

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

***Saccharomyces cerevisiae* kontrolltöve sobivuse hindamine ribosomaalse valgu eS6 rolli
uurimiseks IRES-vahendatud translatsioonis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Deelia Maivel

Juhendaja: nooremteadur Analiis Veeremaa, MSc

TARTU 2026

INFOLEHT

***Saccharomyces cerevisiae* kontrolltüve sobivuse hindamine ribosomaalse valgu eS6 rolli uurimiseks IRES-vahendatud translatsioon**

Valgusüntees on eukariootsetes rakkudes keerukalt reguleeritud protsess. Juba ainuüksi translatsiooni initsiatsioon klassikalise mehhanismi korral sõltub mitmete faktorite olemasolust ning ribosoomi alaühikute omavahelisest interaktsioonidest. Ribosoomi alaühikute vahelised sillad on vajalikud translatsiooni efektiivsuse tagamisel. Tingimustes, kus ressursid muutuvad rakus limiteerivaks, on klassikaline translatsiooni initsiatsioon inhibeeritud. Alternatiivsetes tingimustes võib toimuda sisemise ribosoomi seondumise koha (IRES) vahendatud translatsiooni initsiatsioon, mis ei ole klassikalise translatsiooni initsiatsiooni tingimustest piiratud. Käesoleva töö eesmärk oli hinnata kontrolltüve sobivust ribosomaalse silla eB13 moodustumises osaleva valgu eS6 rolli uurimiseks IRES-vahendatud translatsioonis. Selleks määrati *Saccharomyces cerevisiae* kontrolltüve rakkude kasvukiirus ning IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni efektiivsus.

Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*, translatsioon, IRES, ribosoom

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Assessing the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* control strain for studying the role of the ribosomal protein eS6 in IRES-mediated translation

Protein synthesis is a complex regulated process in eukaryotic cells. The initiation of translation by the classical mechanism alone depends on the presence of several factors and the interactions between ribosomal subunits. The bridges between ribosomal subunits are necessary to ensure the efficiency of translation. Under conditions where resources become limiting in the cell, classical translation initiation is inhibited. Under alternative conditions, internal ribosome binding site (IRES) mediated translation initiation can occur, which is not limited by the conditions of classical translation initiation. The aim of this work was to assess the suitability of the control strain to investigate the role of the protein eS6, which participates in the formation of the ribosomal bridge eB13, in IRES-mediated translation. For this purpose, the growth rate of the cells of the *Saccharomyces cerevisiae* control strain and the efficiency of IRES-mediated translation initiation were determined.

Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*, translation, IRES, ribosome

CERCS kood: P320 Nucleic acids, protein synthesis

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist	7
1.1.1. Ribosoomi sild eB13 ja ribosomaalne valk eS6	8
1.2. Translatsioon.....	10
1.2.1. Eukarüootne mRNA	10
1.2.2. Klassikaline translatsiooni initsiatsioon	10
1.2.3. Alternatiivne translatsiooni initsiatsioon	13
1.2.1. IGR IRES	13
1.2.2. IGR IRES struktuur	14
1.2.3. IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1. Töö eesmärk	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Kasutatud tüved	17
2.2.2. Kasutatud söötmed	18
2.2.3. Kasutatud plasmiidid	18
2.2.4. <i>S. cerevisiae</i> rakkude transformeerimine liitiumatsetaadi (LiOAc) meetodil	19
2.2.5. <i>S. cerevisiae</i> rakkude kasvukiiruse mõõtmine	19
2.2.5.1. <i>S. cerevisiae</i> rakkude kasvukiiruste andmete analüüs	20
2.2.6. <i>S. cerevisiae</i> rakkude IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsuste mõõtmine	20
2.2.6.1. <i>S. cerevisiae</i> rakkude IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsuste andmete analüüs	20
2.3. Tulemused.....	21
2.3.1. <i>S. cerevisiae</i> plasmiidikompensatsiooniga rakkude kasvu hindamine	21

2.3.2. IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsuse määramine <i>S. cerevisiae</i> Δ rps6AB-pA tüves <i>in vivo</i>	24
2.4. Arutelu	27
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	32
TÄNUSÕNAD	34
KIRJANDUSE LOETELU.....	35
LISA 1	43
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ ELEKTROONILISEKS AVALDAMISEKS.....	44

KASUTATUD LÜHENDID

eIF – eukarüootsed initsiatsioonifaktorid (ingl *eukaryotic initiation factors*)

Fluc – *Firefly* lutsiferaasi geen

IGR – geenidevaheline piirkond (ingl *intergenic region*)

IRES – sisemine ribosoomi seondumise koht (ingl *internal ribosome entry site*)

ORF – avatud lugemisraam (ingl *open reading frame*)

PIC – pre-initsiatsioonikompleks (ingl *pre-initiation complex*)

PK – pseudosõlm (ingl *pseudoknot*)

PTC – peptidüültransferaasi keskus (ingl *peptidyl transferase centre*)

Rluc – *Renilla* lutsiferaasi geen

SC – sünteetiline täissööde (ingl *synthetic complete*)

SLA – suhteline lutsiferaasi aktiivsus

SL – juuksenõelastruktuur (ingl *stem-loop*)

UTR – mittetransleeruv ala (ingl *untranslated region*)

YPD – pärmiekstrakti, peptooni ja glükoosi sisaldav sööde (ingl *yeast extract, peptone, dextrose*)

SISSEJUHATUS

Valgusüntees ehk translatsioon on kõikides rakkudes hädavajalik protsess, mis tagab põhiliste rakuprotsesside toimumise ning võimaldab rakkudel kohaneda muutuvate keskkonnatingimustega ja reageerida stressile. Translatsioon koosneb peamiselt kolmest etapist: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Klassikalise translatsiooni kõige piiravamaks etapiks on initsiatsioon, kuna see eeldab 5' *cap*-struktuuriga mRNA olemasolu, mRNA skaneerimist, mitmete initsiatsioonifaktorite seondumist ning funktsionaalse ribosoomikompleksi moodustamist. Ribosoomi alaühikute korrektse seondumise tagavad alaühikute vahelised sillad, mis stabiliseerivad ribosoomi struktuuri ja osalevad ka translatsiooni regulatsioonis (Kisly jt., 2019).

Raku optimaalsete kasvutingimuste halvenemisel reguleeritakse eluks mittevajalike valkude sünteesi translatsiooni initsiatsiooni etapis, piirates initsiatsioonifaktorite kättesaadavust (Palam jt., 2011). Kuigi klassikaline translatsiooni initsiatsioon on sellistes tingimustes inhibeeritud, saab siiski toimuda alternatiivne translatsiooni initsiatsioon. Üheks alternatiivse initsiatsiooni mehhanismi näiteks on sisemise ribosoomi seondumise koha (IRES) (ingl *internal ribosome entry site*) poolt vahendatud translatsioon. IRES-vahendatud translatsioon ei eelda mRNA 5' *cap*-struktuuri ega mRNA-l skaneerimist ning saab toimuda vaid valitud translatsiooni initsiatsioonifaktorite osalusel (Nakashima ja Uchiumi, 2009).

Käesolev töö uurib ribosoomi eukarüoodi-spetsiifilise silla moodustamises osaleva valgu eS6 rolli IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis. Töö loob aluse tulevastele uuringutele, mis käsitlevad lähemalt eukarüoodi-spetsiifilist silda eB13 ning selle silla moodustamises osalevat ribosomaalset valku eS6. Töö eesmärk on hinnata, kas *Saccharomyces cerevisiae* tüvi, mille genoomist on eemaldatud ribosoomi valgu eS6 paraloogid *RPS6A* ja *RPS6B* ning milles kompenseeritakse *RPS6A* ekspressiooni plasmiidilt, on sobilik kontrolltüveks tulevastes analüüsides ribosomaalse valgu eS6 rolli uurimiseks IRES-vahendatud translatsioonis. Selleks määrati *S. cerevisiae* kontrolltüve rakkude kasvukiirus ja IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsus.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

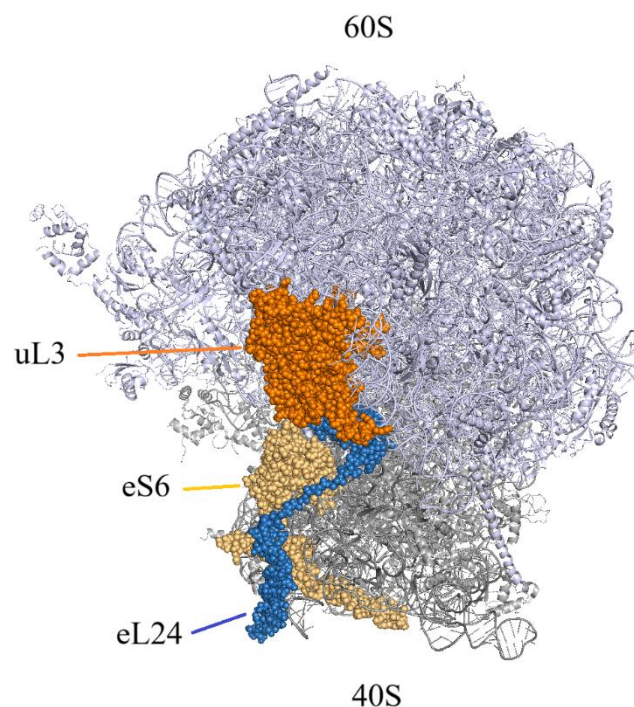
1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist

Translatsioon ehk valgusüntees toimub rakus pidevalt ning see muutub vastavalt raku vajadustele ja keskkonnatingumustele (Monticolo jt., 2021). Translatsiooni toimimiseks vajab rakk riboensüüme ehk ribosoomi, mis on keskse tähtsusega valgusünteesi katalüüsijaks. Kõik ribosoomid koosnevad suurest ja väiksest alaühikust, mis omakorda koosnevad rRNA-dest ja ribosomaalsetest valkudest (Ben-Shem jt., 2011; Gerhalter jt., 2026; Kisly ja Tamm, 2023). *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosoom koosneb 40S ja 60S alaühikust (Joonis 1) (Ben-Shem jt., 2011). 40S alaühik koosneb ühest rRNA molekulist ja 33 ribosomaalsest valgust ning 60S alaühik koosneb kolmest rRNA molekulist ja 46 valgust (Ben-Shem jt., 2011; Pietras jt., 2024).

Ribosoomi 40S alaühik jagatakse struktuurselt seitsmeks domeeniks: pea (ingl *head*), keha (ingl *body*), platvorm (ingl *platform*), nokk (ingl *beak*), vasak jalg (ingl *left foot*), parem jalg (ingl *right foot*) ja õlg (ingl *shoulder*) (Melnikov jt., 2012; Rabl jt., 2011; Spahn jt., 2001). Ribosoomi 60S alaühik koosneb kolmest peamisest struktuursest domeenist: keskmine kühm (ingl *central protuberance*), L1-kühm (ingl *L1-stalk*) ja P-kühm (ingl *P-stalk*) (Ben-Shem jt., 2011; Melnikov jt., 2012; Spahn jt., 2001). mRNA sisenemis- ja väljumistunnel paiknevad vastavalt 40S ja 60S alaühikus (Kisly ja Tamm, 2023; Rabl jt., 2011). Kahe alaühiku vahel asuvad tRNA seondumissaidid (A, P, ja E) – A-sait seob valgusünteesi käigus aminoatsüül-tRNA-d, P-sait seob translatsiooni käigus tRNA-d, mis osalevad mRNA-ga koodon-antikoodon paardumises, ja E-sait on tRNA vabanemiskoht ribosoomist (Graifer ja Karpova, 2015).

Ribosoomi 40S ja 60S alaühikutes asuvad ribosoomi funktsionaalsed keskused. 40S alaühiku funktsionaalseks keskuseks on dekodeerimise keskus, kus määratakse seonduv aminoatsüül-tRNA (Graifer ja Karpova, 2015; Rabl jt., 2011; Susorov jt., 2025). Seetõttu on 40S alaühiku peamine funktsioon mRNA-ga seondumine ja tRNA-mRNA korrektse paardumise tagamine startkoodonil (Graifer ja Karpova, 2015; Susorov jt., 2025). Peptidüültransferaasi keskus ehk PTC on 60S alaühiku funktsionaalseks keskuseks, kus katalüüsitakse kasvava polüpeptiidahela peptiidsideme moodustumist vastavalt mRNA koodonitele (Kisly ja Tamm, 2023).

Terviklik 80S ribosoom moodustub alaühikute vaheliste kontaktide ehk sildade loomisel (Ben-Shem jt., 2011). *S. cerevisiae* ribosoomis on kokku 17 alaühikute vahelist silda, millest viis on omased eukarüootidele (eB8, eB11, eB12, eB13 ja eB14) (Ben-Shem jt., 2011). Molekulaarbioloogia õppetoolis on varasemalt uuritud neist kolme: eB12, eB13 ja eB14.



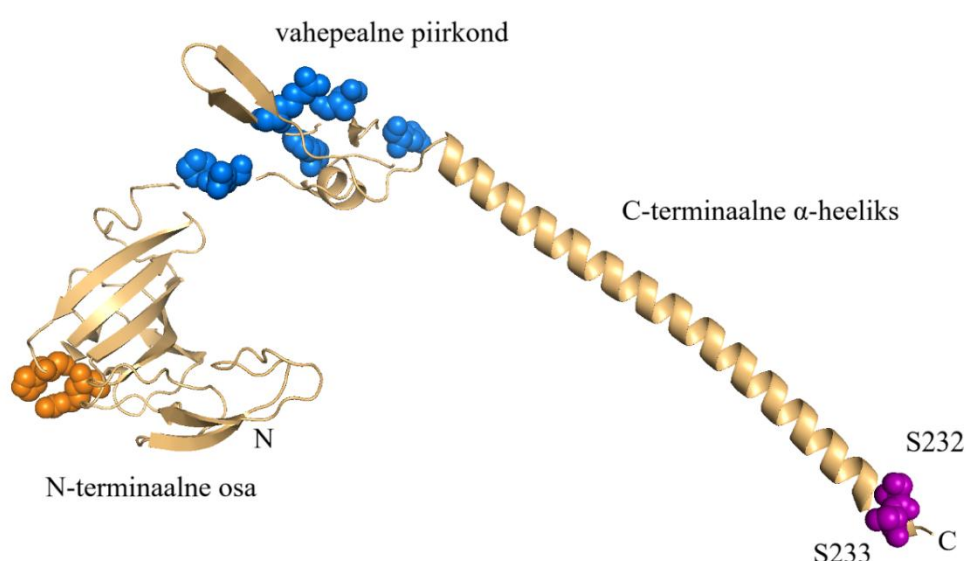
Joonis 1. *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosoom. Helesinisega on eristatud ribosoomi 60S alaühik ja halliga ribosoomi 40S alaühik. Kollasega on eristatud valk eS6, sinisega eL24 ja oranžiga uL3. Joonise tegemisel on kasutatud *S. cerevisiae* 80S ribosoomi struktuuri (PDB koordinaadid 4V88) (Ben-Shem jt., 2011) ning PyMOL programmi (Schrödinger, LLC, 2024). Autor: Analiis Veeremaa.

