

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Linda-Marie Kimmel

***Escherichia coli* 16S rRNA 3' otsa tuvastamine S1 nukleaasiga**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Juhendaja: PhD Niilo Kaldalu

TARTU

2019

***Escherichia coli* 16S rRNA 3' otsa tuvastamine S1 nukleasiga**

Persistorid on uinuvolekus bakterid, mida antibiootikumid ei tapa ning need takistavad krooniliste bakterinakkuste ravi. Persistorid on paljuski sõltuvad toksiin-antitoksiin (TA) süsteemidest. Selleks, et paremini mõista TA süsteemide rolli persistorite tekkes, kasutatakse antud töös *Escherichia coli*-t mudelorganismina, et uurida MazE-MazF TA süsteemi toksiini MazF mõju ribosomaalse RNA lõikamisele, tuvastada MazF 16S rRNA lõikesaidid S1 nukleasiga märkimise meetodil ning arutleda MazF olulisuses stressiribosoomide tekkes.

Märksõnad: *Escherichia coli*, toksiin-antitoksiin süsteemid, MazF, 16S rRNA, S1 nukleas

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Persistors are dormant bacterias tolerant to antibiotics which helps them to cause chronic infections. Persistors largely depend on the action of toxin/antitoxin (TA) modules. To better understand TA role in persistor formation *Escherichia coli* was used as a model to study MazF toxin impact on cleavage of ribosomal RNA, to identify MazF 16S rRNA cleavage sites using the S1 nuclease mapping method and to discuss the importance of MazF in stressribosomes.

Keywords: *Escherichia coli*, toxin/antitoxin systems, MazF, 16S rRNA, S1 nuclease

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid	8
1.1.1 Ribosoomist sõltuv RNA lõikamine.....	11
1.1.2 Ribosoomist sõltumatu RNA lõikamine.....	11
1.1.3 MazF toksiin ja selle substraadid	11
1.2 Ribosoomid ja rRNA küpsemine, modifitseerimine ja lagundamine bakterites	13
1.2.1 <i>E. coli</i> ribosoom.....	13
1.2.2 rRNA küpsemine	14
1.2.3 RNA modifitseerimine	15
1.2.4 RNA lagundamine	16
1.2.5 MazF-i RNA lõikamine ACA järjestusest.....	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	22
2.1 Töö eesmärgid.....	22
2.2 Metoodika	22
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	22
2.2.2 Söötmed	23
2.2.3 Lahused.....	24
2.2.4 RNA eraldamine	25
2.2.5 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon	26
2.2.6 DNA ja RNA geelelektroforees.....	27
2.2.7 RNA 3' otsa kaardistamine S1 nukleaasiga: katse ülesehitus	27
2.2.8 Restriktsioon.....	28

2.2.9	DNA proovi märgistamine	28
2.2.10	Magnetterade pesemine. Proovi sidumine magnetteradele ja denatureerimine .	28
2.2.11	DNA suurusmarkeri valmistamine	29
2.2.12	Hübridisatsioon.....	31
2.2.13	Töötlus S1 nukleaasiga.....	31
2.2.14	Sekveneerimisgeelil voolutamine ja tulemuste visualiseerimine	32
3	TULEMUSED JA ARUTELU	34
3.1	<i>E. coli</i> 16S rRNA 3' otsa tuvastamine S1 nukleaasiga.....	34
	KOKKUVÕTE.....	41
	SUMMARY	42
	KASUTATUD KIRJANDUS	43
	LIHTLITSENTS.....	49

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsiliin

APS – ingl k. *ammonium persulfate*

aSD – anti-Shine-Dalgarno järjestus

cDNA – komplementaarne DNA (ingl. k. *complementary DNA*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

EDTA – etüleendiaminotetraatsetaat

IF – initsiatsioonifaktor

LB - Lurian-Bertani sööde

lmRNA – liiderjärjestuseta mRNA (ingl k. *leaderless mRNA*)

PSK – post-segregatsiooniline tapmine (ingl k. *post-segregational killing*)

RBS – ribosoomi seondumissait (ingl k. *ribosome binding site*)

rpm – pööret minutis (ingl.k *revolutions per minute*)

SD – Shine-Dalgarno järjestus

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl k. *sodium dodecyl sulfate*)

SOB – ingl k. *super optimal broth*

SOC – ingl k. *super optimal broth with catabolite repression*

STM – stressi translatsiooni mehhanism (ingl k. *stress translation machinery*)

TA – toksiin-antitoksiin

TBE – Tris-boraat-EDTA puhver

TEMED – ingl k. *tetramethylethylenediamine*

TEN – Tris, EDTA, NaCl puhver

TIR – translatsiooni initsiatsiooni regioon (ingl k. *translation initiation region*)

TRIS – tris(hüdroksümetüül)aminmetaan

U – ühik (ingl k. *unit*)

UTR – mittetransleeriv järjestus (ingl k. *untranslated region*)

RACE – (ingl k. *rapid amplification of cDNA ends*)

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

SISSEJUHATUS

Persistorid on mitmete antibiootikumidele tolerantsed bakterid, mis põhjustavad kroonilisi haigusi nagu näiteks tsüstilise fibroosi haigetel esinevad kopsunakkused, tuberkuloos ning biofilmiga seotud kroonilisi haigusi nagu endokardiit, osteomüeliit, gingiviit. Ühe peristorite tekkimise eest vastutava mehhanismina on välja pakutud toksiin-antitoksiin süsteemide aktiveerumist üksikutes bakterites. Praegu on osa seda hüpoteesi toetavatest töödest osutunud ekslikuks, kuid TA võimalik seos persistoritega on tõmmanud neile mõistatuslikele süsteemidele hulga tähelepanu ja õhutanud neid lähemalt uurima. Üheks uuritumaks TA süsteemiks on MazE-MazF ning on oletatud, et see võib osaleda stressi translatsioonimehhanismi tekkes, aidates kaasa stressiribosoomide tekkele, millel puudub anti-Shine-Dalgarno järjestus ning mis on võimelised transleerima erilisi liiderjärjestuseta mRNA-sid. Katsed stressiribosoomide tekke mehhanismi kohta on seni andnud vastuolulisi tulemusi. Ühe hüpoteesi kohaselt lõikab MazF 16S rRNA-d küpses ribosoomis, eemaldades 43 nukleotiidi pikkuse järjestuse koos anti-Shine-Dalgarno järjestusega. Teise hüpoteesi kohaselt lõikab MazF 16S rRNA-d tema eellasmolekulides ja põhjustab eellasmolekulide kuhjumist, mille tagajärjel on ribosoomide küpsemine häiritud.

Käesoleva töö kirjanduse osas antakse ülevaade *Escherichia coli* ribosoomist, RNA küpsemisest, modifitseerimisest ning lagundamisest ja erinevatest TA süsteemidest. Samuti kirjeldatakse MazF/E TA süsteemi ning selle mõju ribosoomi biogeneesile ja valgusünteesile erinevatest seisukohtadest. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse meetodit, mille abil tuvastati 16S rRNA 3' ots. Arutletakse, kas selle meetodiga saaks otsustada stressiribosoomide tekke võimalikkuse üle MazF kaasabil.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid

Paljude bakterite plasmiididest või kromosoomidest võib leida väikeseid geneetilisi elemente – toksiin-antitoksiin (TA) süsteeme, mis koosnevad ühte operoni kuuluvatest ning lähestikku asetsevatest toksiini ja antitoksiini kodeerivatest geenidest (Gerdes *et al.*, 2005). Toksiini geenilt kodeeritud valk on stabiilne ning võimeline mõjutama bakteri jaoks eluliselt olulisi protsesse nagu translatsioon, replikatsioon, tsütoskeleti moodustumine, membraani terviklikkuse säilitamine ning ATP ja rakuseina biosüntees (Schuster ja Bertram, 2013). Antitoksiinid neutraliseerivad toksiini aktiivsuse normaalsetes kasvutingimustes, represserides toksiini kodeerivate TA operonide transkriptsiooni nii eraldiseisvalt kui ka toksiiniga kompleksis promootorile seondudes (Marianovsky *et al.*, 2001). Stressitingimustes antitoksiinid lagundatakse, misjärel toksiinid vallanduvad ning hakkavad inhibeerima rakulisi protsesse (Christensen *et al.*, 2003, 2001). Antitoksiinid on kergesti lagundatavad. Toksiinide edukaks pärssimiseks tuleb seetõttu antitoksiine pidevalt ekspresseerida (Yamaguchi ja Inouye, 2009). TA süsteemide lookuseid leidub mobiilsetes DNA elementides nagu plasmiidid ning profaagid (Wen *et al.*, 2017). *attC* saitidega külgnevaid TA süsteemide lookusi on leitud ka integronidest (Pandey ja Gerdes, 2005). Need asjaolud annavad alust arvata, et TA süsteemid levivad horisontaalse geeniülekanne abil (Melderer ja Bast, 2009).

TA süsteemid avastati esmakordselt *Escherichia coli* F-plasmiidist *ccd* (ingl k. *coupled cell division*) lookusest ja nende rolliks peetakse plasmiidide stabiilsuse tagamist läbi plasmiidivabade tütarakkude PSK mehhanismi (ingl k. *post-segregational killing*) (Gerdes *et al.*, 1986; Ogura ja Hiraga, 1983; Tsuchimoto *et al.*, 1988). Tütarakud, mis rakujagunemise käigus plasmidi pärivad, kasvavad normaalselt. Tütarakkudes, kus plasmiid puudub, alustavad peremeesraku ATP-sõltuvad proteaasid antitoksiini valkude kiiret lagundamist, mille tagajärjel vabanevad toksiini valgud. See viib omakorda plasmiidivabade tütarakkude selektiivse tapmiseni (Melderer ja Bast, 2009). Tänapäevaks on teada kuute tüüpi TA süsteeme, mida eristatakse nende antitoksiinide mehhanismi järgi neutraliseerida aktiivseid toksiine (Page ja Peti, 2016). Tüüp II, IV, V ja VI puhul on antitoksiini näol tegemist valguga, tüüp I ja III puhul on antitoksiiniks aga mittekodeeriv RNA. Kõik bakterites kirjeldatud toksiinid on valgud (Wen *et al.*, 2017).

Tüüp I antitoksiiniks on *antisense*-RNA, mis vähendab toksiini aktiivsust toksiini translatsiooni inhibeerides. Antitoksiin, seondudes mRNA-le, vahendab selle lõikamist RNAas III poolt või peidab ribosoomi seondumissaidi (RBS ingl k. *ribosome binding site*) (Gerdes *et al.*, 1992;

Schuster ja Bertram, 2013). Tüüp II antitoksiin seondub toksiiniga, põhjustades viimases steerilisi muutusi või blokeerides toksiini aktiivsuseks olulisi saite. Toksiini aktiveerimiseks lagundavad antitoksiine vastavad proteaasid (Yamaguchi *et al.*, 2011). Tüüp III puhul on toksiiniks endoribonukleas. Antitoksiiniks on korduvjärjestused, mis seondues valk-RNA interaktsioonide abil toksiiniga inhibeerivad nukleaasi aktiivsust (Schuster ja Bertram, 2013). Tüüp IV süsteemi toksiinid ja antitoksiinid ei interakteeru omavahel. Antitoksiinide vastandtoimelisus seisneb hoopis toksiinide sihtmärkide stabiliseerimises (Masuda *et al.*, 2012). Tüüp V hulka kuulub GhoS/GhoT süsteem. See on teadaolevalt ainus TA süsteem, mida reguleerib teine TA süsteem. Antitoksiiniks on toksiinispetsiifiline RNAas, mis soodsaates kasvutingimustes lõikab toksiini mRNA-d. Stressitingimustes aga hakkab tüüp II süsteemi toksiin MqsR lagundama antitoksiini GhoS mRNA-d ning selle tagajärjel saab alata toksiini GhoT translatsioon (Wang *et al.*, 2013). Tüüp VI süsteemi toksiini toimemehhanismiks on replikatsiooni elongatsiooni blokeerimine läbi seondumise DNA III polümeraasi β libisemisklabrile DnaN. Toksiin takistab replikatsiooniks vajalike klambriga seonduvate valkude seondumist ning replikatsioonikahvel kukub kokku. Antitoksiiniks on proteolüütiline adapter, mis vahendab ja soodustab toksiini lagundamist proteaasi poolt (Aakre *et al.*, 2013).

TA lookusi leidub vabalt elavates prokariootides rohkelt, kuid sellistes organismides, mis suudavad elada ja paljuneda ainult peremehe rakkudes, on neid vähe. TA süsteeme võib leida näiteks arhedest, Gram-positiivsetest bakteritest nagu *Mycobacterium tuberculosis* ning Gram-negatiivsetest bakteritest nagu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae* ja *P. putida* ning *Salmonella typhimurium* (Lewis, 2010; Pandey ja Gerdes, 2005). Samuti on TA süsteeme leitud pärmist ning seentest (Satwika *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2011). TA lookusi võib ühes organismis olla palju. Näiteks TA süsteemide uurimise mudelorganism *E. coli* K-12 MG1655 kodeerib vähemalt 19 erinevat tüüpi I TA lookusi ning 13 erinevat perekonda tüüp II TA lookust (Harms *et al.*, 2018). Siiani pole leitud selget seost TA repertuaari ja organismi bioloogia vahel. Küll on aga täheldatud, et TA lookuste arv on kõrgem aeglaselt kasvavates bakterites ning organismides, mis peavad kohanema vaenulike keskkonnatingimustega (Leplae *et al.*, 2011; Pandey ja Gerdes, 2005).

Kui plasmiidis esinevate TA lookuste funktsioon on teada, siis kromosoomis leiduvate TA süsteemide funktsioon on siiani ebaselge (Melderer ja Bast, 2009). Seni on välja pakutud mitmeid protsesse, milles TA süsteemid võiksid osaleda. Näiteks stressivastus, nälja poolt indutseeritud bakteriostaas, programmeeritud raku surm (ingl k. *programmed cell death*), biofilmi moodustamine ning hulgatunnetus (ingl k. *quorum sensing*) (Christensen *et al.*, 2003, 2001; Engelberg-Kulka *et al.*, 2006; Kolodkin-Gal *et al.*, 2007; Sat *et al.*, 2001; Wang ja Wood,

2011). Üheks TA süsteemide bioloogiliseks funktsiooniks, mida on püütud eksperimentaalselt kinnitada kui ka vaidlustada, on persistorite moodustamine (Harms *et al.*, 2018). Persistorid moodustavad väikese alampopulatsiooni mitte-jagunevaid või aeglaselt kasvavaid rakke, mis on geneetiliselt identsed paljunevate bakteritega, kuid sisenevad kasvu võimaldavates tingimustes spontaanselt uinuvasse ning mitte-jagunevasse olekusse. Tolerantsuse tõttu põhjustavad persistorid kroonilisi bakteriaalseid haiguseid nagu näiteks tsüstilise fibroosi haigetel esinevad kopsunakkused, tuberkuloos ning biofilmiga seotud kroonilisi haigusi nagu endokardiit, osteomüeliit, gingiviit. (Conlon *et al.*, 2013; Fasani ja Savageau, 2013; Fauvart *et al.*, 2011). Persistentsus pole päritav geneetiline omadus (Balaban *et al.*, 2004). Persistorirakud on äärmiselt tolerantsed mitmetele antibiootikumidele (ingl k. *multi-drug tolerance*). Oletati, et seda võib põhjustada TA toksiinide inhibeeriv toime, mis vähendab bakteri metaboolset aktiivsust ning pidurdab olulisi rakuprotsesse, mille tulemusena muutuvad rakus leiduvad antibiootikumide sihtmärgid inaktiivseks (Keren *et al.*, 2004; Lewis, 2010). Seetõttu arvati, et TA süsteemide uurimises võib peituda lahendus uute antibakteriaalsete ravimite loomises ning krooniliste haigustega võitlemises (Williams ja Hergenrother, 2012).

