 with 30S ribosomal subunits. *Biochemistry* **20**, 5859-5865.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339.
- Wintermeyer, W. and Gualerzi, C. (1983). Effect of *Escherichia coli* initiation factors on the kinetics of N-AcPhe-tRNA^{Phe} binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study. *Biochemistry* **22**, 690-694.
- Wriggers, W., and Birmanns, S. (2001). Using situs for flexible and rigid-body fitting of multi resolution single-molecule data. *J. Struct. Biol.* **133**, 193-202.
- Yarus, M., and Smith, D. (1995). tRNA on the ribosome: a waggle theory. In tRNA: Structure, Biosynthesis and Function (Sołł, D. & RajBhandary, U., eds), pp. 443–468, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001). Crystal structure procedure of the ribosome at 5,5 Å resolution. *Science* **292**, 883–896.
- Zavialov, A., and Ehrenberg, M. (2003) Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors. *Cell* **114**, 113-122.

Lisa



Joonis 1. *E. coli* 16S rRNA sekundaarstruktuur (Comparative RNA Web Site; <http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Struktuuril on punasega tähistatud kõik 16S rRNA subühikute vahelisi sildu moodustavad positsioonid. Sillad on tähistatud B2a-B7b ja 16S rRNA heeliksid h14-h27.