1.1.1. Ribosoomi sild eB13 ja ribosomaalne valk eS6

Eukarüootidele spetsiifiline ribosoomi sild eB13 moodustub 40S alaühiku valgu eS6 ning 60S alaühiku valkude uL3 ja eL24 interaktsioonil (Joonis 1) (Ben-Shem jt., 2011). eB13 silla olulisust on varem uuritud, kasutades *S. cerevisiae* tüve, mille ribosoomides ei teki eB13 silda valgu eL24 C-terminaalse deletsiooni tõttu (Kisly jt., 2019). Leiti ka, et sild eB13 ja selle moodustamises osalev valk eL24 on olulised translatsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni etappides ning vajalikud nende etappide efektiivseks toimumiseks (Kisly jt., 2019). eB13 silla valgu eL24 deletsiooniga rakkudes väheneb globaalne translatsioon 40% võrra, mis näitab eB13 silla korrektse moodustumise tähtsust translatsioonis (Kisly jt., 2019).

eB13 sillal asuv valk eL24 interakteerub palju ka ribosomaalse valguga eS6, mis on spetsiifiline eukarüootidele ja arhedele (Joonis 1 ja 2) (Kisly ja Tamm, 2023). Struktuurselt paikneb eS6 40S alaühiku paremas ja vasakus jalas (Joonis 1) (Rabl jt., 2011). eS6 valk on 236 aminohapet pikk ning koosneb kolmest domeenist: N-terminaalne osa, vahepealne regioon ja C-terminaalne α -heeliks (Joonis 2). eS6 valku kodeerivad kaks paraloogset geeni, *RPS6A* ja *RPS6B* (Byrne ja Wolfe, 2005). Kuigi eS6A ja eS6B aminohappejärjestused on identsed, erinevad nende post-

translatsiooniliste modifikatsioonide mustrid (*Saccharomyces Genome Database*, 2026). Ribosoomi valgu eS6 kohta on avaldatud vähe teadustulemusi. Uuritud on eelkõige eS6 C-terminaalses α -heeliksis paiknevaid post-translatsiooniliselt modifitseeritavaid seriine positsioonidel 232 ja 233 (Joonis 2). Analüüsides *S. cerevisiae* tüve rakke, kus eS6 seriinid 232 ja 233 olid asendatudalaniinidega, leiti, et seriine fosforüülitakse rapamütsiini sihtmärgi komplekside (TOR) (ingl *target of rapamycin*) TORC1 ja TORC2 poolt (Yerlikaya jt., 2016). TOR-kompleksid tagavad rakkude kohanemise keskkonnatingimustega, reguleerides transkriptsiooni ja muid kasvuga seotud protsesse (Yerlikaya jt., 2016). Seriinide S232 ja S233 modifitseerimise täpne funktsioon on aga endiselt ebaselge.



Joonis 2. *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi valgu eS6 struktuur. eS6 jaotub struktuurselt kolmeks domeeniks: N-terminaalne osa, vahepealne piirkond ja C-terminaalne α -heeliks. Oranžiga on eristatud aminohapped, mis interakteeruvad valguga uL3 ja sinisega on eristatud aminohapped, mis interakteeruvad valguga eL24. Lillaga on eristatud aminohapped S232 ja S233, mida modifitseeritakse post-translatsiooniliselt. *S. cerevisiae* ribosoomi eS6 valgu struktuur ennustati *AlphaFold 3* abil (Abramson jt., 2024). Struktuur visualiseeriti kasutades *PyMOL* programmi (Schrödinger, LLC, 2024). Autor: Analiis Veeremaa.

1.2. Translatsioon

Translatsiooni toimumiseks vajavad rakud ribosome, transleeritavat mRNA-d ja erinevaid translatsioonis osalevaid faktoreid. Translatsioon koosneb mitmest erinevast etapist: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosoomide taaskasutus (Hershey jt., 2012). Nende etappide käigus seondub ribosoom mRNA-ga, sünteesib polüpeptiidahela ning vabaneb seejärel mRNA-lt. Kõigi etappide korrektseks toimumiseks on vajalikud translatsioonifaktorid, mis jagunevad initsiatsioonifaktoriteks (eIF), elongatsioonifaktoriteks (eEF), terminatsioonifaktoriteks (eRF) ja taaskasutusfaktoriteks (Melnikov jt., 2012). Lähtudes translatsiooni initsiatsiooni mehhanismist, saab translatsiooni jagada kaheks: klassikaline ehk *cap*-sõltuv initsiatsioon ja alternatiivne initsiatsioon. Mehhanismi valik sõltub suuresti mRNA struktuurist ning sellest, milliseid translatsioonifaktoreid vajatakse.

1.2.1. Eukarüootne mRNA

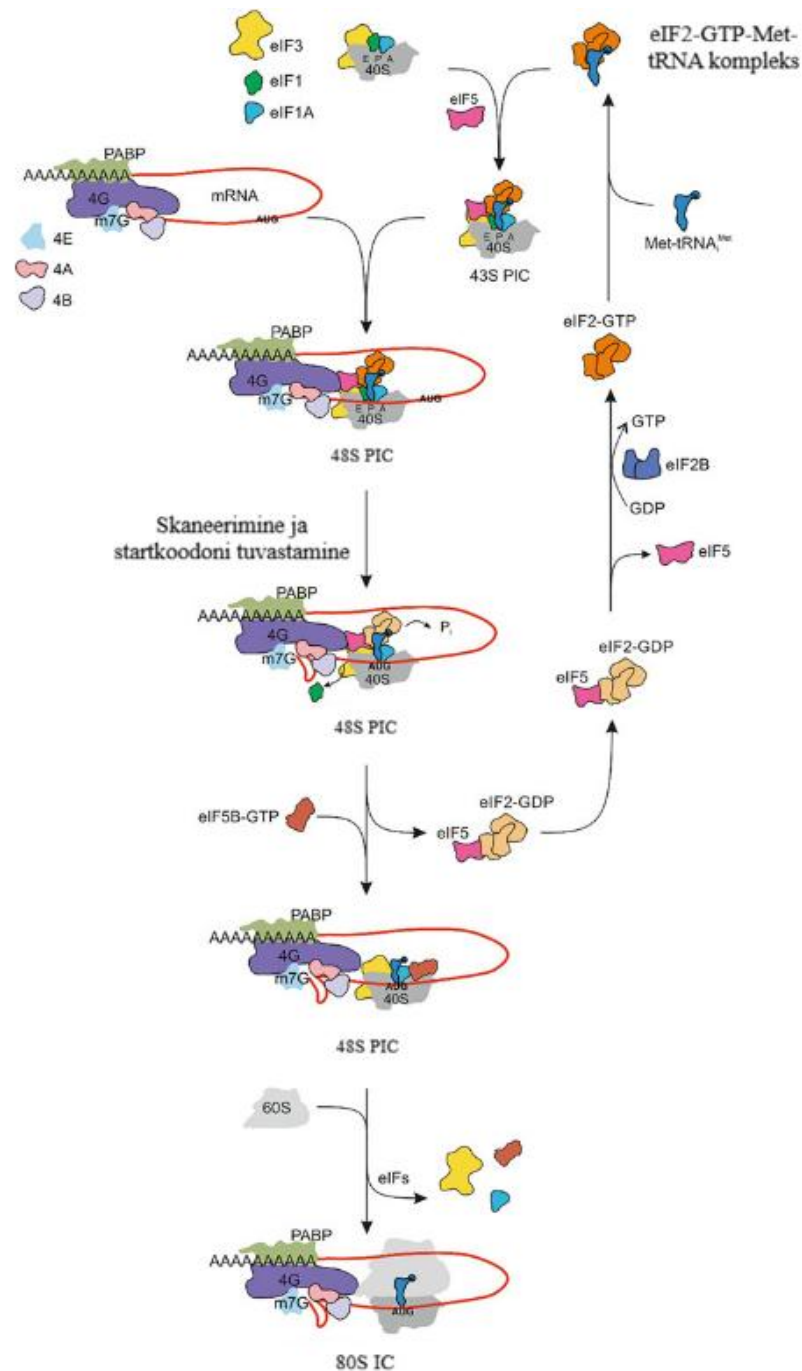
Eukarüootne mRNA koosneb 5' *cap*-struktuurist, 5' mittetransleeruvast alast (UTR) (ingl *untranslated region*), avatud lugemisraamist (ORF) (ingl *open reading frame*), 3' UTR-ist ja polü(A)-sabast (Babendure jt., 2006; Biziaev jt., 2024; Calvo jt., 2009; S. F. Mitchell jt., 2010). Tavaliselt sisaldavad eukarüootsed mRNA-d ainult ühte ORF-i (Iacono jt., 2005).

5' *cap*-struktuur koosneb 7-metüülguanosiinist, mis vahendab ribosoomi seondumist mRNA-le eIF-te kaudu (Mitchell jt., 2010). Polü(A)-saba koosneb järjestikest adensiinidest ning sellega seonduvad polü(A)-siduvad valgud ehk PABP perekonna valgud (ingl *poly(A)-binding protein*) (Biziaev jt., 2024). Polü(A)-saba kaitseb mRNA-d degradeerimise eest ning osaleb translatsiooni regulatsioonis koos PABP-valkudega (Biziaev jt., 2024). Edukaks translatsiooni protsessiks peab ribosoom ära tundma mRNA-l oleva startkoodoni ning terminatsiooniks stoppkoodoni (Calvo jt., 2009).

1.2.2. Klassikaline translatsiooni initsiatsioon

Klassikalise translatsiooni initsiatsiooni protsessi jagatakse omakorda erinevateks etappideks: kolmikkompleksi (ingl *ternary complex*) moodustumine, pre-initsiatsioonikompleksi (PIC) (ingl *pre-initiation complex*) moodustumine, mRNA suletud silmuse struktuuri teke, mRNA skaneerimine ning 80S initsiatsioonikompleksi (IC) moodustumine (Joonis 3) (Melnikov jt., 2012).

Initsiatsiooni algul moodustub kolmikkompleks, mis koosneb eIF2-GTP-st ja Met-tRNA_i-st (Kapp ja Lorsch, 2004). Kolmikkompleks seondub ribosoomi 40S alaühikuga, peale mida seonduvad eIF1, eIF1A, eIF3 ja eIF5, moodustades 43S PIC-i (Asano jt., 2000; Pisarev jt., 2007). eIF2 positsioneerib Met-tRNA_i 40S alaühiku P-saiti (Kapp ja Lorsch, 2004). Paralleelselt 43S PIC moodustumisega seondub mRNA 5' *cap*-struktuurile eIF4F kompleks, mis koosneb eIF4A, eIF4E ja eIF4G-st (Craig jt., 1998; Tarun ja Sachs, 1996; Wells jt., 1998). eIF4A on vajalik mRNA 5' UTR-is olevate struktuuride lahutamiseks, eIF4E seondub mRNA 5' *cap*-struktuuriga ning eIF4G seondub polü(A)-sabaga läbi PABP-valkude, moodustades mRNA suletud silmuse struktuuri (Craig jt., 1998; Imataka jt., 1998; Kumar jt., 2016). 43S PIC seondub mRNA-ga eIF4F kompleksi vahendusel ning moodustub 48S PIC (Wells jt., 1998). Startkoodoni tuvastamiseks skaneerib 48S PIC avatud konformatsioonis mRNA-l 5'-3' suunas kuni esimese sobivas kontekstis AUG-koodonini (Merrick ja Pavitt, 2018). Koodon-antikoodon paardumise järel indutseeritakse eIF2-GTP hüdroolüüs eIF5G poolt (Algire jt., 2005; Merrick ja Pavitt, 2018). Selle tulemusel vabanevad kompleksist eIF2-GDP, fosfaat (P_i) ja eIF1, mille järel muutub 48S PIC konformatsioon suletuks (Algire jt., 2005; Merrick ja Pavitt, 2018). Järgnevalt seondub 48S PIC-ga eIF5B-GTP, mille hüdroolüüsi toimetel liitub kompleksiga 60S alaühik (Marintchev jt., 2003). Vabanevad eIF5B-GDP ja eIF1A ning moodustub 80S IC, mis on valmis alustama elongatsiooni etappi (Marintchev jt., 2003).



Joonis 3. Klassikaline translatsiooni initsiatsioon eukarüootides. 43S pre-initsiatsioonikompleks (PIC) (ingl *pre-initiation complex*) moodustub kolmikkompleksist (eIF2-GTP ja Met-tRNA_i) ning eukarüootsetest initsiatsioonifaktoritest (eIF) 1, 1A, 3 ja 5. Paralleelselt toimub mRNA suletud silmuse struktuuri teke eIF4F kompleksi seondumisega mRNA *cap*-struktuurile. eIF4F koosneb eIF4E, eIF4A ja eIF4G-st. 43S PIC seondub mRNA-ga läbi eIF4F kompleksi ning moodustub 48S PIC. 48S PIC skaneerib mRNA-d kuni esimese sobivas kontekstis paikneva startkoodonini. Toimub koodon-antikoodon paardumine, mille järel 48S PIC muutub suletud konformatsiooni, mille käigus vabanevad kompleksist eIF2-GDP, fosfaat (P_i) ja eIF1. 60S alaühiku seondumine kompleksile indutseeritakse eIF5B-GTP hüdrolüüsi toimeel. Vabanevad eIF5B-GDP ja eIF1A ning moodustub elongatsioonikompetentne 80S initsiatsioonikompleks (IC). Modifitseeritud artiklist Blanchet ja Ranjan, 2022.