Kõige rohkem on peristorite moodustamisega seoses uuritud tüüp II TA süsteeme, kuid erinevate katsete tulemused on olnud vastuolulised. Tõendeid tüüp II TA süsteemide osalemistest persistorite tekkes on kogutud erinevate bakterite kohta nagu *Burkholderia*, *E. coli* ning *Salmonella*. (Helaine *et al.*, 2014; Norton ja Mulvey, 2012; Van Acker *et al.*, 2014). On näidatud, et tüüp II TA süsteemi toksiinide RelE ja MazF üleekspressiooni korral suureneb *E. coli* populatsioonis persistentsete rakkude arv (Keren *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2014; Vázquez-Laslop *et al.*, 2006). Samas on näidatud, et persistorite arvu suurendab ka muude kasvu aeglustavate valkude üleekspressioon ja seetõttu ei saa toksiinide üleekspressiooni kasutades tõestada nende osalemist persistorite tekkel (Vázquez-Laslop *et al.*, 2006). Lisaks on näidatud, et kümne tüüp II TA süsteemi deletsioon ei mõjuta *Escherichia coli* persistentsuse teket (Goormaghtigh *et al.*, 2018; Harms *et al.*, 2018).

Tüüp II TA süsteemide geneetiline organisatsioon on üpriski konserveerunud. TA lookused moodustavad operone, kus antitoksiini geen asub enamasti toksiooni geeni ees (Pandey ja Gerdes, 2005). Mitmed antitoksiinid koosnevad kahest domeenist – N-terminaalsest DNA-ga seonduvast ja C-terminaalsest toksiiniga seonduvast domeenist (Leplae *et al.*, 2011). Toksiinid on stabiilsed, kuid antitoksiine lagundavad pidevalt proteaasid nagu näiteks ClpAP ja Lon (Aizenman *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 2001). Tüüp II TA süsteemide alla kuuluvad näiteks MazE-MazF, RelE-RelB, YefM-YoeB, ning MqsR-MqsA süsteemid (Brown *et al.*, 2009; Kamada ja Hanaoka, 2005; Leplae *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2003). Kui toksiinid pole

seondunud antitoksiin-toksiin kompleksi, ründavad nad olulisi rakuprotsesse. Paljud toksiidid on translatsiooni inhibiitorid ning on tuvastatud erinevaid viise, kuidas nad mõjutavad valkude biosünteesi. Paljud toksiididest käituvad kui mRNA interferaasid, lõigates mRNA-d kas ribosoomist sõltuvalt või sõltumatul viisil (Jørgensen *et al.*, 2009; Yamaguchi ja Inouye, 2009).

1.1.1 Ribosoomist sõltuv RNA lõikamine

Ribosoomist sõltuvatel toksiididel ei ole ilma ribosoomideta endonukleaaseta aktiivust ja seetõttu lõikavad nad ainult sellist mRNA-d, mis on seotud ribosomaalsetesse kompleksidesse (Pedersen *et al.*, 2003). Tänapäeval teatakse 6 erinevat TA süsteemi kuuluvat ribosoomist sõltuvat mRNA interferaasi perekonda – RelE, YoeB, YafO, YafQ, HigB ning YhaV (Choi *et al.*, 2017).

1.1.2 Ribosoomist sõltumatu RNA lõikamine

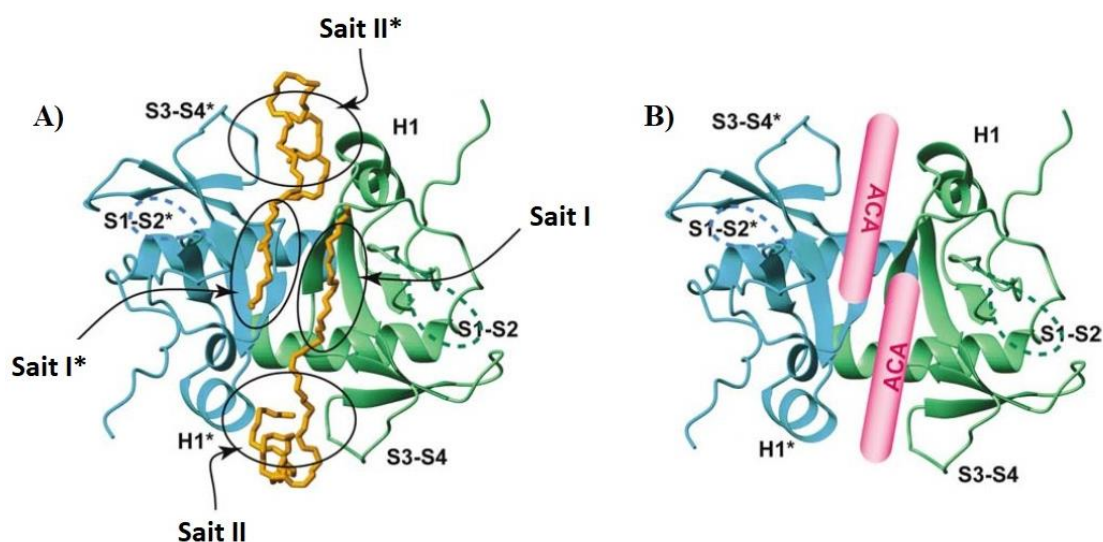
Ribosoomist sõltumatud toksiidid on aktiivsed endoribonukleaasid ning erinevalt ribosoomidest sõltuvatest toksiididest lõikavad nad oma substraate edukalt ilma ribosoomide abita. Nende hulka kuuluvad endonukleaasid HicA, SymE, VapC ja MazF perekondadest (Jørgensen *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). VapC ja MazF toksiidid on võimelised lõikama erinevaid mRNA, rRNA ning tRNA-sid, kuid enamiku toksiidide täpseid sihtmärke pole seni selgelt määratletud ning mehhanismid, millega toksiidid raku kasvu blokeerivad, on siiani jäänud ebaselgeks (Culviner ja Laub, 2018).

1.1.3 MazF toksiin ja selle substraadid

Üheks kõige enam uuritud *E. coli* TA süsteemiks on MazE-MazF. MazF on stabiilne toksiin, mille toime neutraliseerib kompleksi moodustamine antitoksiiniga MazE. Stressitingimustes hakkab ATP-st sõltuv seriinproteas ClpAP antitoksiini lagundama. MazE lagundamist soodustavad stressitingimused on märkimisväärne ppGpp (ingl k. *guanosine tetraphosphate*) hulga tõus rakus aminohappe nälja tagajärjel ning töötlus antibiootikumidega, mis mõjutavad translatsiooni ning transkriptsiooni aktiivsust (Aizenman *et al.*, 1996; Hazan *et al.*, 2004). MazE hulga langemisel rakus suureneb vaba MazF hulk. MazF on võimeline inhibeerima translatsiooni ning mõnede autorite väitel põhjustama ka raku surma (Kolodkin-Gal *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003).

MazF toksiooni monomeer moodustab üksiku globulaarse domeeni mõõtmetega 40 x 40 x 20 Å. Domeen koosneb seitsme keeruga antiparalleelsest β -lehest ja kolmest α -heeliksist. Kui kaks MazF monomeeri omavahel seonduvad, moodustuvad nende vahele positiivse laenguga sümmeetrilised vaod, kuhu saab spetsiifilise järjestusega MazF substraat seonduda. Kahe MazF

monomeeri vaheline interaktsioon toimub hüdrofoobsete sidemete abil (Kamada *et al.*, 2003). MazF monomeeride vahelistesse vagudesse võib samuti seonduda antitoksiin MazE. MazE liitumine MazF-ga ei põhjusta toksiini struktuuris suuri muudatusi, kuid katab ära MazF aktiivsenti ning blokeerib endoribonukleaasest aktiivsust (Li *et al.*, 2006). MazE homodimeer moodustab põimunud β silindri dimensiooniga 20 x 30 x 25 Å, millel on kaks väljaulatuvat negatiivselt laetud C-terminuse segmenti, mis interakteeruvad MazF homodimeeriga (Kamada *et al.*, 2003). MazE seandumissaitideks MazF vagudes on S1 ja S2 ligu vahel asuv nõgusa pinnaga konserveerunud β -ahel (sait I) ning hüdrofoobsete omadustega H1 heeliks ühelt MazF monomeerilt ja S3-S4 ligu teiselt monomeerilt (sait II). MazE C-terminused võivad paremaks MazF-ga seandumiseks mimikeerida üheaheelalise RNA struktuuri (Zhang *et al.*, 2003). (Joonis 1)



Joonis 1. MazF homodimeeri substraadi seandumissaidid vaadelduna MazF kristallstruktuuris.

A) kahe MazE peptiidi seandumine MazF vagudesse B) kahe substraadi seandumine MazF vagudesse. Sinised ja rohelised on MazF subühikud, kollane on MazE selgroog ning ssRNA mudel on roosa. MazE seandumissaidid I ja II MazF homodimeeril on ümber joonitud. S1-S2 ja S3-S4 ligu märgitud punktiraadega (Li *et al.*, 2006).

E. coli MazF toksiin on kõrgelt spetsiifiline üheaheelalise RNA suhtes ning lõikab mRNA-d ja rRNA-d ACA järjestusest A ja C jääkide vahelt. Sekundaarstruktuurid kaitsevad RNA-d MazF lõikamise eest, sest need ei mahu eelpool nimetatud MazF homodimeeri vagudesse, kus substraadi lõikamine aset leiab (Zorzini *et al.*, 2016).

MazF lõikab ACA järjestuse 5' otsast fosfodietersidet, jättes ühte 5'otsa 2', 3'-tsükilise fosfaadi ja 3' otsa vaba 5'-OH rühma (Vesper *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005, 2003). Kuigi

ACA järjestus on lõikamise jaoks vajalik, ei lõigata kõiki ACA saite ühesuguse aktiivsusega. Üha enam ollakse veendunud, et trinukleotiidne motiiv pole ära tundmiseks piisav ning tegelikkuses läheb lõikesaidi äratundmiseks ning efektiivseks lõikamiseks tarvis 7 nukleotiidi pikkust järjestust. ACA asub äratuntava motiivi keskel ning seda ümbritsevad nukleotiidid on olulised lõikamise efektiivsuse määramisel (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2019; Zorzini *et al.*, 2016).

Lisaks *E. coli*-le leidub MazF homolooge sellistes bakterites nagu *Staphylococcus aureus* (MazF-sa) ning *Bacillus subtilis* (MazF-bs), mis lõikavad mRNA-d UACAU järjestusest (Park *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009). Hiljuti tuvastati MazF homoloog halofiilist *Haloquadratum walsbyi* (MazF-hw), mis lõikab mRNA-d UUACUCA järjestusest (Yamaguchi *et al.*, 2012). Erinevalt enamikest prokarüootidest, kes sisaldavad kahte MazF süsteemi, sisaldab *Mycobacterium tuberculosis* neid üheksa. Maz-mt6 on võimeline lõikama 23S rRNA-d ribosomaalsest A saidist ning läbi selle mehhanismi inhibeerima translatsiooni. MazF-mt3 lõikab aSD järjestust 16S rRNA paardumata 3'otsast (Schifano *et al.*, 2013). MazF-mt9 sihtmärgiks pole ei mRNA ega rRNA, vaid hoopis tRNA sihtmärkjärjestusega (antikoodoniga) UUU (Chen *et al.*, 2017; Schifano *et al.*, 2016). Seega võib öelda, et MazF homoloogide arv prokarüootide hulgas on kõrge ning nende substraadid võivad olla erinevad.

1.2 Ribosoomid ja rRNA küpsemine, modifitseerimine ja lagundamine bakterites

1.2.1 *E. coli* ribosoom

Ribosoomid on suured ribonukleoproteiini kompleksid, mis vastutavad rakus valkude tootmise eest. Nende matriitsiks on mRNA, substraadiks aminoatsüül-tRNA ning produktiks valgud. *E. coli* ribosoom 70S koosneb kahest alaühikust 30S ja 50S. Väiksem alaühik koosneb 16S rRNA-st ja 21 ribosomaalsest valgust ning suurem alaühik koosneb 23S ja 5S rRNA-st ning 33 valgust (Noller ja Nomura, 1996). Alaühikutel on translatsioonis erinev roll. Suurem alaühik vastutab näiteks peptiidsideme tekke eest ning väiksema alaühiku ülesandeks on translatsiooni käivitamisel kindlustada ribosoomi interaktsioonid mRNA-ga ning dekodeerida geneetilist informatsiooni (Moore ja Steitz, 2003; Schlutzen *et al.*, 2000).

Valkude translatsioon saab alguse 70S ribosoomi eraldumisest 30S ja 50S alaühikuteks. Seejärel hakkavad moodustuma translatsiooni initsiatsioonikompleksid, mille osadeks on ribosoom, initsiaator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}), mRNA ja kolm initsiatsioonifaktorit IF1, IF2 ja IF3. Shine-Dalgarno ja aSD järjestuste vaheline interaktsioon on oluline mRNA seondumiseks ribosoomi väikese alaühikuga. SD-aSD interaktsiooni tagajärjel kohandatakse initsiatsioonikoodon ribosoomi P-saiti, kus see interakteerub IF2 juuresolekul initsiaator-

tRNA-ga ning moodustub 30S initsiatsioonikompleks. Viimase sammuna liitub 50S alaühik 30S initsiatsioonikompleksiga, moodustades 70S initsiatsioonikompleksi ning olles nüüd valmis üleminekuks elongatsiooni faasi. Liiderjärjestuseta mRNA seondumine ribosoomile on kanoonilise mRNA seondumisest mõnevõrra erinev. ImRNA seondumine on sõltuv initsiaator-tRNAst, mis tagab täpse mRNA translatsiooni initsiatsiooni TIR (ingl k. *translation initiation region*) saidist. Seondumine toimub eelistatult 70S ribosoomiga ning initsiatsioonile järgneb elongatsiooni faas isegi initsiatsioonifaktorite puudumisel (Pon *et al.*, 2000; Udagawa *et al.*, 2004; Yusupova *et al.*, 2006).