1.2.3. Alternatiivne translatsiooni initsiatsioon

Klassikaline translatsiooni initsiatsioon sõltub mitmetest initsiatsioonifaktoritest, eeldab mRNA 5' *cap*-struktuuri olemasolu ja mRNA-l skaneerimist (Joonis 3) (Melnikov jt., 2012). Seetõttu on see rakule piirav ja energiakulukas protsess. Stressitingimustes on translatsiooni initsiatsiooniks vajalike faktorite kättesaadavus sageli limiteeritud ja klassikaline translatsiooni initsiatsioon seega inhibeeritud (Faye ja Holcik, 2015; Landry jt., 2009; Uchida jt., 2002). Sellisel juhul saab translatsioon edukalt jätkuda alternatiivsete translatsiooni initsiatsiooni mehhanismide kaudu, mille üheks näiteks on sisemise ribosoomi seondumise koha (IRES) (ingl *internal ribosome entry site*) vahendatud translatsioon (Merrick ja Pavitt, 2018; Tidu ja Martin, 2024).

IRES on mRNA-s esinev kompleksne struktuur, mille vahendusel saab translatsioon alata 5' *cap*-struktuurist sõltumatult (Yamamoto jt., 2015). IRES-struktuuriga mRNA on võimeline ribosoomiga seonduma kasutades vaid valitud eIF-e (Abaeva jt., 2023). Sõltuvalt IRES-i tüübist võivad translatsiooniks olla vajalikud ka IRES-spetsiifilised abistavad faktorid (ITAF) (ingl *IRES trans-acting factors*), mis vahendavad ribosoomi seondumist IRES struktuuriga mRNA-le (Abaeva jt., 2020; Evans jt., 2003; S. A. Mitchell jt., 2003; Pickering jt., 2003; Yamamoto jt., 2015). Seega, olukorras kus *cap*-sõltuv translatsiooni initsiatsioon on stressitingimuste tõttu inhibeeritud, saab IRES-vahendatud translatsioon siiski alata (Faye ja Holcik, 2015; Landry jt., 2009; Uchida jt., 2002). Kuigi mRNA-ga seondumise mehhanismi ja selles osalevad faktoreid jätkuvalt uuritakse, viitavad olemasolevad teadmised mitmele võimalikule toimemehhanismile.

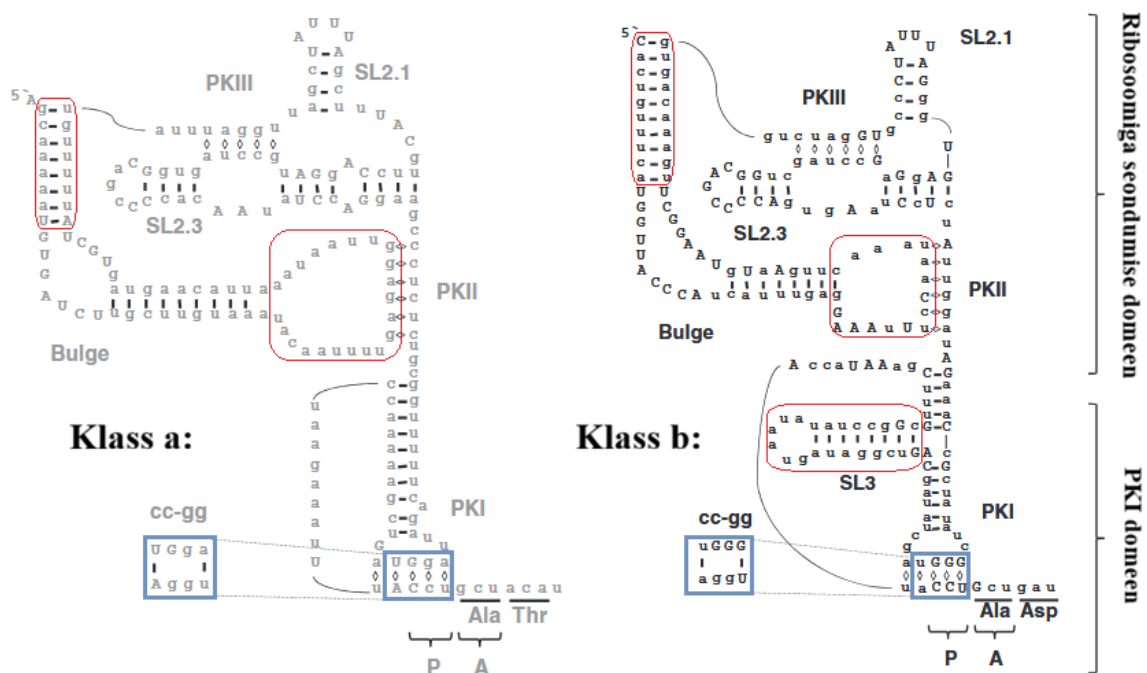
1.2.1. IGR IRES

IRES-struktuure esineb nii eukarüootsetes kui ka viiruslikes RNA-des (Hashem ja Frank, 2018; Landry jt., 2009; Leppek jt., 2018). Viiruslikud IRES-id jaotatakse vastavalt struktuuri, abistavate faktorite või eIF-de vajaduse alusel kuueks tüübiks (Abaeva jt., 2023; Li jt., 2024). Tüüp 6 IRES-eid nimetatakse geenidevahelise piirkonna IRES-teks (IGR IRES) (ingl *intergenic region*), kuna need paiknevad viiruse genoomis kahe geeni vahel (Nakashima ja Uchiumi, 2009). IGR IRES-järjestused on omased *Dicistroviridae* sugukonna viirustele, mille genoom on pluss-suunaline üksikahelaline RNA (ssRNA) (Nakashima ja Uchiumi, 2009). Nende viiruste genoomis on kaks ORF-i, mille translatsioon toimub kahe erineva IRES-i vahendusel: esimene ORF sünteesitakse 5' UTR-is paikneva IRES-i vahendusel, teine ORF sünteesitakse aga geenidevahelise IGR IRES-i vahendusel (Nakashima ja Uchiumi, 2009).

1.2.2. IGR IRES struktuur

IGR IRES-järjestus on ligikaudu 200 nukleotiidi pikk (Mailliot ja Martin, 2018). Struktuurselt jagatakse IGR IRES kolmeks regiooniks, mis kõik moodustuvad pseudosõlme (PK) (ingl *pseudoknot*) ja juuksenõelastruktuuride (SL) (ingl *stem-loop*) kombinatsioonidest (Joonis 4) (Jan ja Sarnow, 2002a; Nakashima ja Uchiumi, 2009). Regioon I moodustub PKII-st ja kahest juuksenõelastruktuurist SL2.1 ja SL2.3 (Joonis 4). Regioon II moodustub PKIII-st ja regioon III PKI-st (Joonis 4). Funktsiooni järgi jagatakse IGR IRES kaheks domeeniks: ribosoomiga seondumise domeen ja tRNA mimikeerimise domeen (Joonis 4) (Hertz ja Thompson, 2011). Regioon I ja II moodustavad ribosoomiga seonduva domeeni ning interakteeruvad valkudega eS25, uS7 ja S11 (Abaeva jt., 2020; Costantino ja Kieft, 2005; Fernández jt., 2014; Hertz ja Thompson, 2011; Landry jt., 2009). Regioon III moodustab omaette PKI-domeeni, mis mimikeerib koodon-antikoodon interaktsiooni translatsiooni initsiatsioonis (Au jt., 2015; Costantino ja Kieft, 2005). Vastupidiselt klassikalisele initsiatsioonile, mis kasutab AUG-startkoodonit, kasutavad enamik IGR IRES-id startkoodoninaalani koodoneid (GCU, GCC, GCA ja GCG) (Abaeva jt., 2023; Hertz ja Thompson, 2011).

Tüüp 6 IGR IRES-id jaotatakse omakorda struktuuri alusel a- ja b-klassideks (Joonis 4) (Nakashima ja Uchiumi, 2009). A-klassi IGR IRES-idel on võrreldes b-klassiga lühem 5'-terminaalne järjestus ja pikemad PKII struktuuri järjestused (Hertz ja Thompson, 2011; Pfingsten jt., 2007). Lisaks puudub a-klassi IGR IRES-idel b-klassile iseloomulik juuksenõelastruktuur SL3 regiooni III piirkonnas (Hertz ja Thompson, 2011; Pfingsten jt., 2007).

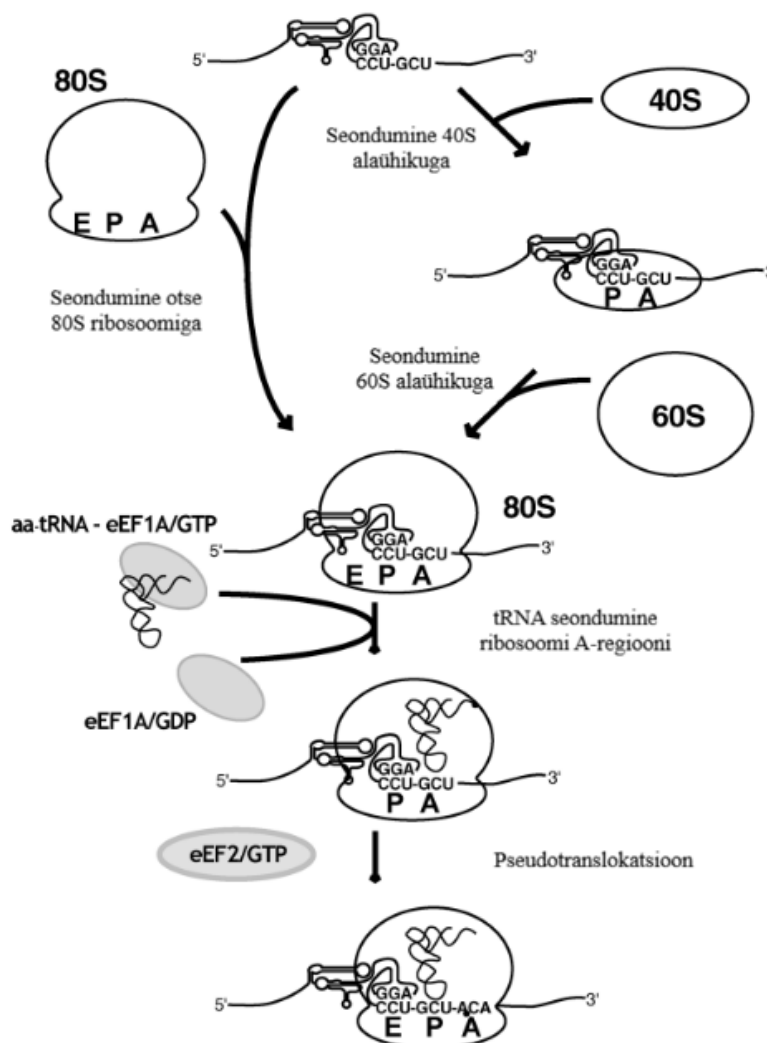


Joonis 4. 6a ja 6b klassi IGR IRES-de sekundaarstruktuurid. IGR IRES moodustub pseudosõlme (PK) (ingl *pseudoknot*) ja juuksenõelastruktuuride (SL) (ingl *stem-loop*) kombinatsioonist (Jan ja Sarnow, 2002a; Nakashima ja Uchiumi, 2009). IGR IRES-struktuur jaguneb funktsiooni alusel kaheks domeeniks: ribosoomiga seondumise domeen ja PKI-domeen. Ribosoomiga seondumise domeen sisaldab PKII-, PKIII-, SL2.1- ja SL2.3-struktuure ning b-klassis ka SL3-struktuuri. PKI domeen sisaldab PKI struktuuri. Starkoodonina kasutavad IGR IRES-id enamastialaniini koodonit (GCU). Sinisega on eristatud mutatsioonid IGR IRES-järjestuses, mille tõttu PKI-struktuuri ei moodustu. Halli ja mustana on vastavalt eristatud a-klassi ja b-klassi IGR IRES-te sekundaarstruktuure. Punaste kastidega on eristatud IGR IRES klasside vahelised erinevused sekundaarstruktuuris. Modifitseeritud artiklist Hertz ja Thompson, 2011.

1.2.3. IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon

IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon algab IRES-domeeni seondumisega ribosoomi 40S alaühikuga, moodustades 40S-IGR IRES kompleksi, milleks pole vaja eIF-e (Joonis 5) (Fernández jt., 2014; Wilson, Pestova, jt., 2000). PKI-struktuur asetub ribosoomi A-saiti ilma mRNA-l skaneerimiseta, imiteerides koodon-antikoodon interaktsiooni (Au ja Jan, 2012; Fernández jt., 2014). Seejärel seondub kompleksiga 60S alaühik ning moodustub 80S ribosoomikompleks (Petrov jt., 2016). Järgnevalt seondub 80S ribosoomi A-saiti eEF1-GTP-tRNA^{Ala} (Wilson, Powell, jt., 2000). Toimub pseudotranslokatsioon, mis on translokatsioonilaadne protsess, mille jooksul liigub tRNA või tRNA-d mimikeeriv struktuur ühest saidist teise peptiidsideme moodustumiseta (Wilson, Pestova, jt., 2000). Pseudotranslokatsiooni käigus liigub IGR IRES-struktuuri PKI-domeen P-saidist E-saiti ja tRNA^{Ala} liigub A-saidist P-saiti (Joonis 5) (Fernández jt., 2014; Wilson, Pestova, jt., 2000). Peale seda vabaneb ribosoomi A-sait järgneva tRNA seondumiseks ning ribosoom on valmis

elongatsiooni etapiks. Kuigi IGR IRES-vahendatud translatsiooni põhimehhanism on üldjoontes kirjeldatud, ei ole kõik selle detailid täielikult selged. Seda mehhanismi on võrreldud klassikalise translatsiooni initsiatsiooniga mitmete erinevate mudelite alusel.



Joonis 5. IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon. Esmalt seondub geenidevahelise piirkonna sisemine ribosoomi seondumise kohaga (IGR IRES) (ingl *intergenic region internal ribosome entry site*) mRNA 40S alaühikuga, mille järel seondub 60S alaühik. Alternatiivselt võib IGR IRES struktuuriga mRNA seonduda ka otse assambleeritud 80S ribosoomiga. Kui IGR IRES on seondunud 80S ribosoomiga, seondub ribosoomi A-saiti tRNA^{Ala} GTP hüdrolüüsi toimel, peale mida toimub pseudotranslokatsioon. Pseudotranslokatsiooni käigus liigub PKI-domeen P-saidist E-saiti ning tRNA^{Ala} liigub A-saidist P-saiti. Vabanenud ribosoomi A-saiti saab nüüd seonduda tRNA, mis on translatsiooni elongatsiooni etapi alustamise eelduseks. Modifitseeritud artiklist Pisarev jt., 2005.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Klassikaline translatsiooni initsiatsioon eeldab mRNA 5' *cap*-struktuuri olemasolu ning mitmete translatsiooni initsiatsioonifaktorite osalust (Joonis 3). Stressitingimustes aga on initsiatsioonifaktorite kättesaadavus limiteeritud, mistõttu on klassikaline translatsioon inhibeeritud (Komar ja Hatzoglou, 2011). IGR IRES-vahendatud translatsioon seevastu ei sõltu initsiatsioonifaktorite olemasolust ega skaneerimisest mRNA-l – ribosoom seondub mRNA-ga otse ning pärast pseudotranslokatsiooni alustatakse translatsiooni elongatsiooni etappi (Jackson jt., 2010). Molekulaarbioloogia õppetoolis on IRES-vahendatud translatsiooni varasemalt uuritud ning on leitud, et ribosoomi eukarüoodispetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumisel on IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon aktiivsem võrreldes metsiktüüpi rakkudega (avaldamata andmed). Sellest tulenevalt valiti uurimiseks *S. cerevisiae* ribosoomi eB13 silla moodustamises osalev valk eS6. Uurimaks, milline roll on ribosoomi valgul eS6 IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis, loodi selle töö raames *S. cerevisiae* kontrolltüvi $\Delta rps6AB$ -pA ($\Delta rps6A \Delta rps6B$ [pRPS6A]), mille konstrueeris prof. Tiina Tamm. Kontrolltüve $\Delta rps6AB$ -pA genoomist on deleteeritud eS6 valku kodeerivad paraloogsed geenid *RPS6A* ja *RPS6B*, mida kompenseeriti *RPS6A*-d ekspresseeriva plasmiidiga. Kontrolltüvi võimaldab tulevikus uurida eS6 valgu rolli IRES-vahendatud translatsioonis.

Käesoleva töö eesmärk:

- a) Määrata *S. cerevisiae* tüve $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiirus rikkas ja selektiivsöötmes;
- b) Määrata erinevatest viirustest pärit IGR IRES-järjestuste vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsused *S. cerevisiae* tüves $\Delta rps6AB$ -pA.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud tüved

Töös kasutatud *S. cerevisiae* tüved:

- TYSC309 ehk metsiktüüp (WT) [*MATa ura3-52 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 trp1 Δ 36 Δ arg4 Δ lys1*] (Kisly jt., 2019)

- TYSC968 ehk kontrolltüvi ($\Delta rps6AB$ -pA) [*MATa ura3-52 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 trp1 Δ 36 $\Delta arg4 \Delta lys1 \Delta rps6A:: kanMX6/\Delta rps6B:: kanMX6 [pRS315-RPS6A]$]* (konstrueeritud prof. Tiina Tamm poolt)

2.2.2. Kasutatud söötmed

S. cerevisiae rakkude kasvatamisel kasutati:

- YPD (ingl *yeast extract, peptone, dextrose*) söödet (1% Bacto pärmiekstrakt, 2% Bacto peptoon, 2% glükoos)
- Selektiivset SC-Ura (ingl *synthetic complete*) täissöödet (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu (puriinid ja pürimidiinid), millest puudus uratsiil)
- Selektiivset SC-His täissöödet (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu (puriinid ja pürimidiinid), millest puudus histidiin)
- Selektiivset SC-Leu täissöödet (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu (puriinid ja pürimidiinid), millest puudus leutsiin)

Tardsöötmete valmistamiseks lisati söötlele 2% agarit. *S. cerevisiae* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C.

2.2.3. Kasutatud plasmiidid

Tabel 1. Töös kasutatud plasmiidid ja nende päritolu.

Plasmidi nimi	Päritolu	Markergeen
pRPS315	Labori kollektsioon	<i>LEU2</i>
Kahe lutsiferaasi reportersüsteemil põhinevad plasmiidid:		
pRS426-CrPV	Labori kollektsioon	<i>URA3</i>
pRS426-CrPV (ΔPKI cc-gg)	Labori kollektsioon	<i>URA3</i>
pSRT338-PSIV	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>
pSRT338-PSIV (ΔPKI cu-ga)	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>
pSRT338-SINV-1	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>
pSRT338-SINV-1 (ΔPKI cc-gg)	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>
pSRT338-KBV	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>
pSRT338-KBV (ΔPKI cc-gg)	(Hertz ja Thompson, 2011)	<i>HIS3</i>

2.2.4. *S. cerevisiae* rakkude transformeerimine liitiumatsetaadi (LiOAc) meetodil

S. cerevisiae tüvede TYSC309 (WT) või TYSC968 (Δ rps6AB-pA) üksikkoloonia külvati YPD vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö loksutades (180 rpm) 30°C juures. Kultuur lahjendati järgmisel hommikul värskesse YPD söötmesse ning rakke kasvatati eksponentsiaalse kasvufaasini ($OD_{600} = 0,6-0,8$). Rakud koguti tsentrifuugimise teel (2100 g, 2 min, RT) ning pesti 25 ml steriilse H₂O ja 25 ml LiOAc-TE lahusega (100 mM LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)). Rakud suspendeeriti 300 μ l LiOAc-TE lahuses ning suspensioonile lisati 50 μ g denatureeritud lõhe spermi *carrier* DNA-d. 50 μ l kompetentsetele rakkudele lisati ligikaudu 0,45 μ g plasmiidset DNA-d (SINV-1, SINV-1 cc-gg, KBV, KBV cc-gg, PSIV, PSIV cu-ga, CrPV või CrPV cc-gg) ning segu inkubeeriti toatemperatuuril 15 min. Seejärel lisati 300 μ l PEG-LiOAc-TE (40% PEG 4000, 1x LiOAc-TE) ja inkubeeriti veel 15 min RT. LTransformatsiooniseigule lisati 30 μ l dimetüülsulfoksiidi (DMSO), proov segati *vortexil* ning inkubeeriti 42 °C juures 10 min. Rakud koguti tsentrifuugimise teel (860 g, 3 min, RT) ja suspendeeriti 200 μ l steriilses H₂O-s. Transformandid külvati vastava aukuotroofse markeriga selektiivsöötmele plaadile: CrPV ja CrPV cc-gg plasmiidide puhul söötmele, millest puudus uratsiil; PSIV, PSIV cu-ga, KBV, KBV cc-gg, SINV-1 ja SINV-1 cc-gg puhul söötmele, millest puudus histidiin. Kasvukiiruste hindamiseks külvati pRS315 plasmiidiga transformeeritud metsiktüüpi rakud (WT-p) ja Δ rps6AB-pA rakud selektiivsöötmele, millest puudus leutsiin. Transformante inkubeeriti 30 °C juures 3 kuni 5 päeva.

2.2.5. *S. cerevisiae* rakkude kasvukiiruse mõõtmine

WT-p või Δ rps6AB-pA üksikkoloonia külvati 3 ml YPD või SC-Leu vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö 30 °C juures loksutades (180 rpm). Hommikul lahjendati kultuur värskesse söötmesse kuni $OD_{600} = 0,15$. Rakkude kasvukiirus mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga (*POLARstar Omega*, *BMG LABTECH*), kasutades läbipaistvat 96-kannulist mikrotiiterplaati (*Cellstar*). Optilise tiheduse mõõtmised tehti lainepikkusel 600 nm, kasutades 120 μ l kultuuri igas kannus. Mõõtmised tehti 30 °C juures 20 h vältel. Mõõtmisprogramm koosnes 20 minutistest tsüklitest, mis hõlmas 100 s loksutamist, mille järgnes 25 s ooteaeg. Optilise tiheduse mõõtmiste taustväärtuste määramiseks kasutati YPD ja SC-Leu vedelsöötmeid ilma rakkudeta. WT-p ja Δ rps6AB-pA rakkude kasvukiiruse hindamiseks nii YPD kui ka SC-Leu vedelsöötmes analüüsiti kuut bioloogilist replikaati.

2.2.5.1. *S. cerevisiae* rakkude kasvukiiruste andmete analüüs

Kultuuride optiliste tiheduste põhjal määratud kasvukõverate analüüs viidi läbi kasutades *Microsoft Excel* programmi. Esmalt lahutati iga kultuuri optilise tiheduse mõõtmest maha taustväärtus, mis määrati YPD ja SC-Leu vedelsöötmete kontrolliproovidest. Generatsiooniajad arvutati eksponentsiaalses kasvufaasis mõõdetud optiliste tiheduste põhjal, kus logaritmiliselt skaalalt leiti kasvukõvera sirgjooneline lõik ning selle sirge suurim tõus kasutati kasvukiiruse määramiseks. Generatsiooniajad WT-p ja Δ rps6AB-pA tüve rakkudel arvutati valemi järgi: $\ln = 2/\text{tõus}$. Kasvukõverad esitati igas ajapunktis mõõdetud optilise tiheduse keskmiste väärtuste järgi. Väärtustele arvutati ka standardhälved. Statistiline olulisus määrati kasutades *Student*'i *t*-testiga, kus $p < 0,05$.

2.2.6. *S. cerevisiae* rakkude IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsuste mõõtmine

S. cerevisiae Δ rps6AB-pA üksikkoloonia külvati 3 ml-sse SC-Ura või SC-His vedelsöötmesse ning kasvatati üleöö 30 °C juures loksutades (180 rpm). Hommikul lahjendati kultuurid 15 ml värskesse söötmesse ja kasvatati kuni $OD_{600} = 0,8$. Järgnevad katseetapid modifitseeritud ning põhinevad *Promega Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* protokollist. *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaaside aktiivsused mõõdeti mikrotiiterplaatilugejaga (*Infinite M200 PRO*, *TECAN*) kasutades valget 96-kannulist mikrotiiterplaati (*Greiner BIO-ONE*). Mõõtmised tehti temperatuuril 25 °C integratsiooniajaga 10 000 ms. Iga kultuuri kohta koguti üks OD_{600} ühik rakke tsentrifuugimise teel (16 000 g, RT, 30 s), millele lisati 100 µl ühekordset passiivset lüüsipuhvrit. Proove segati *vortexil* 15 s ja inkubeeriti RT 1 min. *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse (*Fluc*) mõõtmiseks kanti mikrotiiterplaadi ühte kannu 8 µl rakulüsaati, millele lisati 40 µl *LARII* substraati. Reaktsioonisegust valmistati seejärel lüüsipuhvrissse 1000-kordne lahjendus. *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse (*Rluc*) mõõtmiseks kanti uude mikrotiiterplaadi kannu 48 µl lahjendatud reaktsiooniseguga, millele lisati 40 µl *Stop and Glow* reagenti ja mõõdeti. Iga plasmidi kohta analüüsiti vähemalt 12 bioloogilist replikaati.

2.2.6.1. *S. cerevisiae* rakkude IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsuste andmete analüüs

Renilla ja *Firefly* lutsiferaaside mõõtmiste analüüs viidi läbi *Microsoft Excel* programmis. *Firefly* (*Fluc*) aktiivsuste normaliseerimiseks jagati väärtused *Renilla* (*Rluc*) väärtustega, saades tulemuseks suhtelise lutsiferaasi aktiivsuse (SLA). Mõõtmistulemustest ekstreemsete väärtuste tuvastamiseks kasutati interkvartiilse ulatuse meetodit (ingl *Interquartile Range (IQR) method*).

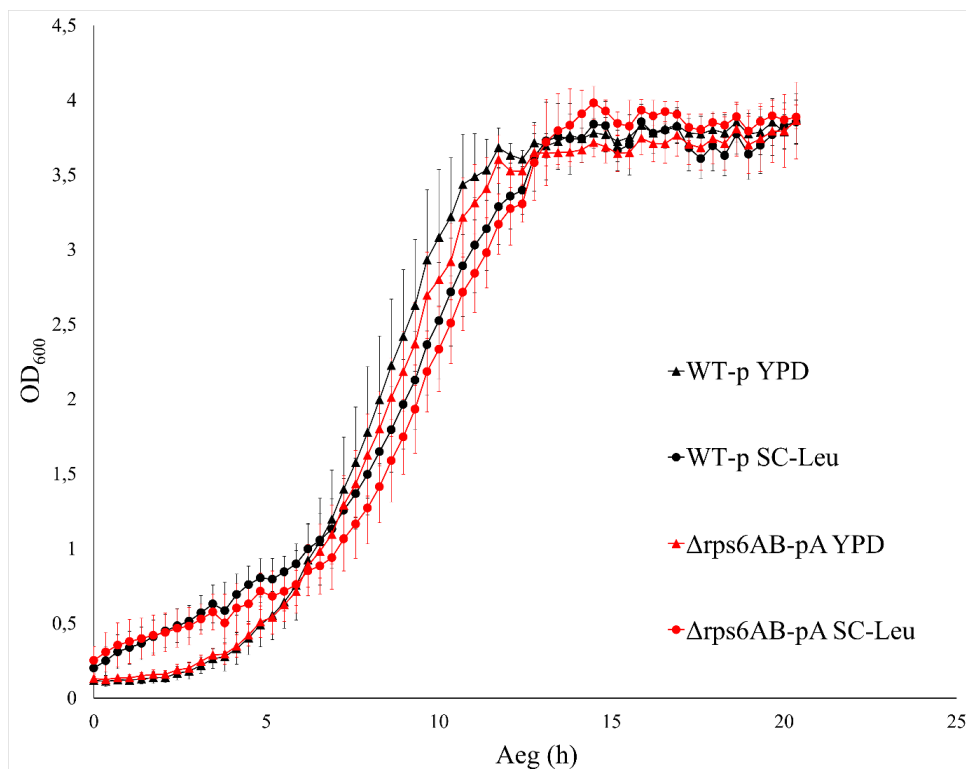
Järgnevalt arvutati normaliseeritud väärtustele keskmised ja standardhälbed. Metsiktüüpi IGR IRES-järjestustele määratud suhtelised aktiivsused esitati normaliseeritult CrPV metsiktüüpi IGR IRES-järjestustele määratud aktiivsuste suhtes. Mutantsetele IGR IRES-järjestustele määratud suhtelised aktiivsused normaliseeriti vastava viiruse metsiktüüpi IGR IRES-järjestusele määratud aktiivsuste suhtes. Statistiline olulisus määrati kasutades *Student'*i *t*-testiga, kus $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

2.3.1. *S. cerevisiae* plasmiidikompensatsiooniga rakkude kasvu hindamine

S. cerevisiae ribosoomi eB13 silla loomises osaleva valgu eS6 rolli hindamine IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis eeldab funktsionaalset *S. cerevisiae* tüve, milles on võimalik ekspresseerida modifitseeritud pikkusega ribosoomi eS6 valku. Selle eesmärgi saavutamiseks loodi *S. cerevisiae* tüvi $\Delta rps6AB$ -pA, mille genoomist on deleteeritud *RPS6A* ja *RPS6B* paraloogsed geenid (konstrueeritud prof. Tiina Tamm). Kuna *S. cerevisiae* $\Delta rps6A$ $\Delta rps6B$ topeltmutant ei ole eluvõimeline, kompenseeriti eS6 puudus plasmiidilt ekspresseeritava *RPS6A* geeniga (pRS315-RPS6A). *S. cerevisiae* tüve $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiiruse võrdlemisel metsiktüüpi rakkude kasvukiirusega võimaldab hinnata, kas plasmiidikompensatsiooniga tüvi sobib edasisteks analüüsideks ribosoomi valgu eS6 rolli uurimisel ning kas $\Delta rps6AB$ -pA sobib kontrolltüveks mutantse pagaripärmitüve vastu, mille rakkudes ekspresseeritakse modifitseeritud pikkusega eS6 valku.