1.2.2 rRNA küpsemine

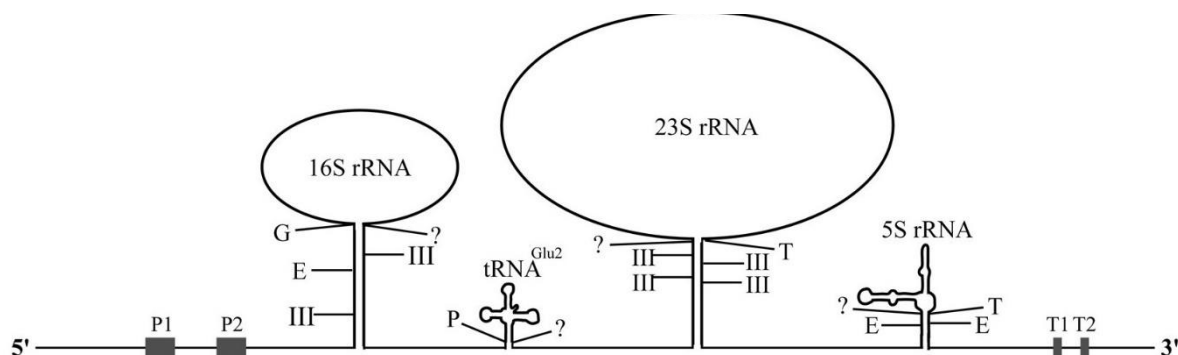
Ribosoomi alaühikute küpsemine ning kokkupanek on keeruline protsess, mis sisaldab mitmeid etappe. Bakteri ribosoomi biogenees algab 16S, 5S ja 23S rRNA transkriptsioonist. Neid rRNA-sid transkribeeritakse algselt kui ühte molekuli. *E. coli* rRNA transkribeerimine toimub seitsmelt operonilt. Operonid on konserveerunud, oma organisatsioonilt omavahel väga sarnased ning nende struktuursete geenide järjestused peaaegu identsed (Hillebrand *et al.*, 2005). Sõltuvalt rRNA operonist võib transkripti osaks olla ka üks või mitu tRNA-d, mis asetsevad 16S ja 23S järjestuste vahel ning allavoolu 5S RNA-st. RNAas III lõikab transkripti 16S ja 23S järjestuste vahelt, vabastades nii 16S, 23S ja tRNA eellased. 5S ja temast allavoolu asetsevate tRNA prekursorite vabastamine toimub tänu RNAasE lõikamisele (Deutscher, 2006). (Joonis 2)

Transkriptide küpsemine algab enne transkriptsiooni lõppu sekundaarstruktuuride moodustumisega ning seondumissaitide vabanedes ribosomaalsete valkudega liitudes. Samaaegselt toimub ka rRNA keemiline modifitseerimine ning protsessimine RNAaside abil (Williamson, 2003).

16S rRNA geenid asuvad operoni 5' poolses otsas ning neile järgnevad 23S rRNA geenid. 5S rRNA geenid asuvad 3' poolses operoni otsas. 16S rRNA puhul lõikab rRNA transkripti kõigepealt RNAas III ning tekib 17S prekursor. Prekursorid on pikemad kui rRNA küpses ribosoomis, sisaldades 115 nukleotiidi 5' otsas ning 33 nukleotiidi 3' otsas (Young ja Steitz, 1978). Need üleliigsed nukleotiidid tuleb eemaldada, et valmiks küps 16S rRNA. 5' otsa protsessimises osalevad RNAas E, mis lõikab otsast 66 nukleotiidi pikkuse järjestuse ning RNAas G, mis lõikab rRNA-d vahetult 5' otsast (Li *et al.*, 1999). 3' otsa protsessimine on aga siiani selgusetu, kuid arvatakse, et selles võivad osaleda sellised ensüümid nagu RNAas R, RNAas II, PNPaas ja RNAas PH (Deutscher, 2009; Smith *et al.*, 2018). (Joonis 2)

Peale ribosomaalsete RNA-de on translatsioonis võtmeroll tRNA-del, mis lisaks translatsioonile osalevad teisteski rakuprotsessides (Raina ja Ibba, 2014). Toitainete vähesusest tekkinud stressi korral osalevad tRNA-d *E. coli* poomisvastuse käivitamises, mille käigus aminoatsetüleerimata tRNA liigub ribosoomi A-saiti, mõjutades seeläbi geeniekspressiooni. (Li ja Zhou, 2009).

Nagu teisigi transkripte, toodetakse tRNA-sid alguses täiendavate külgnevate järjestustega prekursoritena (pre-tRNA), mis peavad läbima kogu komplekti erinevaid post-transkriptsioonilisi küpsemisetappe. Need etapid sisaldavad 5' liider- ning 3' treilerjärjestuse eemaldamist, teatud nukleosiidide positsioonide modifitseerimist, intronite splaissimist ning CCA järjestuse lisamist 3' otsa enne kui tRNA-d translatsioonis kasutada saab. Lisaks paljudele teistele ensüümidele protsessib 5' otsa RNAas P ning 3' otsa RNAas Z (Li ja Deutscher, 1996; Phizicky ja Hopper, 2010; Wellner *et al.*, 2018). Küpsel tRNA-l on kaks funktsionaalset otsa – CCA poolsesse otsa liidetakse aminohape ning antikoodonling sisaldab antikoodoni järjestust, mis tunneb ära mRNA koodonjärjestuse (Sergiev *et al.*, 2018). Selleks, et initsiaator-tRNA saaks initseerida valgusünteesi, laetakse see kõigepealt metioniniiga ning siis formuleeritakse metioniül-tRNA-transformulaasi poolt (Laursen *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2018).



Joonis 2. rRNA küpsemine. Joonisel on kujutatud ühte *E. coli* seitsmest operonist (*rrmB*). Märgitud on 16S, 23S ja 5S rRNA, tRNA ning nende küpsemises osalevad peamised RNAasid: RNAas III (III), RNAas G (G), RNAas E (E), RNAas P (P), RNAas T (T) ning tundmatud RNAasid (?). *rrn* operonid sisaldavad kahte promootorit P1 ja P2 ning terminaatorit T1 ja T2. (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007)

1.2.3 RNA modifitseerimine

rRNA biosünteesi käigus moodustuvad pre-RNA-s ka modifitseeritud nukleotiidid. 95 % *E. coli* rRNA modifikatsioonidest esinevad just funktsionaalselt olulistes regioonides. Nukleotiidide modifikatsioone esineb kolme põhitüüpi – uridiini konversioon pseudouridiiniks (Ψ), 2'hüdoksüüli metülatsioon ning nukleotiidide lämmastikaluste metülatsioon erinevates

positsioonides (Decatur ja Fournier, 2002). Suurem osa metüleeritud rRNA nukleotiididest modifitseeritakse kas alaühiku assambleerimise viimastel sammudel või juba küpsetes alaühikutes. Suure alaühiku modifikatsioonid toimuvad seevastu alaühiku kokkupanemise varajases staadiumis. Metülatsioonid viivad läbi metüültransferaasid (Sergiev *et al.*, 2018). Modifikatsioonide nagu metülatsioonide olemasolu blokeerib või aeglustab pöördtranskriptaasi tööd (Potapov *et al.*, 2018).

1.2.4 RNA lagundamine

Lagundamise seisukohast saab RNA-d jaotada mRNA-ks ja stabiilseks RNA-ks (rRNA ja tRNA). mRNA vahendab geneetilist informatsiooni DNA-lt valkudele ning on lühikese eluaega. See võimaldab täiendavalt kontrollida geeniekspressiooni ning rakkudel ümbritseva keskkonnaga kiiremini kohaneda. mRNA lagundamine on kiire ning pidevalt toimuv rakumetabolismi protsess, mis algab enamasti RNAasE seondumisest monofosfaadi jääke sisaldavale mRNA 5' otsale ning lõikamine toimub sekundaarse struktuuriga AU-rikastes piirkondades (Deutscher, 2006; Jain, 2002). mRNA lagundamises osalevad piiratud määral ka teised endoribonukleaasid nagu RNAasG, RNAas III ning RNAasP. Teatud tingimustel võivad mRNA lagundamist algatada ka bakteriaalsed toksiinid nagu RelE, MazF ja Kid (Li ja Deutscher, 2004). Algne lõikamine inaktiveerib translatsiooni ning edasiste lõikamisega lagundatakse mRNA fragmentideks. Fragmentideks lõikamise eest vastutavad *E. coli*-s kolm suurt 3'-5' eksoribonukleaasi – PNPaa, RNAas II ja RNAas R. Need 3 eksoribonukleaasi ei suuda lõigata fragmente, mis on väiksemad kui 10 nukleotiidi ja seetõttu viivad mRNA lagundamise lõpuni oligoribonukleaasid, mis lagundavad oligonukleotiidid mononukleotiidideks. Pärast töötlust kinaasidega saab neid mononukleotiide prekursoritena mRNA sünteesis taaskasutada.

Vastupidiselt pidevale mRNA lagundamisele toimub stabiilse RNA lagundamine ainult näljatingimustes, aeglustes kasvutingimustes, statsionaarses faasis või kvaliteedikontrolli tagajärjel kui leitakse defektne RNA molekul (Deutscher, 2003). Ühiseks jooneks aga mRNA ja stabiilse RNA vahel on lagundamisprotsessis kasutatavad RNAasid – PNPaa, RNAas II ja RNAas R. On leitud, et need ensüümid vajavad seondumiseks polü-(A) saba (Cheng ja Deutscher, 2005). Stabiilne RNA moodustab 98 % totaalsest rakulisest RNAs-t ning seega esindab potentsiaalselt suurt toitainete varu, mida saaks nälja korral kasutada. Stabiilset RNA-d lagundatakse harva ka vastuseks erinevatele teguritele, mis mõjutavad membraani permeaablust ning vähendavad kahevalentsete ionide hulka nagu Mg^{2+} . Kahevalentsete ionide taseme languse tagajärjel muutub ribosoomi aktiivseks periplasmas asuv

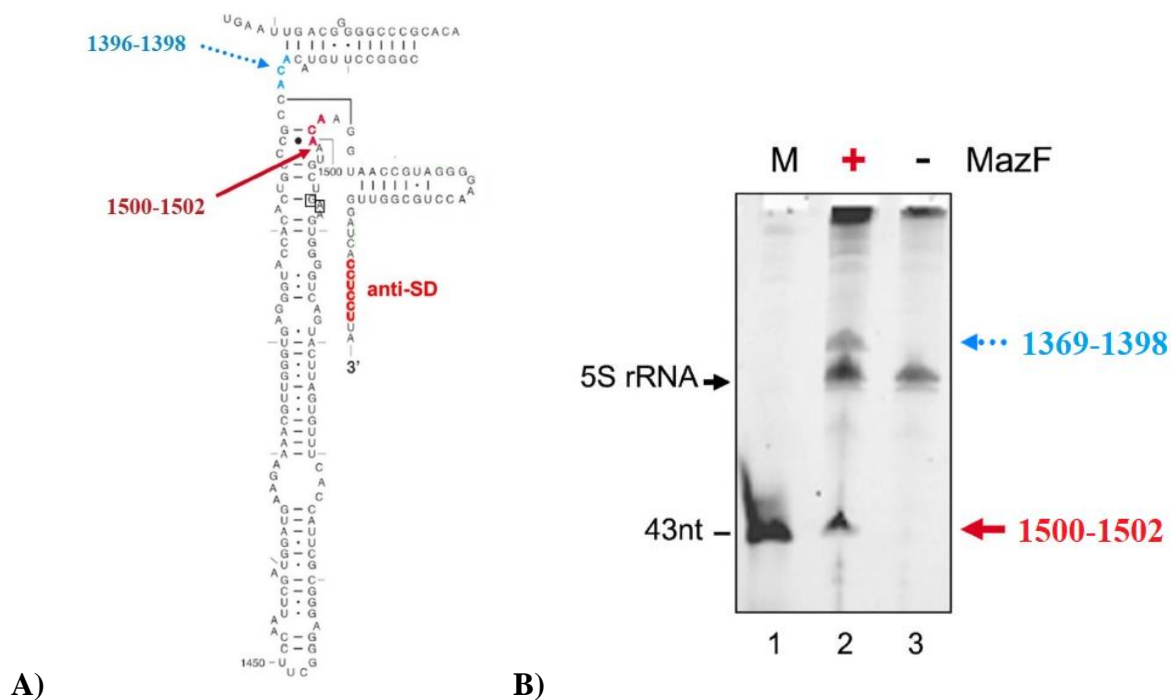
mittespetsiifiline endoribonukleas RNAas I, mis membraani permeaabluse suurenedes võib pääseda raku tsütoplasmasse (Deutscher, 2006).

1.2.5 MazF-i RNA lõikamine ACA järjestusest

MazF inhibeerib translatsiooni läbi RNA lõikamise, kuid MazF-i täpne mõju valkude sünteesile ei ole veel päris selge ning katsed on andnud vastuolulisi tulemusi. Ühed autorid väidavad, et *E. coli*-s toimub MazF-i poolt loodud lmRNA-de selektiivne translatsioon spetsialiseerunud stressiribosoomide abil ning teised arvavad, et MazF ei genereeri stressiribosoomi, vaid hoopis lõikab katki rRNA eellasi, takistades seega uute ribosoomide moodustumist ning seeläbi valgusünteesi (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2019; Vesper *et al.*, 2011).

Amitai jt kasutasid valkude biosünteesi ning lagunemise jälgimiseks ³⁵S-metioniiniga märgistamist ning täheldasid, et MazF inhibeerib stressitingimustes ligikaudu 90% valkude sünteesi, kuid samaaegselt võimaldab mõningate ellujäämist soosivate valkude sünteesi (Amitai *et al.*, 2009). Teiste andmete kohaselt pole leitud sellist eriliste valkude gruppi, mille süntees oleks MazF-i ekspresseerivas rakukultuuris eelistatud. Küll on aga nähtud, et MazF inhibeerib stressitingimustel valgusünteesi täielikult, mitte selektiivselt (Mets *et al.*, 2019).

Selektiivse valgusünteesi võimalikkust põhjendatakse molekulaarse mehhanismi mudeli abil, mis põhineb MazF-i tekitatud spetsiaalsetel mRNA-del ja neid transleerivateel stressiribosoomidel. Stressitingimustes on täheldatud, et MazF lõikab mRNA-d ülesvoolu startkoodoni AUG lähedalt, eemaldades 5'UTR-i (ingl k. *untranslated region*) koos Shine-Dalgarno (SD) järjestusega, luues nii suurel hulgal liiderjärjestusega mRNA-sid (lmRNA). lmRNA-sid transleerivad omakorda stressiribosoomid, mis on tekkinud MazF toksiini 16S rRNA lõikamise tagajärjel. Selle kohaselt lõikab MazF küpse ribosoomi 16S rRNA-d ACA lõikesaidist positsioonil 1500-1502, eemaldades 16S rRNA 3'terminuse otsast 43 nukleotiidi pikkuse järjestuse, mis sisaldab heeliks 45 ja aSD piirkonda (Vesper *et al.*, 2011). (Joonis 3)



Joonis 3. MazF poolt 43 nukleotiidi pikkuse fragmendi lõikamine *E. coli* 16S rRNA 3'otsast A) *E. coli* 16S rRNA 44 ja 45 heeliksi sekundaarstruktuur, kuhu on märgitud MazF potentsiaalsed lõikesaidid 1369-1398 ja 1500-1502 ning aSD järjestus. 43 nt pikkune fragment, mille MazF peaks stressitingimustes küpse ribosoomi 16S rRNA-st eemaldama jääb 1500-1502 lõikesaidist 3' otsa poole. B) 70S ribosoomide töötlemisel MazF toksiiniga *in vitro* tagajärjel toimus lõikamine 16S rRNA 1369-1398 ja 1500-1502 saitidest. 16S rRNA 3'ots oli märgistatud pC-Cy3 fluorestsentsmärgisega. Denatureerival geelil visualiseeriti 16S rRNA fragmendid, mis saadi 70S ribosoomide inkubeerimisel MazF toksiini juuresolekul (rada 2) ning MazF toksiini puudumisel (rada 3). Suurusmarkerina kasutati *in vitro* sünteesitud Cy3 märkega 43 nukleotiidi pikkust fragmenti (rada 1). Sinine ja punane nool tähistavad pildil A kujutatud lõikesaite, must nool tähistab 5S rRNA asukohta (Vesper *et al.*, 2011).