Käesoleva töö esimene eesmärk oli määrata $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiirused rikkas söötmes (YPD) ja selektiivsöötmes, milles puudus leutsiin (SC-Leu). Kasvukiiruse mõõtmisel oli kaks alaeesmärki. Esiteks, hinnata kuidas mõjutab rakkude kasvu eS6 ekspressiooni kompenseerimine plasmiidilt. Teine alaeesmärk oli välja selgitada, kuidas mõjutab selektiivsöötmes kasvatamine $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiirust. Kontrollina kasutati metsiktüüpi rakke, millesse oli transformeeritud *RPS6A*-d ekspresseeriva plasmidi tühi vektor (WT-p).



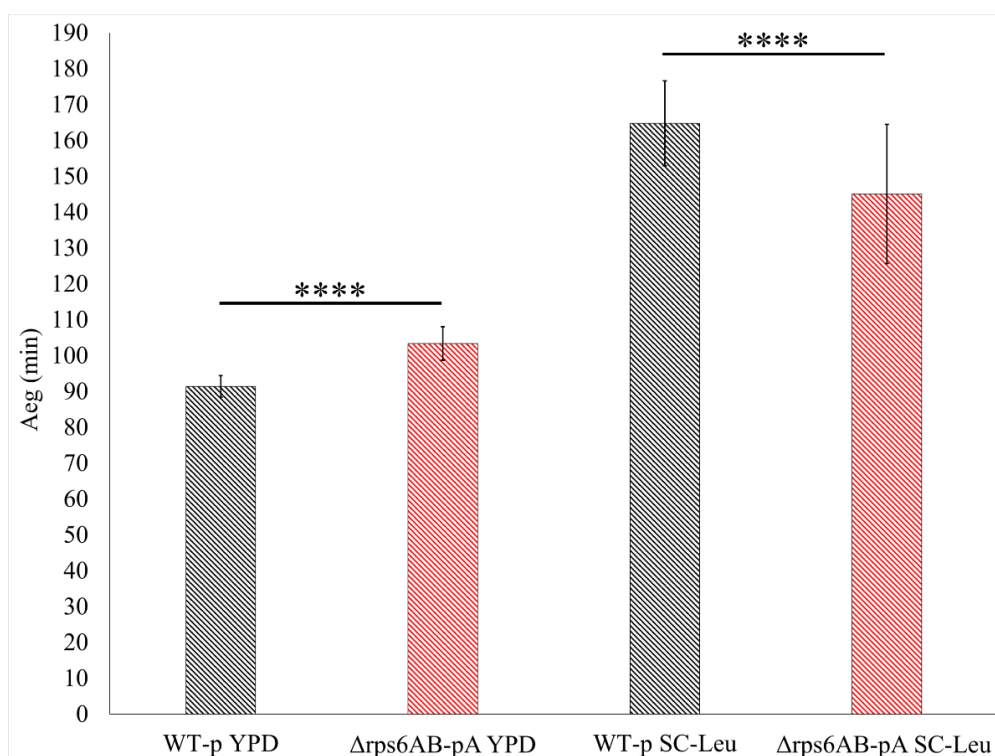
Joonis 6. *S. cerevisiae* tüvede rakkude kasv vedelsöötmetes. Optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 600 nm (OD_{600}). Andmed on esitatud ilma taustväärtusteta optiliste tiheduste keskmistena. WT-p rakud ja $\Delta rps6AB$ -pA rakud on eristatud vastavalt musta ja punasega. YPD ja SC-Leu sööde on tähistatud vastavalt kolmnurga ja ringi sümboliga. $n=6$.

$\Delta rps6AB$ -pA ja WT-p tüvede rakkude kasvukõverad on omavahel väga sarnased (Joonis 6). Rikkas söötmes kasvanud WT-p ja $\Delta rps6AB$ -pA rakkudel on tendents alustada eksponentsiaalset kasvufaasi varem kui selektiivsöötmes kasvanud rakkudel (Joonis 6). Nii $\Delta rps6AB$ -pA kui WT-p tüve rakud jõudsid mõlemas söötmes platoole samaaegselt (Joonis 6). Kasvukõverate abil määrati mõlema tüve rakkude generatsiooniaeg rikkas (YPD) ja selektiivsöötmes (SC-Leu). Generatsiooniajad arvutati valemi $\ln=2/tõus$ alusel, kus tõus määrati kasvukõverate logaritmilisel skaalal lineaarse lõigu suurima tõusu järgi. Rikkas söötmes oli WT-p rakkude generatsiooniaeg $91,4 \pm 3,03$ min ja $\Delta rps6AB$ -pA rakkudel $103,4 \pm 4,7$ min (Tabel 2). Seega on $\Delta rps6AB$ -pA rakkude generatsiooniaeg YPD söötmes võrreldes WT-p rakkudega YPD söötmes 1,14 korda aeglasem (Joonis 7). Selektiivsöötmes oli generatsiooniaeg WT-p rakkudel $164,8 \pm 11,8$ min ja $\Delta rps6AB$ -pA rakkudel $145,1 \pm 19,4$ min (Tabel 2). $\Delta rps6AB$ -pA tüve rakud kasvasid SC-Leu söötmes 1,14 korda kiiremini kui WT-p rakkudega SC-Leu söötmes (Joonis 7). SC-Leu selektiivsöötmes aeglustus nii WT-p kui $\Delta rps6AB$ -pA tüve rakkude kasv võrreldes WT-p rakkude kasvuga YPD söötmes.

Tabel 2. *S. cerevisiae* rakkude keskmised generatsiooniajad.

Rakud ja söötmed	Keskmine (min)	+/- stdev
WT-p YPD	91,4	3,03
$\Delta rps6AB$ -pA YPD	103,4	4,7
WT-p SC-Leu	164,8	11,8
$\Delta rps6AB$ -pA SC-leu	145,1	19,4

Analüüsist järeldub, et $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiirus rikkas söötmes on väga sarnane WT-p ehk metsiktüüpi rakkude kasvukiirusega. Lisaks on $\Delta rps6AB$ -pA rakkude kasvukiirused WT-p rakkudega võrreldavad ka selektiivsöötmes (Joonis 7). Selle alusel leiti, et $\Delta rps6AB$ -pA tüvi on sobilik edasisteks analüüsideks eS6 valgu rolli selgitamiseks IRES-vahendatud translatsioonis.

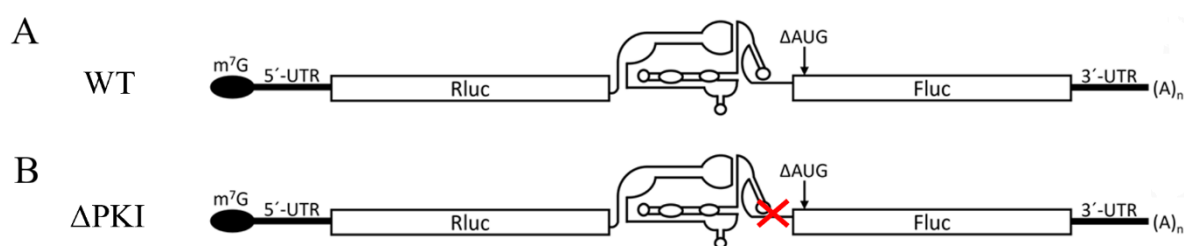


Joonis 7. *S. cerevisiae* tüvede rakkude generatsiooniajad rikkas- ja selektiivsöötmes. Generatsiooniajad arvutati valemi $\ln = 2/tõus$ alusel, kus tõus määrati kasvukõverate logaritmilisel skaalal lineaarse sirge suurima tõusu järgi. Andmed on esitatud generatsiooniaegade keskmiste ja standardvigadega. WT-p ja $\Delta rps6AB$ -pA rakud on eristatud vastavalt musta ja punase värviga. Statistiline erinevus määrati kasutades *Student*'i *t*-testi, kus $p \leq 0,0001$ (****). $n = 6$.

2.3.2. IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsuse määramine *S. cerevisiae* Δ rps6AB-pA tüves *in vivo*

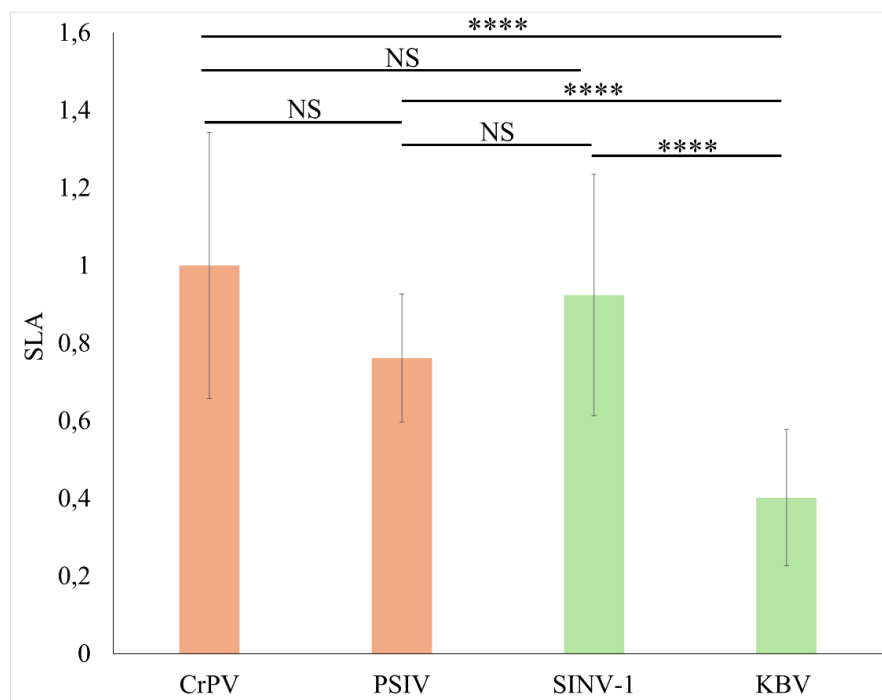
Olles valideerinud *S. cerevisiae* kontrolltüve Δ rps6AB-pA sobivuse edasisteks analüüsideks, jätkati töö teise eesmärgiga, milleks oli IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsuse määramine *S. cerevisiae* Δ rps6AB-pA tüves. Püstitati kaks alaeesmärki: kinnitada, kas Δ rps6AB-pA tüvi võimaldab IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni ning määrata erinevate IGR IRES-järjestuste aktiivsused Δ rps6AB-pA tüve rakkudes. IGR IRES-vahendatud translatsiooni uurimiseks kasutati kahel lutsiferaasil põhinevaid reporterplasmide (Joonis 8). Rakkudes sünteesitakse mRNA, kus on *Renilla* (*Rluc*) ja *Firefly* (*Fluc*) lutsiferaasi geenide vahel IGR IRES-järjestus. *Renilla* süntees on 5' *cap*-sõltuv, samas kui *Firefly* süntees toimub IGR IRES-vahendatud. *Fluc*-järjestus ei sisalda AUG koodonit, tagades, et *Fluc* translatsioon toimub vaid IGR IRES-vahendatult (Joonis 8). Erinevate reporterplasmidide omavaheliseks võrdlemiseks normaliseeriti *Fluc* väärtused *Rluc* väärtustega.

Analüüsi valiti neli IGR IRES järjestust kahest erinevast klassist (Joonis 4). A-klassist uuriti CrPV (*Criquet paralysis virus*) ja PSIV (*Plautia stali intestine virus*) IGR IRES-järjestusi (Sasaki jt., 1998; Wilson, Powell, jt., 2000). B-klassist uuriti SINV-1 (*Solenopsis invicta virus 1*) ja KBV (*Kashmir bee virus*) IGR IRES-järjestusi (Hertz ja Thompson, 2011; Valles jt., 2004). Reporterplasmidid transformeeriti Δ rps6AB-pA tüve rakkudesse ning mõõdeti *Rluc* ja *Fluc* aktiivsused. Suhtelise lutsiferaasi aktiivsuse (SLA) põhjal määrati erinevate IGR IRES-te aktiivsused. Tulemused normaliseeriti CrPV IGR IRES-järjestusele määratud suhtelise aktiivsuse suhtes.



Joonis 8. Kahel lutsiferaasil põhinevate reporterite skeem. Reporterid sisaldavad 5' *cap* struktuuri, *Renilla* (*Rluc*) ja *Firefly* (*Fluc*) lutsiferaasi kodeerivaid järjestusi, geenidevahelise piirkonna sisemist ribosoomi seondumise kohta (IGR IRES) (ingl *intergenic region internal ribosome entry site*), 5' ja 3' mittetransleeruvaid alasid (UTR) (ingl *untranslated region*) ja polü(A)-saba. IGR IRES-struktuur paikneb kahe kodeeriva järjestuse vahel ning sellelt alustatakse ainult *Fluc* järjestuse sünteesi. *Fluc* järjestus ei sisalda AUG-koodonit, tagades, et *Fluc* süntees toimuks ainult IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni kaudu. Reporterid sisaldavad kas metsiktüüpi (WT) IGR IRES-järjestust (A) või mutantset IGR IRES-järjestust (B), kus ei teki PKI-struktuuri (Δ PKI). Modifitseeritud autorilt Analüüs Veeremaa.

IGR IRES-te aktiivsused Δ rps6AB-pA rakkudes jaotusid kaheks. CrPV IGR IRES-iga sarnase aktiivsusega olid PSIV ja SINV-1 IGR IRES-id. CrPV IGR IRES-st madalama aktiivsusega oli KBV, mis erines CrPV-st 2,5 korda. Analüüsi tulemused näitavad, et Δ rps6AB-pA tüvi võimaldab IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni. Lisaks viitavad andmed, et IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsused ei tulene nende kuuluvusest a- või b-klassi. Kui klassikuuluvus oleks määrav, oleksid SINV-1 ja KBV (a-klass) aktiivsuse tasemed pidanud olema ühtmoodi statistiliselt oluliselt aktiivsemad või vähemaktiivsemad CrPV ja PSIV (b-klassi) tasemetest (Joonis 9).

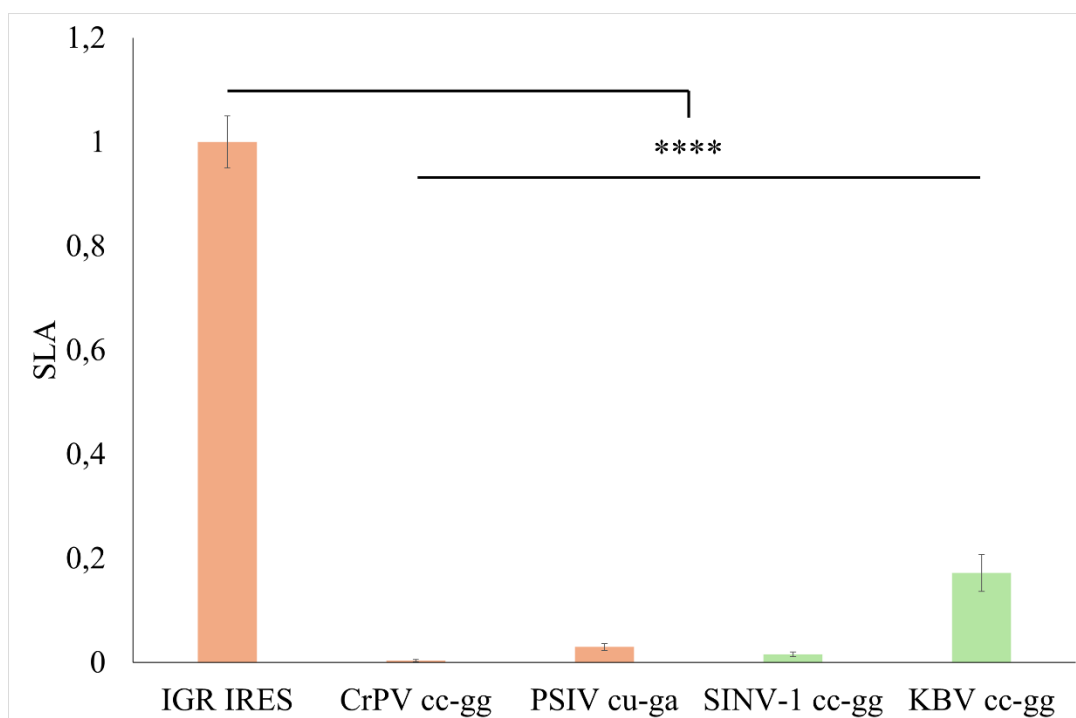


Joonis 9. IGR IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsus Δ rps6AB-pA rakkudes. CrPV, PSIV, SINV-1 ja KBV geenidevahelise piirkonna sisemiste ribosoomi seondumise kohtade (IGR IRES) (ingl *intergenic region internal ribosome entry site*) järjestusi sisaldavate reporterplasmiididelt mõõdeti *Firefly* (*Fluc*) ja *Renilla* (*Rluc*) luminesentsi väärtused. *Fluc* väärtused normaliseeriti *Rluc* väärtuste suhtes, saades suhtelise lutsiferaasi aktiivsuse (SLA). Andmed on esitatud SLA keskmiste ja standardvigadega. IGR IRES-tele määratud aktiivsused on normaliseeritud CrPV suhtes. A- ja b-klassi IGR IRES-id on eristatud vastavalt oranži ja rohelise värviga. Statistiline olulisus määrati kasutades *Student*'i *t*-testi, kus $p \leq 0,0001$ (****). $n \geq 12$.

Kontrollimaks, et translatsioon *Firefly* järjestuselt toimub IGR IRES-vahendatult, kasutati kontrollplasmide, mille IGR IRES-järjestustes esinesid mutatsioonid, mis takistavad PKI-struktuuri moodustumist (Joonis 8). PKI struktuuri on aga IGR IRES-vahendatud translatsiooni jaoks hädavajalik (Au jt., 2015; Costantino ja Kieft, 2005). CrPV cc-gg, SINV-1 cc-gg ja KBV cc-gg järjestuste puhul ei moodustu PKI-struktuuri cc-gg mutatsiooni tõttu. PSIV cu-ga järjestuses ei moodustu PKI-struktuuri cu-ga mutatsiooni tõttu. Kontrollplasmiidid transformeeriti Δ rps6AB-pA tüve rakkudesse ning mõõdeti *Rluc* ja *Fluc* väärtused, mille põhjal

arvutati SLA. Mutantsetele IGR IRES-järjestus teie (Δ PKI) määratud aktiivsused normaliseeriti vastava IGR IRES metsiktüüpi järjestusele määratud aktiivsuse suhtes.

Kõikidel analüüsitud juhtudel oli Δ PKI IGR IRES-te aktiivsus oluliselt madalam kui vastava metsiktüüpi IGR IRES-järjestustele määratud aktiivsus (Joonis 10). Võrreldes vastava metsiktüüpi järjestusega oli CrPV cc-gg IGR IRES aktiivsus 308 korda madalam, PSIV cu-ga 33,5 korda madalam, SINV-1 cc-gg 63 korda madalam ja KBV cc-gg 6 korda madalam (Joonis 10). Kuigi KBV Δ PKI IGR IRES taustaaktiivsus oli teiste analüüsitud Δ PKI IGR IRES-ga võrreldes kõrgem, kinnitavad analüüsi tulemused, et PKI struktuur on hädavajalik IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooniks (Joonis 10).



Joonis 10. IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsus Δ PKI mutatsiooniga IGR IRES järjestustel. CrPV, PSIV, SINV-1 ja KBV geenidevahelise piirkonna sisemiste ribosoomi seondumise kohtade (IGR IRES) (ingl *intergenic region internal ribosome entry site*) järjestusi sisaldavate reporetrplasmiididelt, milles oli rikutud pseudosõlme I struktuuri (Δ PKI), mõõdeti *Firefly* (*Fluc*) ja *Renilla* (*Rluc*) luminesentsi väärtused. PKI-struktuuri teke katkestati järgnevate mutatsioonidega: CrPV, SINV-1 ja KBV IGR IRES PKI-struktuuri järjestustes muudeti cc nukleotiidid gg nukleotiidideks, PSIV IGR IRES PKI-struktuuri järjestustes muudeti cu nukleotiidid ga nukleotiidideks. *Fluc* väärtused normaliseeriti *Rluc* väärtuste suhtes, saades suhtelise lutsiferaasi aktiivsuse (SLA). Andmed on esitatud SLA keskmiste ja standardvigadega ning on normaliseeritud vastava IGR IRES järjestuse metsiktüübi suhtes. A- ja b-klassi IGR IRES-id on eristatud vastavalt oranži ja rohelise värviga. Y-teljel on kujutatud suhteline lutsiferaasi aktiivsus. $n \geq 12$.

2.4. Arutelu

Molekulaarbioloogia õppetoolis on varasemalt uuritud ribosoomi eukarüoodi-spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumise mõju IRES-vahendatud translatsioonile. Leiti, et ribosoomi sildade eB12 ja eB13 puudumisel suureneb IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni efektiivsus võrreldes metsiktüübiga (avaldamata tulemused). Sellest tulenevalt valiti antud töö raames edasi uurimiseks ribosoomi eukarüoodi-spetsiifiline sild eB13, täpsemalt selle moodustumises osalev valk eS6. Ribosoomi valgu eS6 rolli hindamine IRES-vahendatud translatsioonis põhines *S. cerevisiae* kontrolltüvel Δ rps6AB-pA, mille genoomist on deleteeritud eS6 valku kodeerivad paraloogid *RPS6A* ja *RPS6B* ning eS6 süntees on kompenseeritud *RPS6A*-d ekspresseeriva plasmiidiga (konstrueeritud prof. Tiina Tamm poolt). Käesoleva töö peamine eesmärk oli valideerida Δ rps6AB-pA tüve sobivus edasisteks analüüsideks eS6 rolli uurimiseks IRES-vahendatud translatsioonis. Selleks püstitati tööle kaks eesmärki: Δ rps6AB-pA rakkude kasvukiiruse määramine rikkas (YPD) ja selektiivsöötmes (SC-Leu) ning IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsuse määramine.

Δ rps6AB-pA rakkude kasvukiiruseid võrreldi metsiktüüpi rakkudega, kuhu oli transformeeritud *RPS6A*-d ekspresseeriva plasmidi tühi vektor (WT-p). Kasvukiiruste hindamisest selgus, et YPD söötmes oli Δ rps6AB-pA rakkude generatsiooniaeg 1,14 korda aeglasem WT-p rakkudest YPD-s (Joonis 7). SC-Leu söötmes oli Δ rps6AB-pA rakkude generatsiooniaeg vastupidiselt 1,14 korda kiirem võrreldes WT-p rakkudega SC-Leu söötmes (Joonis 7). Erinevus generatsiooniaegade vahel on marginaalne. See näitab, et kuigi eS6 ekspressiooni kompenseeritakse plasmiidilt, kasvavad Δ rps6AB-pA rakud väga sarnaselt metsiktüüpi rakkudele. *S. cerevisiae* metsiktüübi rakkudes ekspresseeritakse eS6 mõlemat paraloogi, nii *RPS6A*-d kui *RPS6B*-d. Mõlema paraloogi ekspressiooni tasemeid on varem mõõdetud rikkas ja minimaalsöötmes metsiktüüpi rakkudes – *RPS6A* ekspressiooni tase on 66 486 (molekuli/rakus) ja *RPS6B* ekspressiooni tase on 18 914 (molekuli/rakus) (Ho jt., 2018). Seega on *RPS6A* ribosoomi valgu eS6 põhiline ja enam ekspresseeritav isoform ning selle ekspressioon võib juba olla piisav, et tagada metsiktüüpi rakkudele sarnane kasvukiirus. Samuti on eS6 valgu ekspressioon plasmiidilt Δ rps6AB-pA kontrolltüves *RPS6A* natiivse promootori all, mistõttu on tõenäoliselt säilinud genoomiga võrreldav ekspressioonitase. See teadmine toetab, et Δ rps6AB-pA rakkude kasvukiirus sarnaneb metsiktüüpi rakkude omale. Tüvi hinnati sobivaks edasisteks analüüsideks antud töös.

Töö teine eesmärk oli määrata Δ rps6AB-pA tüve rakkudes IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni aktiivsus. Töösse valiti nelja viiruse IGR IRES-järjestused: CrPV (*Criquet*

paralysis virus), PSIV (*Plautia stali intestine virus*), SINV-1 (*Solenopsis invicta virus 1*) ja KBV (*Kashmir bee virus*). IGR IRES-te aktiivsuse määramiseks kasutati kahel lutsiferaasil põhinevat reportersüsteemi (Joonis 9). Reportersüsteemis on *Renilla* ja *Firefly* geenid, mille vahel on IGR IRES järjestus. IGR IRES aktiivsused määrati suhtelise lutsiferaasi aktiivsuse alusel. Saadud tulemused kinnitavad, et Δ rps6AB-pA tüves toimub IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioon ning aktiivsused varieerusid IGR IRES-järjestuste vahel. CrPV IGR IRES aktiivsusega olid sarnased PSIV ja SINV-1 IGR IRES-id ning CrPV-st madalaima aktiivsusega oli KBV IGR IRES, mis erines CrPV-st 2,5 korda (Joonis 9). Varasemalt on samu IGR IRES-järjestusi analüüsitud *S. cerevisiae* metsiktüüpi tüves, kasutades sama reportersüsteemi (Hertz ja Thompson, 2011). Hertz ja Thompson leidsid, et analüüsitud IGR IRES-järjestustest olid PSIV, SINV-1 ja KBV rohkem kui kaks korda aktiivsemad CrPV IGR IRES-st (Hertz ja Thompson, 2011). Erinevused käesolevas töös saadud ja Hertz ja Thompson poolt avaldatud tulemuste vahel võisid tuleneda IGR IRES-te aktiivsuste määramisest erinevates tüvedes. Hertz ja Thompson (2011) määrasid IGR IRES-te aktiivsused metsiktüüpi *S. cerevisiae* tüves (*MATa his3 Δ leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*). Käesolevas töös kasutati aga *S. cerevisiae* Δ rps6AB-pA tüve (*MATa ura3-52 leu2 Δ his3 Δ 200 trp1 Δ 36 Δ arg4 Δ lys1 Δ rps6A::kanMX6/ Δ rps6B::kanMX6 [pRS315-RPS6A]*). Lõplikke järeldusi aga teha ei saa, kuna CrPV, PSIV ja SINV-1 aktiivsuste veapiirid on käesolevas töös küllaltki kõrged ning vajavad kordusmõõtmisi, et tendentsist aru saada. Analüüsi valitud IGR IRES-id kuuluvad kahte struktuuriklassi– a ja b (Joonis 4). Peamised erinevused IGR IRES-te klasside vahel esinevad just ribosoomiga seondumise domeenis, mistõttu võib oletada, et IGR IRES-te aktiivsus võib olla mõjutatud struktuurist. Töös analüüsitud IGR IRES-st kuuluvad a-klassi CrPV ja PSIV ning b-klassi SINV-1 ja KBV. IGR IRES-te aktiivsuste analüüsi tulemused ei viita aga sellele, et a- ja b-klasside vahelised struktuursed erinevused mõjutavad IGR IRES aktiivsuseid, see on ka kooskõlas Hertz ja Thompsoni (2011) poolt avaldatud tulemustega (Joonis 9).

Tulevastes analüüsides tuleks pöörata rohkem tähelepanu teguritele, mis võivad mõjutada IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsuseid. Näiteks on leitud, et teatud initsiatsioonifaktorite üleekspressioon suurendab IGR IRES-vahendatud translatsiooni suhtelist aktiivsust mitmekordselt (Cao jt., 2026). Samuti leiti, et IGR IRES-struktuuri omavaid mRNA-sid lagundatakse sageli *nonsense*-vahendatud mRNA lagundamise süsteemi (NMD) poolt (Cao jt., 2026). Seda võib juhtuda, kui mRNA-l esineb mitu ORF-i või kui translatsioon ORF-l peatub enneaegselt. Seetõttu tuleks edasistes analüüsides hinnata ka initsiatsioonifaktorite ja NMD mõju ning võimalusel neid minimeerida, et vähendada mõõtmiste veapiire.