Just see katse tundub tundub tõestavat, et stressiribosoomid on kindlasti olemas ja MazF lõikab 16S rRNA-d küpsetes ribosoomides. Paraku on näidatud, et 70S ribosoomide hulgas on alati ka osa ribosoomide, mis pole küpsed, aga on siiski 70S fraktsioonis. Polüsoomides toimuv rRNA-de protsessimine ei ole kohustuslik 70S ribosoomide küpsemiseks ning seetõttu võivad küpse ribosoomi fraktsioonid sisaldada protsessimata rRNA-d (Dahlberg *et al.*, 1978; Mets *et al.*, 2017; Sirdeshmukh ja Schlessinger, 1985; Srivastava ja Schlessinger, 1988). On võimalik, et nende protsessimata rRNA-de 3' otsa märkimine *in vitro* on efektiivsem kui küpsetel ribosoomidel ning see tuvastatud 43 nt pikkune fragment võibki tuleneda protsessimata rRNA-dest (Mets *et al.*, 2017).

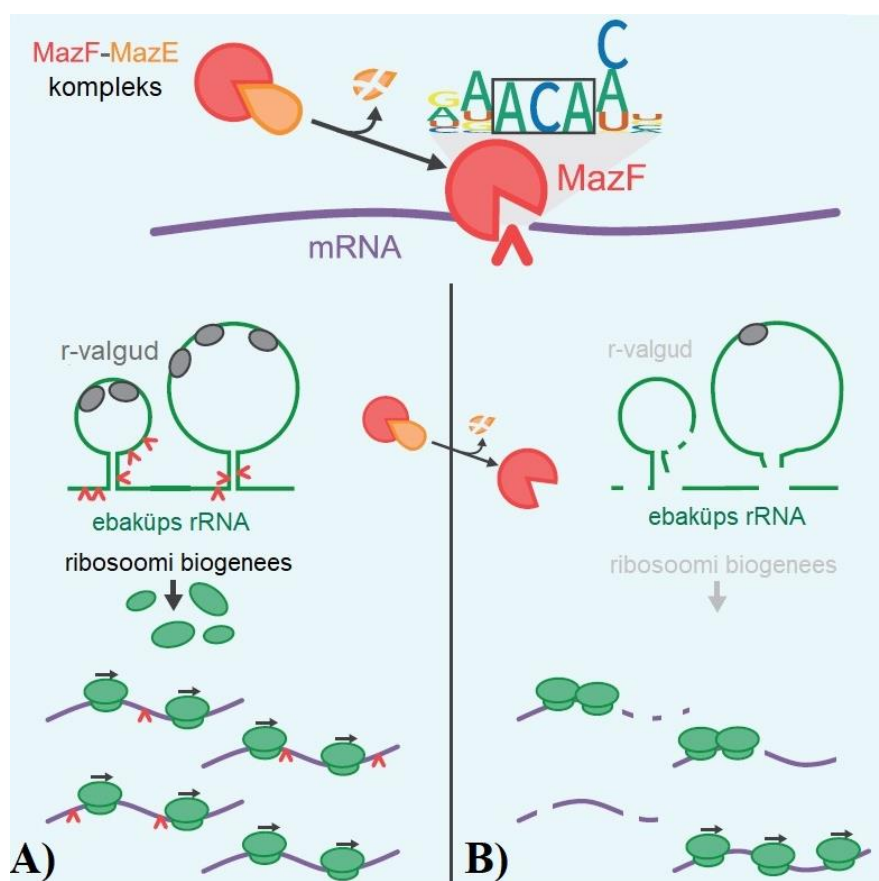
Arvatakse, et läbi MazF lõikamise genereeritakse 70^{Δ43} stressiribosoomid, mis ei ole aSD-SD interaktsiooni puudumise tõttu võimelised algatama translatsiooni kanoonilistelt pikki ja

struktureeritud 5' UTR järjestusi sisaldavatelt mRNA-delt, kuid on võimelised selektiivselt transleerima MazF-i loodud lmrRNA-sid, moodustades nii seni kirjeldamata stressi translatsiooni mehhanismi (STM, ingl k. *stress translation machinery*) (Evfratov *et al.*, 2017; Vesper *et al.*, 2011).

Selleks, et eelpool kirjeldatud stressimehhanism toimiks, peaks MazF poolt lõigatud lmrRNA-de transleerimine toimuma bakterirakus eelistatult teistele mRNA-dele (Moll ja Engelberg-Kulka, 2012). Liiderjärjestuseta RNA-sid on võimalik transleerida ainult juhul kui neid pole kodeerivast järjestusest lõigatud (Culviner ja Laub, 2018; Vesper *et al.*, 2011). Ent 96% *E. coli* kodeeriv järjestus sisaldab vähemalt ühte MazF äratundmissaiti (Venturelli *et al.*, 2017). Väidetavalt kaitseb lmrRNA-sid lõikamise eest ACA saidi lugemisraamist välja jäämine, sest stressitingimustes seondub MazF stressiribosoomile ning on võimeline lõikama ainult neid mRNA-sid, mille ACA saidid asuvad stressiribosoomi lugemisraamis (Oron-Gottesman *et al.*, 2016). Samas on näidatud, et MazF lõikab hoolimata lugemisraamist enamikke liiderjärjestuseta transkripte kodeerimisjärjestustest ning seetõttu pole nende transleerimine valkudeks tõenäoline. Lisaks on ribosoomide profileerimise abil näidatud, et ka kodeerimisjärjestusest lõikamata lmrRNA-sid ei transleerita teistest mRNA-dest eelistatult (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2019). (Joonis 4) Samuti puuduvad tõendid selle kohta, et MazF ribosoomidega seonduks.

Juhul kui lmrRNA-de selektiivne translatsioon oleks võimalik, viiksid seda läbi eelpool mainitud stressiribosoomid. Erinevaid meetodeid kasutades on püütud hinnata, kui suure osa raku ribosoomidest need võiksid moodustada ja on saadud väga erinevaid tulemusi. Vastavalt stressiribosoomide mudelile tekivad stressiribosoomid MazF abil küpsetest ribosoomidest 16S rRNA lõikamise tagajärjel kui eemaldatakse 43 nukleotiidne järjestus 16S rRNA 3' otsast. Vesper jt hindasid stressiribosoomide teket mõõtes 43 nt fragmendi tekkimist ja leidsid, et pärast 30 minutit MazF-i induktsiooni aminohappenälja tingimustes oli stressiribosoomide 51% (Vesper *et al.*, 2011). Sauert jt võrdlesid 70S^{A43} ribosoomide tekke tuvastamiseks MazF poolt lõigatud ning lõikamata 16S rRNA hulka kasutades pöördtranskriptsiooni erinevate praimeritega ning väitsid, et 15 minutit pärast MazF induktsiooni protsessitakse rakus 65% ribosoomidest, millest 90% moodustavad 70S^{A43} ribosoomid, järeldades sellest, et bakterid reguleerivad rasketes keskkonnatingimustes ümber oma valkude sünteesi (Sauert *et al.*, 2016). MazF-il on rRNA-s palju lõikesaite, mis suures osas asuvad rRNA struktureeritud regioonides ning seetõttu pole need saidid küpsetes ribosoomides MazF-le kättesaadavad. Vesper jt näitasid ka, et MazF lõikab rRNA-d järjestusest ↓¹³⁹⁶ACA, mis on küpses ribosoomis dekodeerimise piirkonnaks. Lõikamine sellest järjestusest põhjustaks oluliselt ribosoomi aktiivsuse langemist.

See annab alust arvata, et MazF lõikamine toimub pigem rRNA prekursorites, kus ei ole MazF lõikamise aktiivsust piiravaid tegureid võrreldes küpse ribosoomiga (Mets *et al.*, 2017; Vesper *et al.*, 2011). Järgnevad katsed on seda teooriat ka kinnitanud. MazF-i ekspressiooniga indutseeritud rakus hinnati täispikkuses 16S rRNA lõikamist MazF poolt ning 43 nt pikkuse fragmendi teket. 16S rRNA lõikamine oli marginaalne ning 43 nt fragmente tekkis kõigest 1% algsest küpsete ribosoomide hulgast. Samuti ei nähtud MazF-i ekspresseerivates rakkudes küpse ribosoomi 16S rRNA 3'otsast suurenenud lõikamise aktiivsust. Küll aga nähti silmnähtavalt fragmentatsiooni suurenemist ebaküpse 16S rRNA hulgas, mida täheldati ka ebaküpse 23S rRNA puhul. Küpsemise asemel lõigatud rRNA prekursorid kuhjusid. See viitab rRNA küpsemise häiretele, mille tagajärjel inhibeeritakse ribosoomi biogeneesi (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2017). (Joonis 4)



Joonis 4. MazF-i ACA spetsiifiline rRNA lõikamine ja ribosoomi biogenees. Joonisel on kujutatud MazF-MazE süsteemi kõige potentsiaalsemat mõju ribosoomi biogeneesile. MazF ei tekitab liiderjärjestuseta transkripte ega spetsialiseerunud stressiribosome. MazF lõikab enamikke mRNA-sid mitmetest saitidest, samaaegselt segades ribosoomi biogeneesi, sihtides ribosomaalsete proteiinide transkripte ja rRNA prekursoreid. A) MazF lõikab mRNA-d ja rRNA-d ACA saidist (✓), kuid toksiini toime on inhibeeritud kui see on seondunud kompleksi antitoksiiniga MazE. Toksiin mRNA-d ja rRNA-

d lõigata ei saa ning toimub tavapärase ribosoomi biogenees ning transkriptide translatsioon. B) Stressitingimustes hakatakse lagundama antitoksiini MazE ning vaba toksiin pääseb ligi lõikesaitidele fragmenteerides rRNA prekursorid. Prekursorite fragmendid kuhjuvad ning ribosoomi biogenees on häiritud. Samuti toimub lõikamine mRNA kodeerimisjärjestustest ning seetõttu neid transkripte ei transleerita (Culviner ja Laub, 2018).

Vesper jt näitasid ACA lõikamist 16S rRNA positsioonil 1500-1502 tuvastades lõigatud 5' otsa praimerit pikendamise (ingl k. *primer extension*) meetodil ja 43 nukleotiidi pikkuse fragmendi tekkimist kasutades RNA-DNA hübridisatsiooni (Vesper *et al.*, 2011). Neid tulemusi on kinnitanud sõltumatud katsed teistes laborites (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2017). Samas pole tuvastatud MazF-i poolt 16S rRNA lõikamisel tekkivat 3' otsa positsioonis 1499. 5' otste kaardistamine toksiini lõikesaitide tuvastamiseks on piisav, sest *E. coli*-l puuduvad 5'→3' eksoribonukleaasid, mis 3' otsast ära lõigatud fragmente lagundaksid. 3' otste märkimine aga näitaks, mis saab RNA-ga edasi pärast lõikamist. Kui rRNA asub küpses ribosoomides, peaksid rRNA 3' otsad asuma lõikesaitide lähedal ja olema eksonukleaasse aktiivsuse eest kaitstud ning neid peaks olema võimalik tuvastada. Kui lõikamine toimub aga rRNA prekursorites, järgneb tõenäoliselt lõikamisele 3'→5' eksonukleaasne lagundamine ning 3' otsa tuvastamine pole võimalik (Mets *et al.*, 2017).

3' otsi on varasemalt üritatud tuvastada kasutades RNA 3' otste sekveneerimist ja 3'RACE (ingl k. *rapid amplification of cDNA ends*) meetodit (Mets *et al.*, 2017). Mõlemad meetodid sisaldavad pöördtranskriptsiooni ehk cDNA sünteesi kasutades RNA-d matriitsina. *E. coli* 16S rRNA 44 ja 45 heeliks sisaldavad metüleeritud nukleotiide positsioonides 1402 (m⁴Cm), 1407 (m⁵C), 1498 (m³U), 1516 (m²G), 1518 (m⁶₂A) ja 1519 (m⁶₂A). Need jäävad allavoolu MazF lõikekohast positsioonil 1500-1502. Metülatsioonid takistavad pöördtranskriptsiooni ja segavad ülal nimetatud meetodite kasutamist, mistõttu need ei sobi MazF-i poolt lõigatud 16S rRNA 3' otsa tuvastamiseks stressiribosoomides (Mets *et al.*, 2017; Vesper *et al.*, 2011).

Vastuse saamiseks küsimusele, kas MazF lõikab 16S rRNA-d küpses ribosoomis või rRNA eellases, oleks vajalik määrata 16S rRNA 3'ots MazF-i ekspresseerivate bakterite ribosoomides.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

On teada, et *E. coli* MazF lõikab ribosomaalset RNA-d, eemaldades 16S rRNA 3' otsast 43 nukleotiidi pikkuse järjestuse koos aSD järjestusega. Seni on eelpool nimetatud lõikamist tuvastatud ainult äralõigatud RNA fragmenti näidates ja selle 5' otsa tuvastades. Soovisime teada saada, kas lõikamine toimub rRNA eellasmolekulides enne ribosoomide moodustumist või küpsetes ribosoomides. rRNA lõikamine küpsetes ribosoomides põhjustaks stressiribosoomide tekke ja võimaldaks tuvastada 16S rRNA uue 3'otsa lõikekoha lähedal, mida seni veel tehtud pole. Kui MazF lõikab rRNA eellasi, ei kaitse tekkinud 3'otsa ribosoomi struktuur; see on kiiresti lagundatav 3' → 5' eksoribonukleaaside poolt ja pole lõikekoha lähedal, ühes kindlas positsioonis, tuvastatav. Sellest lähtuvalt on käesoleva töö eesmärkideks:

1. Tuvastada 16S rRNA 3' ots MazF-i ekspresseerivates bakterites S1 nukleaaasiga kaardistamise meetodil
2. Hinnata stressiribosoomide tekke võimalikkust saadud tulemustest lähtudes

2.2 Metoodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
MG1655	F ⁻ , lambda ⁻ , rph-1	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
DH5α	lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), ΔlacU169, recA1, endA, hsdR17(rK-mK+), supE44, thi-1, gyrA96, relA1	(Hanahan, 1983)

Tabel 2. Kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus	Ekspressseeritav valk	T/A	Allikas
pSC228	pA1/O4/O3::chpAI	MazE	Antitoksiin	(Pedersen <i>et al.</i> , 2002)
pSC3326	pBAD33::chpAK	MazF	Toksiin	(Pedersen <i>et al.</i> , 2002)
pBAD33	Amp ^R , pACYC-184 kloneerimisvektor, mis sisaldab 3' SacI ja 5' HindIII kloneerimissaiti ning arabiinooosi promooterit			(Guzman <i>et al.</i> , 1995)

Tabel 3. Kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Praimeri järjestust (5' → 3')
Pikk_XbaIS1-5'1269 (restriktsioonisait alla joonitud)	GAATAAAAGATAACAAAGATGAGTAAGAGAAGAA CTTCACTGGAGTTGTTCGCATCTAGAGCAAGCGGAC CTCATAAAG
S1-1393_3'	ACAAGGCCCGGGAACGTA
S1-1499_3'	TACGACTTCACCCCAGTCATG
S1-1541_3'	aaGGAGGTGATCCAACCGC
S1-1547_3'	GTGTGAGCACTGCAAAGTACG
S1-1649_3'	TTATCAGGGGTGCGCTCTAACC
16S kontroll	GAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTC CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG GAATCGCTAG

2.2.2 Söötmed

Lurian-Bertani (LB) sööde, Difco™ LB Broth, Lennox:

Ühe liitri söötme kohta 10 g trüptooni, 5 g pärmiekstrakti, 5 g NaCl

LB agar, Difco™ LB Agar, Lennox:

Ühe liitri söötme kohta 10 g trüptooni, 5 g pärmiekstrakti, 5 g NaCl, 1,5% agarit

Super Optimal Broth (SOB) sööde Difco™ SOB Medium:

Ühe liitri söötme kohta 20 g trüptooni, 5 g pärmiekstrakti, 0,5 g NaCl, 2,4 g MgSO₄, 186 mg KCl (Hanahan, 1983). Kompetentsete rakkude valmistamiseks lisati SOB söötmele 0,2% glükoosi (SOC sööde ingl k. *super optimal broth with catabolite repression*).