Töö üldeesmärk oli kinnitada $\Delta rps6AB$ -pA sobivus kontrolltüvena tulevaste analüüside jaoks ning saadud tulemused seda ka kinnitavad. $\Delta rps6AB$ -pA tüve olemasolu kontrolltüvena võimaldab teha tulevase uuringuid ribosoomi eS6 valgu rolli uurimiseks IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis ja selle regulatsioonis. Ribosoomi eS6 valku on varasemalt uuritud *S. cerevisiae* rakkudes, kus keskenduti valgu eS6 post-translatsioonilistele modifikatsioonidele. Nimelt fosforüülitakse eS6 valgu C-terminaalse α -heeliksi seriine S232 ja S233 nii *RPS6A* kui *RPS6B* paraloogis (Yerlikaya jt. 2016). Analüüsi eesmärk oli mõista, mis funktsioon on *S. cerevisiae* ribosomaalse valgu eS6 232. ja 233. seriinide fosforüülimisel (Yerlikaya jt. 2016). Selle uurimiseks ekspresseeriti *S. cerevisiae* rakkudes ribosoomi eS6 valku, mille 232. ja 233. seriinid olid asendatudalaniinidega (Yerlikaya jt., 2016). Yerlikaya jt. (2016) uurimuses ei identifitseeritud eS6 fosforüülimise täpset funktsiooni. Küll aga leiti, et S232A ja S233A mutatsioonide korral kogunes mRNA-de 5'UTR piirkonda vähem ribosome võrreldes metsiktüübiga (Yerlikaya jt., 2016). Uurimaks, kas ja kuidas mõjutab seriinide S232 ja S233 fosforüülimine IRES-vahendatud translatsiooni, saab luua pagaripärmitüve, kus ekspresseeritakse eS6 valku ilma vastavate seriinideta.

Ribosoomi eS6 valk esineb lisaks eukarüootide ka arhede ribosoomides (Kisly ja Tamm, 2023). Arhe *Pyrococcus furiosus* eS6 valk on tunduvalt lühem (125 aminohapet) kui *S. cerevisiae* eS6 (236 aminohapet) (Lisa 1, Joonis 11) (*Saccharomyces Genome Database*, 2026; *The UniProt Consortium*, 2026). Kui *S. cerevisiae* rakkudes ekspresseerida *P. furiosus*'e pikkusele vastavat eS6 varianti, säilib ainult valgu N-terminaalne osa (Lisa 1m Joonis 11). Kuna eB13 silla moodustamisel loob eS6 kontakti nii uL3 kui ka eL24-ga, säilivad 125 aminohappelise variandi puhul kontaktid vaid uL3 valguga. Seega võib tekkida probleeme eB13 silla moodustumisega. Sellise mutantse *S. cerevisiae* tüve loomine, kus ekspresseeritakse 125 aminohappe pikkust eS6 valku, võimaldaks uurida, kuidas eS6 pikkuse vähendamine ja eB13 silla moodustamise häirimine mõjutavad IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni.

KOKKUVÕTE

Translatsiooni initsiatsiooni etapp on eukarüootsetes rakkudes keeruline protsess, mis sõltub paljude faktorite koostöimisest ja järk-järgulistest komplekside seondumisest. Sisemise ribosoomi seondumiskoha (IRES) vahendatud translatsiooni initsiatsioon seevastu ei eelda kõikide klassikaliseks initsiatsiooniks vajalike tingimuste täitmist. Uurimaks, mis roll on *Saccharomyces cerevisiae* ribosomaalse silla eB13 moodustamises osaleva valgul eS6 IRES-vahendatud translatsioonis, konstrueeriti kontrolltüvi Δ rps6AB-pA (konstrueeris prof. Tiina Tamm). Kontrolltüve Δ rps6AB-pA genoomist deleteeriti eS6 valku kodeerivad paraloogid *RPS6A* ja *RPS6B* ning eS6 süntees kompenseeriti plasmiidilt ekspresseeritava *RPS6A*-lt (pRS315-*RPS6A*). Käesoleva töö eesmärk oli määrata *S. cerevisiae* kontrolltüve Δ rps6AB-pA sobivus tulevateks analüüsideks ribosomaalse valguga eS6, et määrata eS6 roll IRES-vahendatud translatsioonis. Selleks määrati Δ rps6AB-pA rakkude kasvukiirus rikkas ja selektiivsöötmes ning IGR IRES-vahendatud translatsiooni aktiivsus.

Esmalt määrati Δ rps6AB-pA rakkude generatsiooniaeg rikkas ja selektiivsöötmes ning tulemusi võrreldi metsiktüüpi rakkudega, kuhu transformeeriti *RPS6A* plasmiid tühi vektor (WT-p). Tulemused näitavad, et Δ rps6AB-pA ja WT-p rakkude generatsiooniaegade erinevused on marginaalsed (Joonis 7). WT-p rakkude generatsiooniaeg rikkas söötmes (YPD) oli 91,4 +/- 3,03 min ja Δ rps6AB-pA rakkudel 103,4 +/- 4,7 min ning SC-Leu söötmes oli WT-p rakkude generatsiooniaeg 164,8 +/- 11,8 min ja Δ rps6AB-pA rakkudel 145,1 +/- 19,4 min (Tabel 2). Tulemused näitavad, et YPD-s on Δ rps6AB-pA rakkude generatsiooniaeg 1,14 korda pikem võrreldes WT-p rakkudega, samas kui SC-Leu söötmes on Δ rps6AB-pA rakkude generatsiooniaeg 1,14 korda kiirem kui WT-p rakkudes SC-Leu söötmes (Joonis 7). Tulemuste alusel otsustati, et Δ rps6AB-pA tüvi sobib tulevateks analüüsideks käesolevas töös.

Järgnevalt määrati Δ rps6AB-pA rakkudes IGR IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsus, kasutades kahel lutsiferaasil põhinevat reportersüsteemi. Analüüsi valiti neli *Dicistroviridae* sugukonna viiruste IGR IRES-järjestust: CrPV (*Criquet paralysis virus*) ja PSIV (*Plautia stali intestine virus*), mis on struktuuri alusel jaotatud IGR IRES-te a-klassi ning SIN-1 (*Solenopsis invicta virus 1*) ja KBV (*Kashmir bee virus*), mis on struktuuri alusel jaotatud IGR IRES-te b-klassi (Hertz ja Thompson, 2011; Sasaki jt., 1998; Valles jt., 2004; Wilson, Powell, jt., 2000). Analüüsist selgus, et CrPV IGR IRES aktiivsuse tasemega on sarnased PSIV ja SIN-1 IGR IRES-i aktiivsustele ning need ei erine üksteisest statistiliselt. CrPV IGR IRES-st erines ainult KBV IGR IRES, mille tulemus oli CrPV IGR IRES aktiivsusest 2,5 korda madalam (Joonis 9). Andmed viitasid, et erinevused IGR IRES-te aktiivsustest ei tulene IGR IRES-te

kuulumisest a- või b-klassi, mis on kooskõlas ka varasemate uuringutega (Hertz ja Thompson, 2011). Lisaks kinnitasid Δ PKI-struktuuri mutantide analüüsid, et PKI-struktuur on hädavajalik IRES-vahendatud translatsiooniks ning, et Δ rps6AB-pA tüvi võimaldab IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni (Joonis 9 ja 10).

Kasvukiiruse võrdlemisest metsiktüüpi rakkudega ning IGR IRES-vahendatud aktiivsuste analüüsist selgus, et Δ rps6AB-pA tüvi on sobilik kasutamiseks tulevastes analüüsides, mis keskenduvad ribosomaalse silla eB13 moodustamises osalevale eS6 valgule ning selle rollile IRES-vahendatud translatsioonis. Edasisteks analüüsideks saaks luua *S. cerevisiae* mutante, mis ekspresseerivad modifitseeritud pikkusega eS6 valku (125 aminohapet). See annaks võimaluse hinnata eS6 mõju IRES-vahendatud translatsioonile ning selgitada eS6 C-terminaalsete seriinide positsioonidel 232 ja 233 modifitseerimise funktsiooni.

SUMMARY

Assessing the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* control strain for studying the role of the ribosomal protein eS6 in IRES-mediated translation

Deelia Maivel

Translation, or protein synthesis, is a complex and tightly regulated cellular process. The regulation of translation occurs mainly through the initiation step, which in classical translation depends on several translation initiation factors and the 5' cap structure of the mRNA. In contrast, internal ribosome binding site (IRES) mediated translation initiation does not require a 5' cap structure and relies on fewer initiation factors compared to the classical translation mechanism. To investigate the role of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein eS6 in IRES-mediated translation, a control strain Δ rps6AB-pA was used (constructed by Prof. Tiina Tamm). In the control strain, eS6 encoding paralogs *RPS6A* and *RPS6B* were deleted from the genome and eS6 synthesis was compensated by *RPS6A* expression from a plasmid (pRS315-*RPS6A*). The aim of this study was to determine the suitability of the *S. cerevisiae* control strain Δ rps6AB-pA for to determine the function of eS6 in IRES-mediated translation. For that purpose, the growth rate of Δ rps6AB-pA cells in rich and selective media was determined, and the IGR IRES-mediated translation activity was measured.

First, the generation time of Δ rps6AB-pA cells in rich (YPD) and selective media (SC-Leu) were determined and compared with wild-type cells transformed with an empty *RPS6A* vector plasmid (pRS315). The results show that the differences in the generation time of Δ rps6AB-pA and WT-p cells are marginal (Figure 7). In YPD, the generation time of WT-p cells was 91.4 +/- 3.03 min and in Δ rps6AB-pA cells 103.4 +/- 4.7 min (Table 2). Generation time of WT-p cells in SC-Leu medium was 164.8 +/- 11.8 min and in Δ rps6AB-pA cells 145.1 +/- 19.4 min (Table 2). These results show that the generation time of Δ rps6AB-pA cells in YPD was 1.14 times longer than WT-p cells in YPD, while Δ rps6AB-pA cells in SC-Leu medium were 1.14 times faster than WT-p cells in SC-Leu medium (Figure 7).

Next, the relative activities of IGR IRES-mediated translation of Δ rps6AB-pA cells was determined using a dual-luciferase reporter system. Four IGR IRES sequences from the *Dicistroviridae* family viruses were selected: CrPV (*Cricket paralysis virus*) and PSIV (*Plautia stali intestine virus*), which are structurally classified into class a, and SINV-1 (*Solenopsis invicta virus 1*) and KBV (*Kashmir bee virus*), which are structurally classified into class b (Hertz ja Thompson, 2011; Sasaki jt., 1998; Valles jt., 2004; Wilson jt., 2000). The result from the analysis showed, that CrPV IGR IRES activity is similar to PSIV and SINV-1 in IGR IRES

and they do not differ statistically from each other. Only the KBV IGR IRES differed from CrPV, which resulted in a 2.5-fold lower activity than the CrPV IGR IRES (Figure 9). The activity levels of IGR IRES did not correlate with their classification into class a or b, which is also consistent with previous studies (Hertz ja Thompson, 2011). Furthermore, analyzes of Δ PKI mutants confirmed that the PKI structure is essential for IRES-mediated translation initiation (Figures 9 and 10). The results confirmed that the Δ rps6AB-pA strain allows IGR IRES-mediated translation initiation (Figure 9).

Comparison of growth rate with wilt-type cells and analysis of IGR IRES-mediated activities demonstrated that the Δ rps6AB-pA strain is suitable for use in future studies focusing on the ribosomal protein eS6. In the future, *S. cerevisiae* mutants expressing a modified length of eS6 protein could be generated. This would provide an opportunity to assess the involvement of eS6 on IRES-mediated translation and to clarify the functional significance of the serine modifications located at the end of the α -helix of eS6.

TÄNUSÕNAD

Olen väga tänulik kõigile, kes on mind selle töö valmimise jooksul toetanud.

Eelkõige soovin tänada oma juhendajat Analiis Veeremaad tema asjatundliku tagasiside ja kannatlikkuse eest. Tema teadmised ja nõuanded sellel töö teema uurimisel olid väga kasulikud ning aitasid kaasa tulemuste tõlgendamisele ja töö valmimisele.

Täna Molekulaarbioloogia õppetooli võimaluse eest seda teemat uurida ning ka molekulaarbioloogia labori töötajaid, kelle nõuanded ja abi aitasid kaasa töö teostamisele.

Suur tänu kuulub ka minu perele ja lähedaste nende toetuse ning kaasaelamise eest. Nende igapäevane toetus motiveerisid mind andma endast parima iga päev.

Aitäh Teile kõigile!