2.2.3 Lahused

10 x TEN (TRIS, EDTA, NaCl puhver):

100 mM Tris (pH 7.5)

10 mM EDTA

1 M NaCl

Fenool RNA eraldamiseks:

Fenool küllastatud 0,1 M tsitraadipuhvriga, pH 4,1-4-5

10 % SDS

TBE:

54 g Tris base

27,5 g boorhapet

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

2 x magnetterade pesupuhver:

2 M NaCl

10 mM Tris (pH 7.5)

1 mM EDTA

2 x hübridisatsioonipuhver:

2 M NaCl

20 mM Tris (pH 7.5)

2 mM EDTA

Stopp-lahus:

100 mM Tris base

100 mM EDTA

Lahus biotinüleeritud proovi vabastamiseks magnetteradelt:

1% SDS

20 mM Tris (pH 7.5)

20 mM biotiin

Sekveneerimisgeel – 7M urea 6% poliakrüülamiidgeel (50 ml):

7,5 ml 40% akrüülamiid lahust (akrüülamiid-bisakrüülamiid 19:1)

21 g ureat

10 ml 10 x TBE

mQ mahuni

250 µl APS

25 µl TEMED

2.2.4 RNA eraldamine

Üleöö kasvatatud *E. coli* MG1655 pSC228 pSC3326 (MazF) ja MG1655 pSC228 pBAD33 (kontroll) rakkudest tehti 1000-kordne lahjendus 10 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud antibiootikume ampitsiliin 30 µg/ml ja klooramfenikool (25 µg/ml) ning 0,2% glükoosi. Rakke kasvatati loksutil (220 rpm) 37 °C juures tiheduseni $OD_{600} \approx 0,2$ ning seejärel lisati antitoksiini geeniekspressiooni indutseerimiseks 1 ml L-arabinoosi. Rakke kasvatati L-arabinoosi juuresolekul loksutil tiheduseni $OD_{600} \approx 0,4$. Bakterirakkude sadestamiseks tsentrifugeeriti 5 minutit 5000 g 4°C juures (Sorwall RC-5B Plus Superspeed, rootor 5500 pööret/min, Thermo Fisher Scientific, USA). Eemaldati supernatant, rakud külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati – 80°C külmkapis.

1,5 ml tuubi lisati 600 µl 0,1 M tsitraadipuhvriga küllastatud fenooli pH-ga 4,1-4,5 ja 1% SDS lahust. Lahuse valmistamisel lisati 540 µl fenoolile 60 µl 10% SDS-i ning seejärel kuumutati 67 °C-ni. Külmutatud rakud resuspendeeriti 600 µl jääkülmas 1 x TEN lahuses ning lisati seejärel eelkuumutatud fenooli ja 1 % SDS lahusesse. Tuubi inkubeeriti 67 °C juures 5 minutit. Iga minuti järel pöörati tuubi mõned korrad. Seejärel tsentrifugeeriti proovi 4 °C ja 13000 g juures

10 minutit (Eppendorf Centrifuge 5415R, Sigma-Aldrich, USA). 500 µl vesifaasi tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning asetati jääle. Kõik järgnevad protseduurid viidi läbi jääs. Vesifaasile lisati 600 µl 1:1 fenooli (tsitraatpuhvriga küllastatud, pH 4,1-4,5):kloroformi segu ning segati tugevalt. Seejärel tsentrifuugiti 4 °C ja 13000 g juures 10 minutit ning kanti 450 µl vesifaasi uude 1,5 ml tuubi. Lisati 500 µl kloroformi, segati tugevalt ning tsentrifuugiti 4 °C ja 15700 g juures 1 minut. Kanti 350 µl vesifaasi uude 1,5 ml tuubi ning lisati 40 µl RNAasi-vaba 3 M naatriumatsetaati pH-ga 5,2. Segati tugevalt ning lisati 480 µl jääkülma isopropanooli. Segati uuesti ning sadestati RNA-d 30 minutit -20 °C külmkapis. Tsentrifuugiti 40 minutit 4 °C ja 13000 g juures. Eemaldati võimalikult palju isopropanooli. Lisati 700 µl 75% jääkülma etanooli ja tsentrifuugiti 5 minutit 12000g juures. Eemaldati võimalikult palju etanooli ja jäeti tuubid avatult kuivama toatemperatuuril 10 minutit. RNA lahustati 40 µl Milli-Q vees, viidi uude tuubi ning hoiustati -80 °C külmkapis.

2.2.5 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

100 µl-le steriilsele veele lisati *E. coli* MG1655 rakke ning seda DNA-d sisaldavat rakususpensiooni kasutati PCR-i reaktsiooni matriitsina.

PCR-i reaktsioonisegu üldmahuga 20 µl sisaldas:

2,5 % DMSO (Thermo Fisher Scientific, USA), 2 mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,02 U/µl *Phusion* DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5 µM praimereid, 4 µl rakulüsaati ning 1 x *Phusion* puhvrit koostisega 10 mM MgCl₂. Reaktsioonisegu viidi lõppmahuni destilleeritud veega.

PCR-i läbiviimiseks kasutati PCR Eppendorf™ Mastercycler™ (Thermo Fisher Scientific, USA) aparaati.

1 x *Phusion* puhvrit (Thermo Fisher Scientific, USA), 5 % DMSO-t (Thermo Fisher Scientific, USA), 2 mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,02 U/µl *Phusion* DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5 µM praimereid, 4 µl rakulüsaati ja reaktsioonisegu viidi lõppmahuni destilleeritud veega. PCR-i läbiviimiseks kasutati PCR Eppendorf™ Mastercycler™ (Thermo Fisher Scientific, USA) aparaati.

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon, polümeraasi aktiveerimine: 98 °C 5 minutit
2. DNA denaturatsioon: 98 °C 30 sek
3. Praimerite seondumine DNA-le: 52 °C 40 sekundit
4. DNA süntees: 72 °C 40 sekundit

5. DNA pikendamine: 72 °C 1 minut
6. Lõplik pikendamine: 72 °C 8 minutit

Etappe 2-5 korrati 30 korda.

PCR reaktsiooni kasutati uuritava RNA järjestusega komplementaarsete DNA-matriitside loomiseks S1 kaardistamise jaoks ja DNA suurusmarkerite sünteesiks. Selleks kasutati *forward* praimerina Pikk_XbaIS1-5'1269 ja *reverse* praimerina vastavalt S1-1393_3', S1-1499_3', S1-1541_3', S1-1547_3' või S1-1649_3' praimerit (Tabel 3).

2.2.6 DNA ja RNA geelelektroforees

DNA ja RNA fragmentide olemasolu ja pikkuste kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi (Biometra Standard Power Pack25, Analytik Jena, Saksamaa). Valmistati 1% agarosgeel (1% agarosi 1 x TBE puhvrises), mis sisaldas etiidiumbromiidi (25 µg/ml). RNA puhul kasutati RNAasi vaba agarosi (SeaKem LE, Lonza, USA). Geeli hammastesse kanti proovi 10 µl, millest 1/10 oli laadimispuhver (Thermo Fisher Scientific, USA). DNA laadimispuhver sisaldas 60 % glütserooli, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM EDTA-d, 0,03 % broomfenoolsinist, 0,03 % ksüleentsüanool FF-i ning RNA laadimispuhver sisaldas 95% formamiidi, 0,025 % SDS-i, 0,025 % etiidiumbromiidi, 0,5 mM EDTA-d ning 0,025 % broomfenoolsinist, 0,025 % ksüleentsüanool FF-i. Elektroforees viidi läbi 95 V juures 1 x TBE puhvrises ning DNA/RNA fragmendid visualiseeriti UV valguses (312 või 254 nm). Seejärel puhastati DNA välja PCR proovidest DNA Clean & Concentrator™-5 abil (Zymo Research, USA).

Restriktsioonifragmentide jaoks valmistati 1,5 % agarosgeel (1,5 % agarosi 1 x TBE puhvrises), mis sisaldas etiidiumbromiidi (25 µg/ml). Geeli hammastesse kanti proovi 30 µl, millest 1/10 oli laadimispuhver. Elektroforees viidi läbi 220V/110 mA juures 1 x TBE puhvrises. Restriktsioonifragmendid visualiseeriti UV valguses (312 nm). Fragmendid lõigati geelist skalpelliga välja ning puhastati geelist Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA) abil.

2.2.7 RNA 3' otsa kaardistamine S1 nukleaasiga: katse ülesehitus

S1 nukleaas lagundab üksikahelalist DNA-d või RNA-d. Üksikahelise DNA proovi RNA-ga paardunud osa on nukleaasi eest kaitstud, paardumata osa lagundatakse. Kaardistamise jaoks kasutati matriitsina üksikahelalise DNA fragmente, mille 3' ots oli radioaktiivselt märgistatud ja märgistamata 5' ots ulatus üle uuritava RNA 3' otsa. Proovi 3' ots peab RNA-ga täielikult paarduma, et nukleaas seda ei lagundaks (Joonis 5).

Proovi valmistamiseks sünteesiti esmalt polümeraasi ahelreaktsioonil kaksikahelalise DNA fragment, paljundades 16S rRNA geeni 3' osa koos selle järgneva DNA järjestusega. 5' suunda jääva praimeriga (Pikk_XbaIS1-5'1269; Tabel 3) järjestusse oli viidud restriksiooniensüümi XbaI lõikekoht. Lõikamisel XbaI-ga tekkis 5' üleulatuv osa, mis lubas vastasahela 3'otsa märgistada radioaktiivse märke ja biotiiniga (Joonis 5). Biotiin võimaldas DNA-l seonduda streptavidiiniga kaetud magnetterade pinnale. Teradele kinnitatud kaksikahelaline DNA denatureeriti ja märkimata DNA ahel eemaldati. RNA hübridiseeriti teradele seotud prooviga ja töödeldi S1 nukleasiga. Peale töötlust elueeriti proov teradelt biotiiniga ja analüüsiti denatureerival poliakrüülamiid-geelelektroforeesil.

2.2.8 Restriksioon

Selleks, et üheaahelalise matriitsi otsi märgistada, tuli DNA-d lõigata XbaI restriksiooniga (Thermo Fisher Scientific, USA) nii, et vastasahelal tekiks üleulatuv DNA 5' ots (Joonis 5). 40 µl restriksioonisegu sisaldas restriksioonipuhvrit, XbaI restriksiooni (10 U/µl), 1 µg DNA-d ning Milli-Q vett. Restriksioon viidi läbi 37 °C juures 6-7 tundi.

2.2.9 DNA proovi märgistamine

Eelnevalt PCR-i ja XbaI restriksiooni abil loodud DNA fragmendid märgistati biotiiniga ning radioaktiivse märkega (Joonis 5). Märkimise segu sisaldas 1 x Klenow puhvrit (Jena Bioscience, Saksamaa), 0,01 mM biotin-16-dUTP-d (Jena Bioscience, Saksamaa), 1 µl Klenow 3'→5' exo- polümeraasi (Jena Bioscience, Saksamaa), 0,5 µg DNA-d, 30 µCi [α -³²P] dCTP-d ja mahuni mQ-d. Märkimise segu inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Polümeraasi reaktsiooni terminatsiooniks kasutati 8 µl 50 mM EDTA-d. Pärast märgistamist puhastati proovid üleliigsest märkest Zymo DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, USA) abil ning elueeriti 40 µl mQ-s.

2.2.10 Magnetterade pesemine. Proovi sidumine magnetteradele ja denatureerimine

40 µl streptavidiiniga kaetud magnetterasid (Invitrogen Dynabeads™ M-280 Streptavidin, Thermo Fisher Scientific, USA) pesti eelnevalt 500 µl 1 x magnetterade pesupuhvriga kaks korda ning suspendeeriti 40 µl-s 2 x magnetterade pesupuhvris. Märgistatud DNA proovide sidumiseks magnetteradega inkubeeriti märgistatud DNA proovi eelpestud magnetteradega 15 minutit toatemperatuuril. Kaheaahelaline märgistatud DNA seondub streptavidiiniga biotinüleeritud ahela kaudu. Magnetterad koguti kokku magneti abil ning eemaldati supernatant. Järgnes magnetterade pesu 50 µl 2 x magnetterade pesupuhvriga ning seejärel 50 µl TE puhvriga. Biotinüleerimata ahelate eemaldamiseks inkubeeriti terasid 50 µl 0,1 M NaOH-ga 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti terasid uuesti 50 µl 0,1 M NaOH-ga ning 50 µl 2

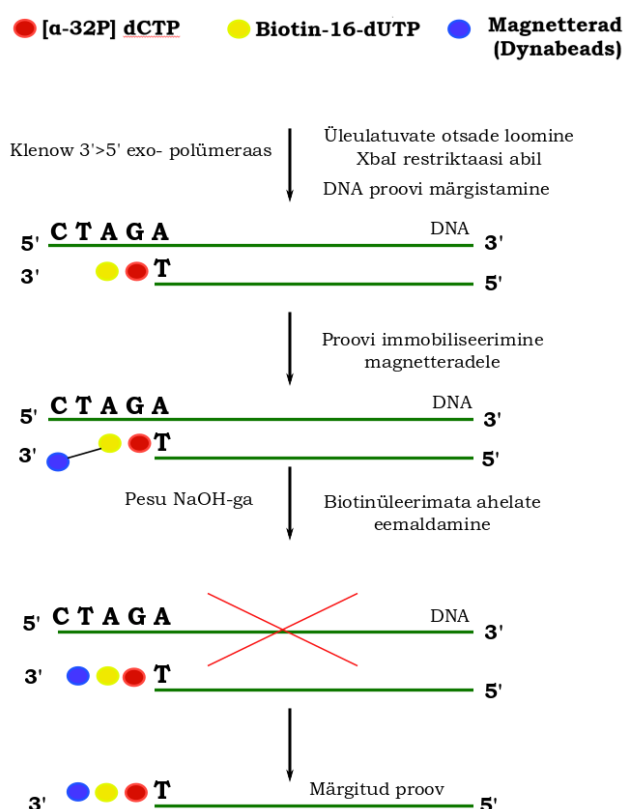
x magnetterade pesupuhvriga ning suspendeeriti kahekordses hübridisatsioonipuhvris. (Joonis 5)

2.2.11 DNA suurusmarkeri valmistamine

DNA suurusmarkerina kasutati lühikesi 3' otsast märgitud üksikahelalise DNA fragmente. Nende saamiseks amplifitseeriti 16S rRNA geeni 3' otsa kasutades matriitsina *E. coli* DNA-d ja praimereid Tabelis 3. Fragmente lõigati XbaI ga, lõigatud 3' ots märgistati sarnaselt pikale DNA proovile, fragmendid segati kokku, seoti streptavidiiniga kaetud magnetteradele, märkimata ahel eemaldati NaOH-ga denatureerides ja märgitud üksikahelaliste markerfragmentide segu eraldati teradelt biotiiniga. Fragmendid olid erineva pikkusega, nende 5' otsad vastasid varasemalt tuvastatud ja MazF lõikekohtades tekkivatele 16S rRNA 3' otstele (Tabel 4).

Tabel 4. DNA suurusmarkerisse kuuluvad fragmendid

Fragmendi pikkus nukleotiidides	RNA 3'otsa positsioon
380	Proov (1649)
305	Prekursor (1574)
272	Küps rRNA (1541)
230	MazF lõikesait (1499 - hüpoteetiline stressiribosoom)
124	MazF lõikesait (1393 - dekodeeriv tsepter)



Joonis 5. DNA proovi valmistamine. PCR-ga sünteesiti kaksikahelalise DNA fragment, mille 5' praimer järjestusse oli viidud restriksiooniensüümi XbaI lõikekoht. DNA-d lõigati XbaI-ga, lõigatud 3' ots märgistati Klenow 3'→5' exo⁻ polümeraasi abil biotiini ning radioaktiivse märkega. Seejärel seoti märgitud proov eelnevalt pestud streptavidiiniga kaetud magnetteradele (*Dynabeads*). NaOH-ga töötlemise ning pesemise abil eraldati biotinüleerimata ahelad ning magnetteradele seotud märgitud proov tõsteti 2 x hübridisatsioonipuhvrise.

2.2.12 Hübridisatsioon

Märgistatud DNA-le hübridiseeriti uuritav RNA. Hübridisatsiooni ning S1 nukleaasiga lõikamise toimimise kontrollimise jaoks kasutati 80 nukleotiidi pikkust DNA oligot (kontrolloligo), mis sisaldas uuritavate fragmentide RNA-ga komplementaarset piirkonda 16S rRNA 44-45 heeliksis positsioonil 1267-1347 (Joonis 10). Hübridisatsiooni jaoks suspendeeriti märgistatud DNA-ga seondunud magnetterad 150 µl 2 x hübridisatsioonipuhvris ning seejärel jagati immobiliseeritud proov kolme proovi vahel võrdselt laiali. Hübridisatsioonisegu sisaldas 50 µl immobiliseeritud proovi ning 50 µl RNA proovi. 50 µl RNA proov sisaldas totaalset RNA-d, mis oli eraldatud kas MazF induktsiooniga või induktsioonita rakkudest, 50 µg pärmi RNA-d ning lõppmahuni 1 x hübridisatsioonipuhvrit. Viidi läbi kolm erinevat katset kus erinesid nii totaalse RNA kui ka immobiliseeritud proovi kogused (Tabel 5). Hübridisatsioonisegu kaeti 70 µl RNAasi-vaba mineraalõliga ning kuumutati 1,5 ml tuubis 85 °C juures 5 minutit. Hübridisatsioon viidi läbi 1 h 55 °C juures, seejärel tõsteti proovid 30 sekundiks jää peale.

Kõigis kolmes katses hübridiseeriti prooviga:

1. Totaalne RNA ilma MazF induktsioonita
2. Totaalne RNA MazF induktsiooniga
3. 16S kontroll DNA

Tabel 5. Hübridisatsioonisegu koostis

Katse	Hübridiseeritava RNA või DNA kogus (µg)	Immobiliseeritud DNA proovi kogus (µg)
1.	24	0,5
2.	4,5	0,25
3.	2	0,25

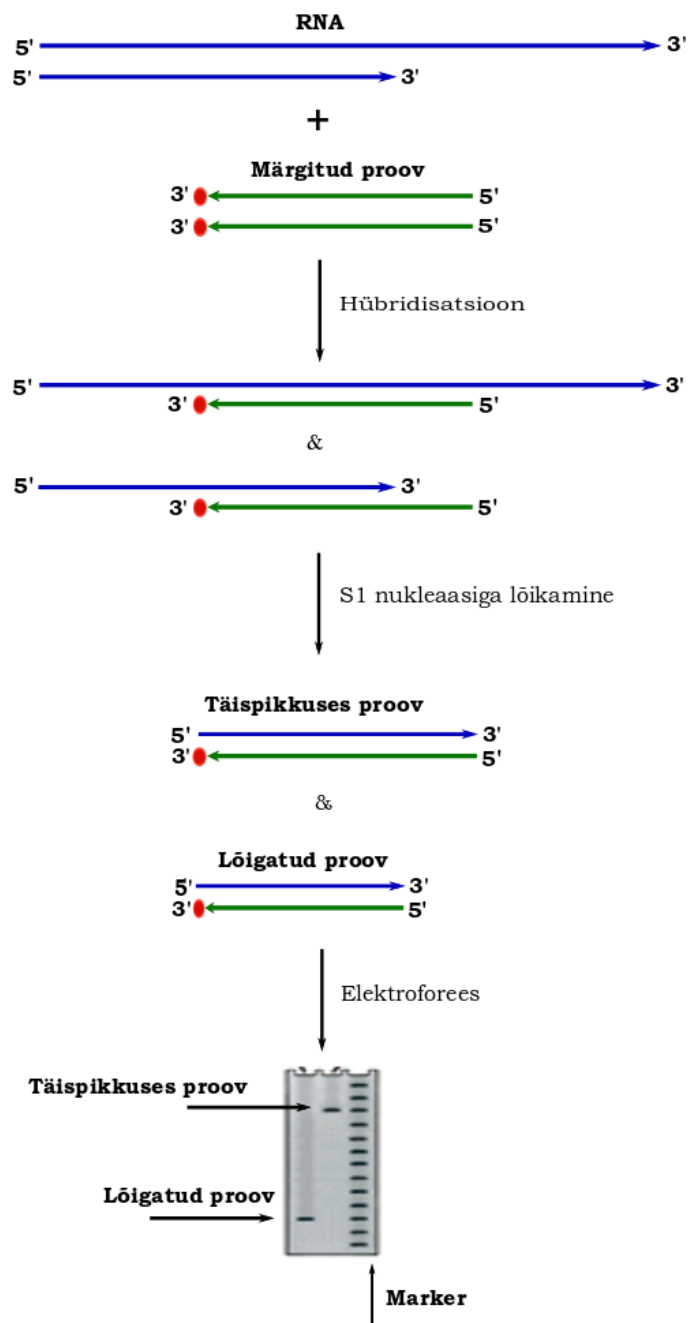
2.2.13 Töötlus S1 nukleaasiga

Pärast hübridisatsiooni tõsteti hübridisatsioonisegu ettevaatlikult mineraalõli alt uude 1,5 ml tuubi. Seejärel koguti magnetterad magneti abil, eemaldati supernatant ning magnetterad suspendeeriti 16 µl-s ühekordses S1 nukleaasipuhvris (Thermo Fisher Scientific, USA) Valmistati nelja erineva S1 nukleaasi (Thermo Fisher Scientific, USA) kontsentratsiooniga (0 U/µl, 50 U/µl, 100 U/µl, 200 U/µl) nukleaasilahust. 6 µl reaktsioonisegu sisaldas lisaks 2 µl lahjendatud S1 nukleaasile 1 µl 10 µg/µl pärmi tRNA-d ja 3 µl ühekordset S1 nukleaasipuhvrit. 6 µl reaktsioonisegule lisati 4 µl eelnevalt ühekordses S1 nukleaasipuhvris suspendeeritud

magnetterasid. Magnetterasid inkubeeriti nukleasiga 30 minutit jääl. Pärast inkubeerimist lisati nukleasi inaktiveerimiseks 1 µl stopp-lahust. Selleks, et eraldada märgistatud ja nukleasiga lõigatud reaktsiooniproduktid magnetterade küljest, koguti magnetterad magneti abil kokku, eemaldati supernatant, lisati 10 µl lahust biotinüleeritud proovi vabastamiseks magnetteradelt ning inkubeeriti proovi 94 °C juures 5 minutit. (Joonis 6) Seejärel eemaldati magneti abil magnetterad, reaktsiooniprodukte sisaldav supernatant viidi uude tuubi ning sellele lisati 10 µl laadimispuhvrit.

2.2.14 Sekvenerimisgeelil voolutamine ja tulemuste visualiseerimine

Valmistati sekvenerimisgeel, mis valati süstla abil vormi. Geelil lasti polümeriseeruda 1 h ning seejärel viidi läbi preforees 60 W juures 1 h või kuni geel oli soojenenud 50 °C-ni (Sequi-Gen GT Sequencing Cell, Bio-Rad, USA). Pärast preforeesi lisati hammastesse 10 µl proovi ning DNA suurusmarkerit. Markerit ja proovi kuumutati eelnevalt 80 °C juures 5 minutit. Proove voolutati geelil 60 W juures ligikaudu 3 h, seejärel geel kuivatati filterpaberile vaakumi abil. Kuiv geel asetati eksponatsiooniks 36 tunniks kassetti (GE Healthcare, USA) ning tulemus visualiseeriti Phosphoimager abil (Amersham Typhoon, GE Healthcare, USA). (Joonis 6)



Joonis 6. S1 nukleasiga kaardistamine. Märgitud proov ning uuritav RNA lisatakse hübridisatsioonisegusse. Hübridisatsiooni käigus seonduvad DNA ja RNA komplementaarsed järjestused omavahel. Seejärel inkubeeritakse proove S1 nukleasiga, mis on võimaline lõikama ainult üheaheelalist DNA-d või RNA-d. DNA-RNA komplementaarsest dupleksist üleulatuvad üheaheelalised otsad lõigatakse seega S1 nukleasi poolt ära. Allesjäänud fragmendid visualiseeritakse denatureerival geelil.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 *E. coli* 16S rRNA 3' otsa tuvastamine S1 nukleasiga

Vesper jt pakkusid välja *E. coli* uue stressi translatsioonimehhanismi, mille kohaselt aSD järjestuseta stressiribosoomid transleerivad liiderjärjestuseta transkripte. Vastavalt sellele osaleb MazF toksiin mRNA liiderjärjestuse eemaldamises ning lõikab küpse ribosoomi 16S rRNA-d 1500-1502 järjestusest, eemaldades rRNA 43 nt pikkuse 3' otsa koos aSD järjestusega (Vesper *et al.*, 2011).

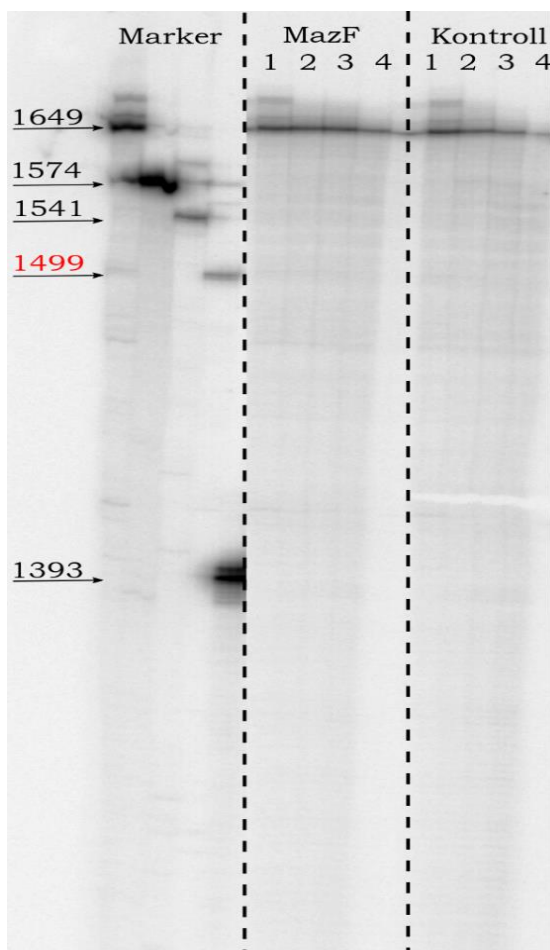
MazF lõikab ainult üheaahelise ning struktureerimata substraati, kuid paljud tuvastatud MazF lõikesaidid asuvad sügaval ribosomaalses alaühikus ning on vähemalt osaliselt paardunud. See annab alust arvata, et nende saitide lõikamine toimub enne ribosoomi kokkupanekut, näiteks rRNA prekursoris, mitte küpses ribosoomis (Mets *et al.*, 2017).

Seni on kõige kõnekam tõend 16S rRNA lõikamise kohta küpses ribosoomis 1500-1502 lõikesaidist eemaldatud 43 nt pikkuse fragmendi tuvastamine ja selle 5' otsa kaardistamine. Peale MazF lõikamist peaks olema tuvastatav ka tekkiv RNA 3' ots. Meie labori varasemates töodes püüti seda tuvastada kasutades RNA 3' otste sekveneerimist ja 3'RACE meetodit. Mõlemaid meetodeid takistab 16S rRNA 3' otsa modifitseerimine. Seetõttu on ilma modifikatsioonideta eellas-rRNA 3' otsa tuvastamine alati eelistatud võrreldes küpses ribosoomides oleva 16S rRNA protsessitud otsaga (Mets *et al.*, 2017). Käesoleva tööga taheti selgitada, kas töötlus S1 nukleasiga sobib paremini küpses ribosoomis oleva 16S rRNA otsa tuvastamiseks. See võimaldaks kontrollida, kas MazF tõesti lõikab 16S rRNA-d küpses ribosoomis ning tekitab stressiribosoomi, millel puudub aSD järjestus.