Abaeva, I. S., Vicens, Q., Bochler, A., Soufari, H., Simonetti, A., Pestova, T. V., Hashem, Y., ja Hellen, C. U. T. (2020). The Halastavi árva Virus Intergenic Region IRES Promotes Translation by the Simplest Possible Initiation Mechanism. *Cell reports*, 33(10), 108476. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108476>

Abaeva, I. S., Young, C., Warsaba, R., Khan, N., Tran, L. V., Jan, E., Pestova, T. V., ja Hellen, C. U. T. (2023). The structure and mechanism of action of a distinct class of dicistrovirus intergenic region IRESs. *Nucleic Acids Research*, 51(17), 9294–9313. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad569>

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>

Algire, M. A., Maag, D., ja Lorsch, J. R. (2005). Pi Release from eIF2, Not GTP Hydrolysis, Is the Step Controlled by Start-Site Selection during Eukaryotic Translation Initiation. *Molecular Cell*, 20(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.008>

Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., ja Hinnebusch, A. G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA^{Met} is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes ja Development*, 14(19), 2534–2546. <https://doi.org/10.1101/gad.831800>

Au, H. H., Cornilescu, G., Mouzakis, K. D., Ren, Q., Burke, J. E., Lee, S., Butcher, S. E., ja Jan, E. (2015). Global shape mimicry of tRNA within a viral internal ribosome entry site mediates translational reading frame selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), E6446–E6455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512088112>

Au, H. H. T., ja Jan, E. (2012). Insights into Factorless Translational Initiation by the tRNA-Like Pseudoknot Domain of a Viral IRES. *PLoS ONE*, 7(12), e51477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051477>

Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J.-H., ja Tsien, R. Y. (2006). Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*, 12(5), 851–861. <https://doi.org/10.1261/rna.2309906>

- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., ja Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*, 334(6062), 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Biziaev, N., Shuvalov, A., Salman, A., Egorova, T., Shuvalova, E., ja Alkalaeva, E. (2024). The impact of mRNA poly(A) tail length on eukaryotic translation stages. *Nucleic Acids Research*, 52(13), 7792–7808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae510>
- Blanchet, S., ja Ranjan, N. (2022). Translation Phases in Eukaryotes. *Ribosome Biogenesis: Methods and Protocols [Internet]*. Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9_13
- Byrne, K. P., ja Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*, 15(10), 1456–1461. <https://doi.org/10.1101/gr.3672305>
- Calvo, S. E., Pagliarini, D. J., ja Mootha, V. K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7507–7512. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810916106>
- Cao, Z., Zou, X., Ito, K., ja Endo, K. (2026). Multilayer Host Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Enhance Cricket Paralysis Virus (CrPV) Internal Ribosome Entry Site Mediated Translation. *ACS Synthetic Biology*, 15(2), 418–425. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5c00744>
- Costantino, D., ja Kieft, J. S. (2005). A preformed compact ribosome-binding domain in the cricket paralysis-like virus IRES RNAs. *RNA*, 11(3), 332–343. <https://doi.org/10.1261/rna.7184705>
- Craig, A. W. B., Haghighat, A., Yu, A. T. K., ja Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature*, 392(6675), 520–523. <https://doi.org/10.1038/33198>
- Evans, J., Mitchell, S., Spriggs, K., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostareck, D., ja Willis, A. (2003). Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomsztyk K, Ostarek D, Willis AEMembers of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* 22: 8012-8020. *Oncogene*, 22, 8012–8020. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206645>

- Faye, M. D., ja Holcik, M. (2015). The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Translation and Cancer*, 1849(7), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.012>
- Fernández, I. S., Bai, X.-C., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., ja Ramakrishnan, V. (2014). Initiation of Translation by Cricket Paralysis Virus IRES Requires Its Translocation in the Ribosome. *Cell*, 157(4), 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.015>
- Gerhalter, M., Prattes, M., Grundmann, L. E., Grishkovskaya, I., Semeraro, E. F., Zisser, G., Kotisch, H., Merl-Pham, J., Hauck, S. M., Haselbach, D., ja Bergler, H. (2026). A comprehensive view on r-protein binding and rRNA domain structuring during early eukaryotic ribosome formation. *Nucleic Acids Research*, 54(3), gkag036. <https://doi.org/10.1093/nar/gkag036>
- Graifer, D., ja Karpova, G. (2015). Interaction of tRNA with Eukaryotic Ribosome. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7173–7194. (102284316). <https://doi.org/10.3390/ijms16047173>
- Hashem, Y., ja Frank, J. (2018). The Jigsaw Puzzle of mRNA Translation Initiation in Eukaryotes: A Decade of Structures Unraveling the Mechanics of the Process. *Annual Review of Biophysics*, 47(1), 125–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-034034>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., ja Mathews, M. B. (2012). Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Hertz, M. I., ja Thompson, S. R. (2011). In vivo functional analysis of the Dicistroviridae intergenic region internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7276–7288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr427>
- Ho, B., Baryshnikova, A., ja Brown, G. W. (2018). Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Systems*, 6(2), 192–205.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.12.004>
- Iacono, M., Mignone, F., ja Pesole, G. (2005). uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. *Gene*, 349, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.041>
- Imataka, H., Gradi, A., ja Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO Journal*, 17(24), 7480–7489. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>

- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., ja Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jan, E., ja Sarnow, P. (2002a). Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus. *Journal of Molecular Biology*, 324(5), 889–902. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01099-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01099-9)
- Jan, E., ja Sarnow, P. (2002b). Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus. *Journal of Molecular Biology*, 324(5), 889–902. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01099-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01099-9)
- Kapp, L. D., ja Lorsch, J. R. (2004). GTP-dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor eIF2. *Journal of Molecular Biology*, 335(4), 923–936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.025>
- Kisly, I., Remme, J., ja Tamm, T. (2019). Ribosomal protein eL24, involved in two intersubunit bridges, stimulates translation initiation and elongation. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 406–420. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1083>
- Kisly, I., ja Tamm, T. (2023). Archaea/eukaryote-specific ribosomal proteins—Guardians of a complex structure. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1249–1261. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.01.037>
- Komar, A. A., ja Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle*, 10(2), 229–240. <https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14472>
- Kumar, P., Hellen, C. U. T., ja Pestova, T. V. (2016). Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes ja Development*, 30(13), 1573–1588. <https://doi.org/10.1101/gad.282418.116>
- Landry, D. M., Hertz, M. I., ja Thompson, S. R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the *Dicistroviridae* and hepatitis C viral IRESs. *Genes ja Development*, 23(23), 2753–2764. <https://doi.org/10.1101/gad.1832209>
- Leppek, K., Das, R., ja Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>

- Li, Y., Zhang, L., Wang, L., Li, J., Zhao, Y., Liu, F., ja Wang, Q. (2024). Structure and function of type IV IRES in picornaviruses: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1415698>
- Mailliot, J., ja Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites: Four classes for one goal. *WIREs RNA*, 9(2), e1458. <https://doi.org/10.1002/wrna.1458>
- Marintchev, A., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., ja Wagner, G. (2003). Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: A new interaction between old partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1535–1540. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437845100>
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., ja Yusupov, M. (2012). One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural ja Molecular Biology*, 19(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>
- Merrick, W. C., ja Pavitt, G. D. (2018). Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12), a033092. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>
- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Coldwell, M. J., Jackson, R. J., ja Willis, A. E. (2003). The Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment Attains the Correct Structural Conformation for Function via Interactions with PTB and unr. *Molecular Cell*, 11(3), 757–771. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00093-5)
- Mitchell, S. F., Walker, S. E., Algire, M. A., Park, E.-H., Hinnebusch, A. G., ja Lorsch, J. R. (2010). The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and block an alternative pathway. *Molecular cell*, 39(6), 950–962. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.021>
- Monticolo, F., Palomba, E., ja Chiusano, M. L. (2021). *Translation machinery reprogramming in programmed cell death in Saccharomyces cerevisiae*. 7. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00392-x>
- Nakashima, N., ja Uchiumi, T. (2009). Functional analysis of structural motifs in dicistroviruses. *Virus Research, Structural motifs controlling the replication cycle of positive strand RNA viruses*, 139(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.06.006>

- Palam, L. R., Baird, T. D., ja Wek, R. C. (2011). Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 10939–10949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216093>
- Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O’Leary, S. E., ja Puglisi, J. D. (2016). Multiple Parallel Pathways of Translation Initiation on the CrPV IRES. *Molecular Cell*, 62(1), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.020>
- Pfingsten, J. S., Costantino, D. A., ja Kieft, J. S. (2007). Conservation and Diversity Among the Three-dimensional Folds of the Dicistroviridae Intergenic Region IRESes. *Journal of molecular biology*, 370(5), 856–869. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.076>
- Pickering, B. M., Mitchell, S. A., Evans, J. R., ja Willis, A. E. (2003). Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 639–646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg146>
- Pietras, P. J., Wasilewska-Burczyk, A., Pełowska, K., Marczak, Ł., Tyczewska, A., ja Grzywacz, K. (2024). Dynamic protein composition of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in response to multiple stress conditions reflects alterations in translation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 132004. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132004>
- Pisarev, A. V., Hellen, C. U. T., ja Pestova, T. V. (2007). Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell*, 131(2), 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.041>
- Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E., ja Hellen, C. U. T. (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *Comptes Rendus. Biologies*, 328(7), 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.02.004>
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A., ja Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6018), 730–736. (21205638). <https://doi.org/10.1126/science.1198308>
- Sasaki, J., Nakashima, N., Saito, H., ja Noda, H. (1998). An Insect Picorna-like Virus, Plautia stali Intestine Virus, Has Genes of Capsid Proteins in the 3’ Part of the Genome. *Virology*, 244(1), 50–58. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9094>
- Schrödinger, LLC (2024) „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0“.

- Spahn, C. M. T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., ja Frank, J. (2001). Structure of the 80S Ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-Ribosome and Subunit-Subunit Interactions. *Cell*, 107(3), 373–386. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00539-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00539-6)
- Susorov, D., Miścicka, A., Golovenko, D., Loveland, A. B., Zinoviev, A., Pestova, T. V., ja Korostelev, A. A. (2025). Structural mechanism of mRNA decoding by mammalian GTPase GTPBP1. *Nature Communications*, 17(1), 148. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-66833-2>
- Tarun, S. Z., ja Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *The EMBO Journal*, 15(24), 7168–7177. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01108.x>
- The UniProt Consortium. (2025). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Tidu, A., ja Martin, F. (2024). The interplay between *cis*- and *trans*-acting factors drives selective mRNA translation initiation in eukaryotes. *Biochimie, The Rise of RNA: from fundamental research to therapeutic applications*, 217, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.09.017>
- Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., ja Katada, T. (2002). A Novel Role of the Mammalian GSPT/eRF3 Associating with Poly(A)-binding Protein in Cap/Poly(A)-dependent Translation*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50286–50292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203029200>
- Valles, S. M., Strong, C. A., Dang, P. M., Hunter, W. B., Pereira, R. M., Oi, D. H., Shapiro, A. M., ja Williams, D. F. (2004). A picorna-like virus from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: Initial discovery, genome sequence, and characterization. *Virology*, 328(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.016>
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., ja Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell*, 2(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80122-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80122-7)
- Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., ja Sarnow, P. (2000). Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome. *Cell*, 102(4), 511–520. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00055-6)

Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., ja Sarnow, P. (2000). Naturally Occurring Dicistronic Cricket Paralysis Virus RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 4990–4999. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.14.4990-4999.2000>

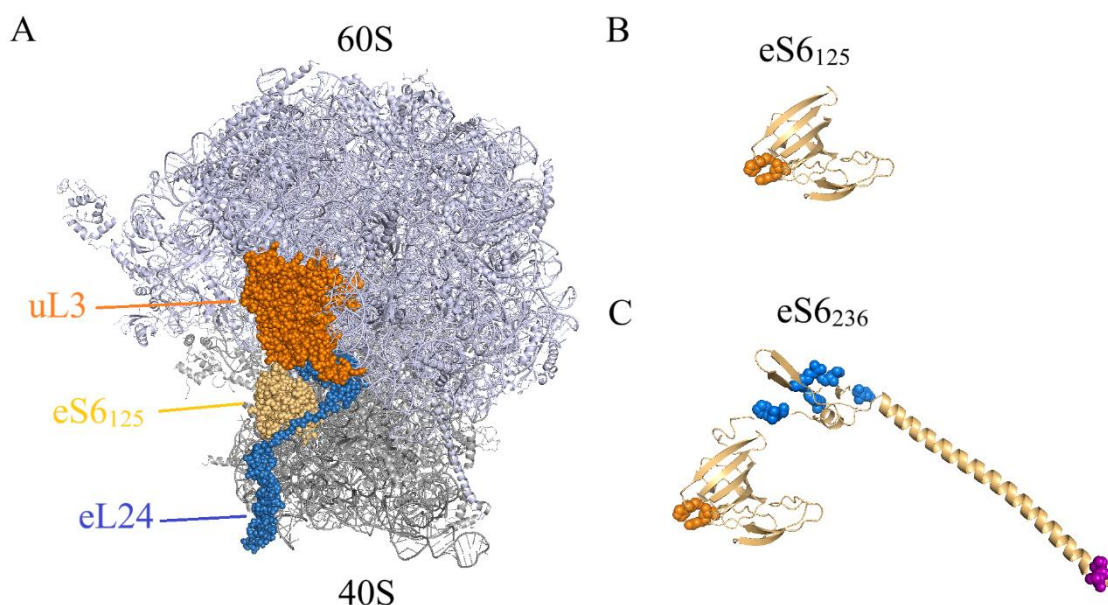
Yamamoto, H., Collier, M., Loerke, J., Ismer, J., Schmidt, A., Hilal, T., Sprink, T., Yamamoto, K., Mielke, T., Bürger, J., Shaikh, T. R., Dabrowski, M., Hildebrand, P. W., Scheerer, P., ja Spahn, C. M. (2015). Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA. *The EMBO Journal*, 34(24), 3042–3058. <https://doi.org/10.15252/emj.201592469>

Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., Boone, C., Ammerer, G., Baranov, P. V., ja Loewith, R. (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 27(2), 397–409. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-08-0594>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Saccharomyces Genome Database (SGD). 2026. *RPS6A gene page*. Kättesaadav: <https://yeastgenome.org/locus/S000006011/protein> (vaadatud 05.05.2026)

Promega Corporation. August, 2023. *Dual-Luciferase® Reporter Assay System Technical Manual (TM040)*. Kättesaadav: <https://www.promega.com> (vaadatud 05.05.2026)



Joonis 11. (A) *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosoom modifitseeritud pikkusega eS6 valguga. Helesinisega on eristatud ribosoomi 60S alaühik ja halliga ribosoomi 40S alaühik. Kollasega on eristatud eS6 valk, sinisega eL24 valk ja oranžiga uL3 valk. (B) *S. cerevisiae* eS6 valgu struktuur, mis vastab arhe *Pyrococcus furiosus* eS6 valgu pikkusele (125 aminohapet). (C) *S. cerevisiae* täispikk eS6 valk (236 aminohapet). Oranžiga on eristatud aminohapped, mis interakteeruvad uL3 valguga ja sinisega aminohapped, mis interakteeruvad eL24 valguga. Lillaga on eristatud eS6 C-terminaalsed seriinid positsioonidel 232 ja 233, mida modifitseeritakse post-translatsiooniliselt. Jooniste tegemisel on kasutatud *S. cerevisiae* 80S ribosoomi struktuuri (PDB koordinaadid 4V88) (Ben-Shem jt., 2011) ning *PyMOL* programmi (Schrödinger, LLC, 2024). Autor: Analiis Veeremaa.

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ ELEKTROONILISEKS AVALDAMISEKS

Mina, Deelia Maivel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose *Saccharomyces cerevisiae* kontrolltöve sobivuse hindamine ribosomaalse valgu eS6 rolli uurimiseks IRES-vahendatud translatsioonis, mille juhendaja on Analiis Veeremaa, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, 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.

Deelia Maivel

25.05.2026