Markeriks antud katses kasutati üksikahelalise DNA fragmente, mille 5'otsad vastasid varasemalt tuvastatud 16S rRNA 3' otstele (Tabel 4). Kui lõikamine toimub ACA saidist 44-45 heeliks, on RNA 3' ots S1 nukleasiga kaardistamise meetodil tuvastatav. Küpse rRNA tuvastamiseks loodi lühike DNA fragment, mille 5' ots vastab 16S rRNA positsioonile 1649, mis asub protsessimata eellas-rRNA-s ning ulatub küpse rRNA 3' otsast üle. Positsioon 1574 vastab rRNA prekursori 3'otsale, 1541 protsessitud küpsele rRNA-le ning 1499 ja 1393 on potentsiaalsed MazF-i lõikamisel tekkivad 3' otsad (Tabel 4).

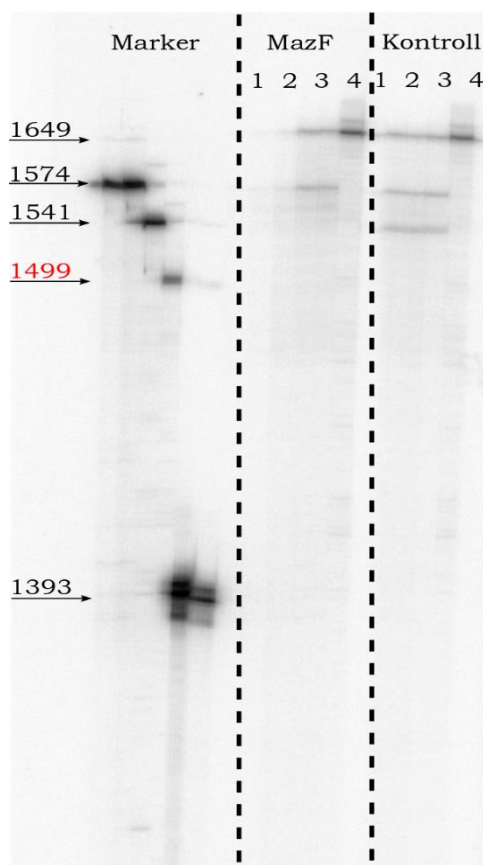
S1 nukleas lõikab ainult üksikahelalist DNA-d või RNA-d. Kui DNA või RNA dupleksil on üheaahelaline üleulatuv osa, lagundab S1 nukleas selle ära ning ainult paardunud osa jääb alles. Kõigepealt sünteesitakse RNA-ga komplementaarne proov, üksikahelaline DNA, mille 3' ots on radioaktiivselt märgistatud. Pärast hübriidisatsiooni 5' üleulatuvad otsad lõigatakse ära ning

allesjäänud fragmendi suurus määratakse denatureerival geelelektroforeesil (Joonis 6). Kasutades DNA kontrolloligot, kontrolliti kas katse ülesehitus töötab ja S1 nukleaasi kontsentratsioonid on sobivas vahemikus (Joonis 9). Seejärel tehti katse RNA-ga, korrates seda 3 korda. Igas katses muudeti hübridisatsioonisegusse lisatava RNA hulka (Tabel 5). Esimese katse puhul lisati hübridisatsioonisegusse RNA-d ülehulgas (Joonis 7). Proovide üleulatuvate otsade lõikamiseks valiti neli erinevat S1 nukleaasi kontsentratsiooni.



Joonis 7. Katse 1. 16S rRNA 3' otste tuvastamine S1 nukleasiga. *E. coli* MazF induktsioonita ning induktsiooniga rakkudest eraldatud RNA-d lisati hübridisatsiooniproovile 24 µg. *E. coli* MG1655 DNA-st loodi PCR-i abil uuritava RNA jaoks matriits, mis märgistati 30 µCi [α -³²P] dCTP-ga; 0,5 µg proovi seoti magnetteradele, denatureeriti ning lisati hübridiseeritav RNA (Tabel 5). Hübridisatsioon viidi läbi 55 °C juures 1 h ning seejärel töödeldi proove 4 erineva kontsentratsiooniga S1 nukleasiga 1 (0 U/µl), 2 (25 U/µl), 3 (50 U/µl), 4 (100 U/µl), et lõigata ära üleulatuvad üheaheelised otsad. DNA suurusmarker ning S1 nukleasiga töödeldud proovid kanti sekveneerimisgeelile. Esitatud on Phosphoimageri abil visualiseeritud fragmendid.

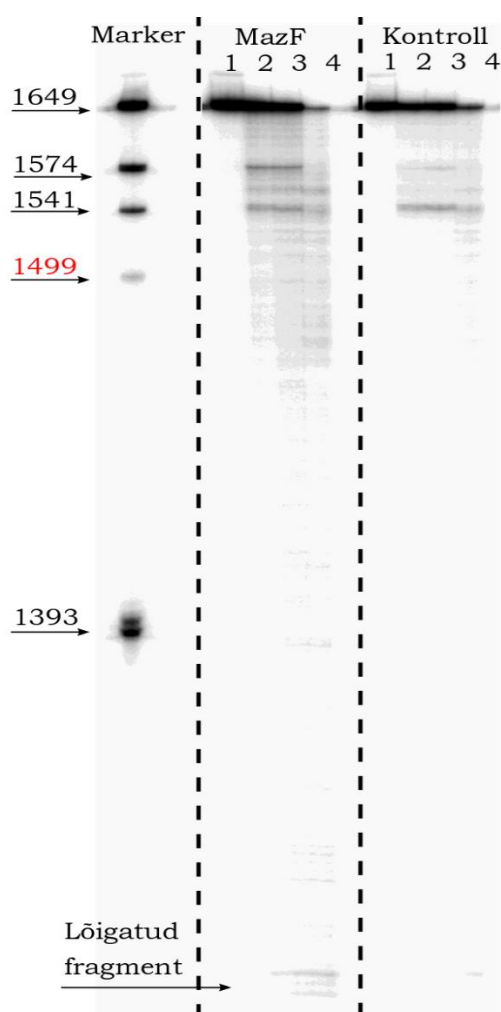
Esimese katse tulemusena on näha, et nukleas pole proovi lagundanud. Geelilt ei ole võimalik tuvastada prekursori ega muid protsessitud otsi. Seda põhjustab hübridisatsiooni tasakaal. Pikemate RNA fragmentide afiinsus DNA matriitsi suhtes on kõrgem kui lühemate oma tänu pikemale paardunud alale. Kõige pikema paardumisega kompleksid on kõige stabiilsemad ning seetõttu on hübridisatsiooni tasakaal nihutatud paardumise maksimaalsuse suunas. Seepärast hübridiseerub RNA suure ülehulga korral kogu proov kõige pikemale RNA molekulile, protsessimata rRNA transkriptile. Sel põhjusel ei ole proovi 5' otsa lõikamist S1 nukleasiga poolt (s.o lühemaid fragmente) ülehulgas RNA puhul võimalik tuvastada. Selleks, et oleks võimalik näha ka protsessitud 16S rRNA 3' otsi, tuli optimeerida RNA kogust hübridisatsiooniseigus. Teise katse käigus vähendati RNA kogust 4,5 µg-le (Joonis 8).



Joonis 8. Katse 2. 16S rRNA potentsiaalsete lõikesaitide tuvastamine 3' otsast S1 nukleasiga. *E. coli* MazF induksioonita ning induksiooniga rakkudest eraldatud RNA-d lisati hübridisatsiooniproovile 4,5 µg. *E. coli* MG1655 DNA-st loodi PCR-i abil uuritava RNA jaoks matriits, mis märgistati 30 µCi [α -³²P] dCTP-ga; 0,25 µg proovi seoti magnetteradele ning lisati RNA. Hübridisatsioon viidi läbi 55 °C juures 1 h ning seejärel töödeldi proove 4 erineva kontsentratsiooniga S1 nukleasiga 1 (0 U/µl), 2 (25 U/µl), 3 (50 U/µl), 4 (100 U/µl), et lõigata ära üleulatavad üheaheelalised otsad. DNA suurusmarker

ning S1 nukleasiga töödeldud proovid kanti sekveneerimisgeelile. Esitatud on Phosphoimageri abil visualiseeritud fragmendid.

Teise katse käigus tulevad nähtavale juba väiksemad fragmendid, tuvastatavad on 16S rRNA prekursori ja küpse 16S rRNA otsad, kuid kõige rohkem huvi pakkuv 3' ots saidis 1499 ei ole geelil tuvastatav. Seepärast tehti kolmas katse, et leida DNA matriitsi ja RNA optimaalne kogus hübridisatsioonisegus, mille juures oleks võimalik tuvastada nii suuremaid kui väiksemaid fragmente. Kõige optimaalsem RNA ja radioaktiivselt märgitud DNA matriitsi kogus oli vastavalt 2 μg ning 0,25 μg (Joonis 9).



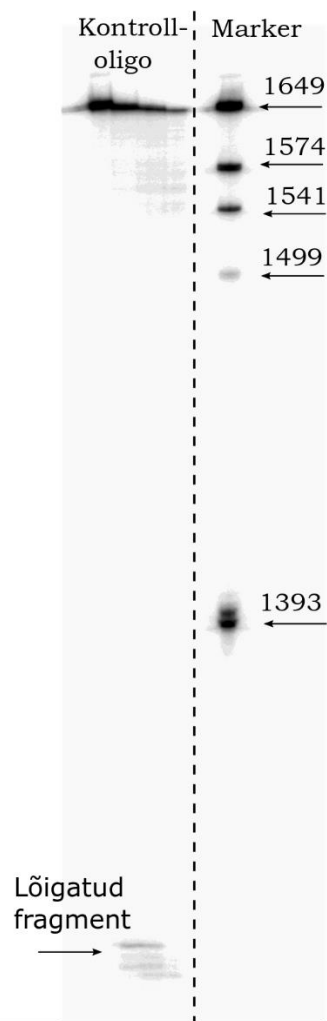
Joonis 9. Katse 3. 16S rRNA potentsiaalsete lõikesaitide tuvastamine 3' otsast S1 nukleasiga. *E. coli* MazF induktsioonita ning induktsiooniga rakkudest eraldatud RNA-d lisati hübridisatsiooniproovile 2 μg . *E. coli* MG1655 DNA-st loodi PCR-i abil uuritava RNA jaoks matriits, mis märgistati 30 μCi [α - ^{32}P] dCTP-ga, 0,25 μg proovi seoti magnetteradele ning lisati RNA-le (Tabel 5). Hübridisatsioon viidi läbi 55 °C juures 1 h ning seejärel töödeldi proove 4 erineva kontsentratsiooniga S1 nukleasiga 1 (0 U/ μl), 2 (25 U/ μl), 3 (50 U/ μl), 4 (100 U/ μl), et lõigata ära hübridisatsiooni käigus tekkinud üleulatuvad

üheaahelised otsad. DNA suurusmarker ning S1 nukleaasiga töödeldud proovid kanti sekveneerimisgeelile. Esitatud on Phosphoimageri abil visualiseeritud fragmendid.

Ka kolmanda katse tulemusel on näha 16S rRNA prekursori 3' otsa positsioonis 1574 ja küpse 16S rRNA otsa positsioonis 1541. Nii katse 2 kui katse 3 näitavad, et vastusena MazF-i induktsioonile suureneb ebaküpse 16S rRNA eellase osakaal. 16S rRNA prekursori kogunemist rakku vastusena MazF-le nähti ka varem kasutades 3' otste RNA sekveneerimist ja 3'RACE meetodit (Mets *et al.*, 2017). Samas ei võimaldanud 3' RACE üldse tuvastada küpse rRNA otsa, kuid S1 nukleaasiga on see nähtav nii kontrollkultuuris kui ka MazF-i tootvates bakterites (Katse 3; Joonis 9). Seega võib öelda, et nagu lootsime, on S1 nukleaasi meetod vähem tundlik rRNA modifitseerimise suhtes.

Vesper jt näitasid ja sõltumatud katsed kinnitasid, et MazF lõikab 16S rRNA-d lõikesaitides 1500-1502 ja 1369-1398, mille tulemusel peaksid tekkima 3' otsad positsioonides 1499 ja 1393. Meie oma katses neid ei näinud (Joonis 8; Joonis 9). Kui MazF-i tekitatav 3' ots positsioonis 1393 (ribosoomi dekodeerivas tsentris) oli tuvastatav nii 3' otste RNA sekveneerimist ja 3'RACE meetodil, siis 3' otsa positsioonis 1499, mis peaks esinema stressiribosoomides, pole veel kellelgi õnnestunud tuvastada (Mets *et al.*, 2017). Kõige tõenäolisem seletus sellele on, et vastav lõikamine toimub ebaküpse 16S rRNA eellases ja eksonukleaasid asuvad seda kiiresti lagundama.

Meie tulemus on kooskõlas Culviner jt poolt läbiviidud katsetega, kus MazF-i juuresolekul ei tuvastatud märkimisväärset lõikamise aktiivsuse suurenemist küpse ribosoomi 16S rRNA 3' otstes. Ka Mets jt ei näinud 1499 saidi 3' otsa vastuseks MazF-i induktsioonile (Culviner ja Laub, 2018; Mets *et al.*, 2017). Kuna selle katse käigus oli võimalik tuvastada ka väga väikeseid lõigatud fragmente, siis saab välistada, et hübriidsatsiooni tasakaalu tõttu ei jätkunud 1393 ja 1499 fragmentide tuvastamiseks DNA matriitsi. Need tulemused võivad viidata, et MazF lõikamine toimub 16S rRNA eellasmolekulides ning 3' otsi pole võimalik tuvastada seetõttu, et need on 3'→5' eksonukleaasi poolt ära lagundatud.



Joonis 10. Kontrolloligo. 16S rRNA potentsiaalsete lõikesaitide tuvastamine 3'otsast S1 nukleaasiga. *E. coli* MG1655 DNA-st loodi PCR-i abil kontrolloligo jaoks matriits, mis märgistati 30 μCi [α - ^{32}P] dCTP-ga, kinnitati magnetteradele. Märgistatud matriitsi lisati hübridisatsiooniproovile 0,25 μg ning sünteesitud DNA kontrolloligot lisati 2 μg . Hübridisatsioon viidi läbi 55 °C juures 1 h ning seejärel töödeldi proove 4 erineva kontsentratsiooniga S1 nukleaasiga 1 (0 U/ μl), 2 (50 U/ μl), 3 (100 U/ μl), 4 (200 U/ μl), et lõigata ära hübridisatsiooni käigus tekkinud üleulatuvad üheaheelised otsad. DNA suurusmarker ning S1 nukleaasiga töödeldud proovid kanti sekveneerimisgeelile. Esitatud on Phosphoimageri abil visualiseeritud fragmendid.

S1 nukleaasiga 3' otste tuvastamise meetod on kvalitatiivne. Selle abil saame näha 3' otsi kui neid on palju, kuid selle meetodi abil ei ole võimalik tuvastada 3' otsi, mida on vähe ega saa teha kvantitatiivseid järeldusi 3' otste lõikamise kohta. Kasutades S1 nukleaasiga 3' otste tuvastamise meetodit, ei ole näha, et 3' otsad tekiksid 1393 või 1499 saitidest. Seega ei leidnud me tõendeid, mis näitaksid, et MazF lõikaks rRNA-d küpsetes ribosoomides.

S1 nukleaasiga märkimise meetodi puudusteks on mahukas ja pikk ettevalmistusprotsess ning suur taustamüra. Selles töös oli vaja S1 meetodit optimeerida ning leida sobiv DNA matriitsi

kui lisatava RNA kogus, sest antud meetod ei sobi lühemate ja vähemarvukate transkriptide 3' otste märkimiseks kui samas hübridisatsioonisegus on ka pikemad ja arvukamad transkriptid.

Järgmise sammuna oli plaanis eraldada ribosoomid ning töödelda neid väljapuhastatud MazF toksiiniga *in vitro*. Kui selle katse käigus MazF lõikab küpse ribosoomi 16S rRNA-d, peaks olema võimalik tekkivat 3' otsa tuvastada samal meetodil.

Kuid Culviner ja Laub näitasid hiljuti veenvalt, et isegi kui stressiribosoomide esineks, oleks neid väga vähe – kõigest 1 % algsest küpsete ribosoomide hulgast (Culviner ja Laub, 2018). Kui produkti on nii vähe kui seda kirjeldati, polegi seda väga kerge detekteerida. S1 nukleaasiga märkimise meetod pole piisavalt tundlik, et nii väikeses koguses produkti tuvastada ning seetõttu pole see meetod 1499 lõikesaidi 3' otsa tuvastamiseks sobiv. Nagu näha joonistelt 8 ja 9, tekib S1nukleaasi lõikeprodukte vähesel määral kogu geeli ulatuses. Kuna tekkiv laguproduktide muster on kontrolli ja MazF-i ekspresseerivate rakkude RNAd hübridiseerides sarnane, võib öelda, et tegu on lihtsalt lagunemisega, millel puudub seos uuritava RNA 3' otstega. Seepärast pole ka järgmiste katsete läbiviimine mõttekas.

Käesoleva töö tulemused toetavad hüpoteesi, et MazF ei lõika 16S rRNAd küpsetes ribosoomides, vaid pigem lõikab rRNA eellaseid ning inhibeerib rRNA küpsemist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli tuvastada 16S rRNA 3' ots MazF-i ekspresseeritavates bakterites S1 nukleasiga kaardistamise meetodil ning sellest tulenevalt hinnata stressiribosoomide tekke võimalikkust. Selleks valmistati radioaktiivselt märgitud DNA matriits, mis oli komplementaarne uuritava RNA järjestusega. Töö käigus optimeeriti DNA-RNA suhet hübridisatsiooniproovis ning viidi läbi kolm korduskatset. Katsete käigus tuvastati 16S rRNA eellasmolekuli 3' otsi seal, kus neid eelnevalt juba tuvastatud oli.

Katsete tulemusel ei olnud näha MazF lõigatud 16S rRNA 3' otsi. Selle üheks põhjuseks võib olla, et 16S rRNA lõikamist toimub vähe ning 3' otste arv on liiga madal, et neid tuvastada S1 nukleasiga kaardistamise meetodil, mis ei ole piisavalt tundlik. Teiseks põhjuseks võib olla, et MazF lõikab 16S rRNA lõikekohas 1500-1502 mitte küpsetes ribosoomides, vaid rRNA eellases, kus 3' ots eksoribonukleaside poolt lagundatakse.

Töö tulemused toetavad hüpoteesi, et MazF lõikab 16S rRNA eellasmolekule ning inhibeerib rRNA küpsemist.

SUMMARY

The goal of this thesis was to identify the 16S rRNA 3' end of MazF expressing bacteria by mapping it with S1 nuclease and to evaluate its potential in stress ribosome formation. A complementary radio-labelled DNA template was made for the RNA in question. DNA-RNA ratio in the hybridization sample was optimized several times and three experiments were performed. In conclusion, the 16S rRNA precursor was detected in areas that have been previously described. The 3' ends of the cleaved 16S rRNA were not detected. The first reason for these results is possibly due to the lack of 16S rRNA cleaving in general and due to the low count of detectable 3' ends. Another reason may be that the MazF cleaves the 16S rRNA at the 1500-1502 site not in the mature ribosomes but in the precursor of rRNA where the 3' end is degraded by exoribonucleases.

The results of the work support the hypothesis that MazF cleaves 16S rRNA precursors and inhibits rRNA maturation.

KASUTATUD KIRJANDUS

Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., Laub, M.T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Mol. Cell* 52, 617–628.

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6059–6063.

Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., Engelberg-Kulka, H. (2009). *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both “Death Proteins” and “Survival Proteins.” *PLoS Genet.* 5, e1000390.

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305, 1622–1625.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462.

Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W., Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.* 5, e1000706.

Cheng, Z.-F., Deutscher, M.P. (2005). An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol. Cell* 17, 313–318.

Choi, W., Yamaguchi, Y., Lee, J.-W., Jang, K.-M., Inouye, M., Kim, S.-G., Yoon, M.-H., Park, J.-H. (2017). Translation-dependent mRNA cleavage by YhaV in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 591, 1853–1861.

Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14328–14333.

Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* 332, 809–819.

Conlon, B.P., Nakayasu, E.S., Fleck, L.E., LaFleur, M.D., Isabella, V.M., Coleman, K., Leonard, S.N., Smith, R.D., Adkins, J.N., Lewis, K. (2013). Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 503, 365–370.

Culviner, P.H., Laub, M.T. (2018). Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. *Mol. Cell* 70, 868-880.e10.

Dahlberg, A.E., Dahlberg, J.E., Lund, E., Tokimatsu, H., Rabson, A.B., Calvert, P.C., Reynolds, F., Zahalak, M., 1978. Processing of the 5' end of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3598–3602.

Decatur, W.A., Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* 27, 344–351.

Deutscher, M.P. (2009). Chapter 9 Maturation and Degradation of Ribosomal RNA in Bacteria, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 369–391.

- Deutscher, M.P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* 34, 659–666.
- Deutscher, M.P. (2003). Degradation of Stable RNA in Bacteria. *J. Biol. Chem.* 278, 45041–45044.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R. (2006). Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. *PLOS Genet.* 2, e135.
- Evfratov, S.A., Osterman, I.A., Komarova, E.S., Pogorelskaya, A.M., Rubtsova, M.P., Zatsepin, T.S., Semashko, T.A., Kostyukova, E.S., Mironov, A.A., Burnaev, E., Krymova, E., Gelfand, M.S., Govorun, V.M., Bogdanov, A.A., Sergiev, P.V., Dontsova, O.A. (2017). Application of sorting and next generation sequencing to study 5'-UTR influence on translation efficiency in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 45, 3487–3502.
- Fasani, R.A., Savageau, M.A. (2013). Molecular mechanisms of multiple toxin–antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E2528–E2537.
- Fauvart, M., De Groote, V.N., Michiels, J. (2011). Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J. Med. Microbiol.* 60, 699–709.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371–382.
- Gerdes, K., Nielsen, A., Thorsted, P., Wagner, E.G. (1992). Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable *hok*, *srnB* and *pndA* effector messenger RNAs. *J. Mol. Biol.* 226, 637–649.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B., Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3116–3120.
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., Melderen, L.V. (2018). Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells. *mBio* 9, e00640-18.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol. Cell.*
- Hazan, R., Sat, B., Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol.* 186, 3663–3669.
- Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., Holden, D.W. (2014). Internalization of *Salmonella* by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science* 343, 204–208.
- Jain, C. (2002). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*. *IUBMB Life* 54, 315–321.
- Jørgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskolska, M., Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* Defines a Novel Family of Translation-Independent mRNA Interferases in Bacteria and Archaea. *J. Bacteriol.* 191, 1191–1199.

- Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 71, 477–494.
- Kamada, K., Hanaoka, F. (2005). Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* 19, 497–509.
- Kamada, K., Hanaoka, F., Burley, S.K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* 11, 875–884.
- Kawano, M., Aravind, L., Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* 64, 738–754.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K. (2004). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172–8180.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318, 652–655.
- Laursen, B.S., Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 101–123.
- Lepplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 39, 5513–5525.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Li, G.-Y., Zhang, Y., Chan, M.C.Y., Mal, T.K., Hoeflich, K.P., Inouye, M., Ikura, M. (2006). Characterization of dual substrate binding sites in the homodimeric structure of *Escherichia coli* mRNA interferase MazF. *J. Mol. Biol.* 357, 139–150.
- Li, Y., Zhou, H. (2009). tRNAs as regulators in gene expression. *Sci. China C Life Sci.* 52, 245–252.
- Li, Z., Deutscher, M.P. (2004). Exoribonucleases and Endoribonucleases. *EcoSal Plus* 1.
- Li, Z., Deutscher, M.P. (1996). Maturation Pathways for *E. coli* tRNA Precursors: A Random Multienzyme Process In Vivo. *Cell* 86, 503–512.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher, M.P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18, 2878–2885.
- Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (2001). The regulation of the *Escherichia coli* mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. *J. Biol. Chem.* 276, 5975–5984.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.-P., Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 84, 979–989.
- Melderen, L.V., Bast, M.S.D. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLOS Genet.* 5, e1000437.
- Mets, T., Kasvandik, S., Saarma, M., Maiväli, Ü., Tenson, T., Kaldalu, N. (2019). Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR. *Biochimie* 156, 79–91.
- Mets, T., Lippus, M., Schryer, D., Liiv, A., Kasari, V., Paier, A., Maiväli, Ü., Remme, J., Tenson, T., Kaldalu, N. (2017). Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites. *RNA Biol.* 14, 124–135.

- Moll, I., Engelberg-Kulka, H. (2012). Selective translation during stress in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 37, 493–498.
- Moore, P.B., Steitz, T.A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 813–850.
- Noller, H.F., Nomura, M. (1996). Ribosomes. p 167-186 In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*, 2nd ed., vol.1. ASM Press, Washington, D.C.
- Norton, J.P., Mulvey, M.A. (2012). Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 8, e1002954.
- Ogura, T., Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4784–4788.
- Oron-Gottesman, A., Sauert, M., Moll, I., Engelberg-Kulka, H. (2016). A Stress-Induced Bias in the Reading of the Genetic Code in *Escherichia coli*. *mBio* 7, e01855-16.
- Page, R., Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 12, 208–214.
- Pandey, D.P., Gerdes, K. (2005). Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33, 966–976.
- Pedersen, K., Christensen, S.K., Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 45, 501–510.
- Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112, 131–140.
- Phizicky, E.M., Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* 24, 1832–1860.
- Pon, C.L., Gualerzi, C.O., Brandi, L., Spurio, R., Tomšić, J., Caserta, E., La Teana, A. (2000). Translation Initiation in Bacteria, in: Noller, H.F., Moore, P.B., Douthwaite, S.R., Garrett, R.A., Matheson, A.T., Liljas, A. (Eds.), *The Ribosome*. American Society of Microbiology, pp. 475–494.
- Potapov, V., Fu, X., Dai, N., Corrêa, I.R., Tanner, N.A., Ong, J.L. (2018). Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity. *Nucleic Acids Res.* 46, 5753–5763.
- Raina, M., Ibbá, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Front. Genet.* 5.
- Roy, B., Liu, Q., Shoji, S., Fredrick, K. (2018). IF2 and unique features of initiator tRNA^{Met} help establish the translational reading frame. *RNA Biol.* 15, 604–613.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., Engelberg-Kulka, H. (2001). Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J. Bacteriol.* 183, 2041–2045.
- Satwika, D., Klassen, R., Meinhardt, F. (2012). Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 345–356.
- Sauert, M., Wolfinger, M.T., Vesper, O., Müller, C., Byrgazov, K., Moll, I. (2016). The MazF-regulon: a toolbox for the post-transcriptional stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 44, 6660–6675.

- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102, 615–623.
- Schuster, C.F., Bertram, R. (2013). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 73–85.
- Sergiev, P.V., Aleksashin, N.A., Chugunova, A.A., Polikanov, Y.S., Dontsova, O.A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 226–235.
- Sirdeshmukh, R., Schlessinger, D. (1985). Why is processing of 23 S ribosomal RNA in *Escherichia coli* not obligate for its function? *J. Mol. Biol.* 186, 669–672.
- Smith, B.A., Gupta, N., Denny, K., Culver, G.M. (2018). Characterization of 16S rRNA Processing with Pre-30S Subunit Assembly Intermediates from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 430, 1745–1759.
- Srivastava, A.K., Schlessinger, D. (1988). Coregulation of processing and translation: mature 5' termini of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA form in polysomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7144–7148.
- Tripathi, A., Dewan, P.C., Siddique, S.A., Varadarajan, R. (2014). MazF-induced Growth Inhibition and Persister Generation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 289, 4191–4205.
- Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1988). Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* 170, 1461–1466.
- Udagawa, T., Shimizu, Y., Ueda, T. (2004). Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria. *J. Biol. Chem.* 279, 8539–8546.
- Van Acker, H., Sass, A., Dhondt, I., Nelis, H.J., Coenye, T. (2014). Involvement of toxin-antitoxin modules in *Burkholderia cenocepacia* biofilm persistence. *Pathog. Dis.* 71, 326–335.
- Vázquez-Laslop, N., Lee, H., Neyfakh, A.A. (2006). Increased Persistence in *Escherichia coli* Caused by Controlled Expression of Toxins or Other Unrelated Proteins. *J. Bacteriol.* 188, 3494–3497.
- Venturelli, O.S., Tei, M., Bauer, S., Chan, L.J.G., Petzold, C.J., Arkin, A.P. (2017). Programming mRNA decay to modulate synthetic circuit resource allocation. *Nat. Commun.* 8, 15128.
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A.C., Engelberg-Kulka, H., Moll, I. (2011). Selective Translation of Leaderless mRNAs by Specialized Ribosomes Generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 147, 147–157.
- Wang, X., Lord, D.M., Hong, S.H., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R., Wood, T.K. (2013). Type II Toxin/Antitoxin MqsR/MqsA Controls Type V Toxin/Antitoxin GhoT/GhoS. *Environ. Microbiol.* 15, 1734–1744.
- Wang, X., Wood, T.K. (2011). Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5577–5583.
- Wellner, K., Betat, H., Mörl, M. (2018). A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1861, 433–441.
- Wen, Z., Wang, P., Sun, C., Guo, Y., Wang, X. (2017). Interaction of Type IV Toxin/Antitoxin Systems in Cryptic Prophages of *Escherichia coli* K-12. *Toxins* 9, 77.

- Williams, J.J., Hergenrother, P.J. (2012). Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends Microbiol.* 20, 291–298.
- Yamaguchi, Y., Inouye, M. (2009). mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85, 467–500.
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M. (2011). Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Genet.* 45, 61–79.
- Young, R.A., Steitz, J.A. (1978). Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3593–3597.
- Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D., Yusupov, M. (2006). Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature* 444, 391–394.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 12, 913–923.
- Zorzini, V., Mernik, A., Lah, J., Sterckx, Y.G.J., De Jonge, N., Garcia-Pino, A., De Greve, H., Versées, W., Loris, R. (2016). Substrate Recognition and Activity Regulation of the *Escherichia coli* mRNA Endonuclease MazF. *J. Biol. Chem.* 291, 10950–10960.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Linda-Marie Kimmel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Escherichia coli 16S rRNA 3' otsa tuvastamine S1 nukleasiga

mille juhendaja on Niilo Kaldalu

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Linda-Marie Kimmel

30. mai 2019