

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

**Ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12 ja eB13 puudumise mõju TOR  
signaalirajale pagaripärmis**

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia

12 EAP

Anett Põldes

Juhendaja PhD Ivan Kisly  
Kaasjuhendaja PhD Tiina Tamm

Tartu 2021

# INFOLEHT

## **Ribosoomi subühikutevaheliste eukariöodi sildade eB12 ja eB13 puudumise mõju TOR signaalirajale pagari pärmis**

Ribosoom on universaalne molekulaarne kompleks, mis koosneb ribosomaalsetest RNA-dest ja valgumolekulidest. Ribosoomi funktsioon on läbi viia translatsiooni ehk valkude sünteesi. Varasemalt on näidatud, et eukariöotse ribosoomi funktsionaalsus sõltub subühikutevaheliste eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 olemasolust (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). TOR signaalirada (Rapamütsiini sihtmärk) on toitainetundlik rada, mis reguleerib rakkude kasvu, ribosoomi biogeneesi, valkude sünteesi, autofaagiat ja lipiidide metabolismi (Loewith ja Hall, 2011; Adami *et al.*, 2007). Käesolevas uurimistöös analüüsitakse ribosoomi subühikutevaheliste eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puuduimise mõju TOR signaalirajale pagari pärmis.

Märksõnad: ribosoom, pagari pärm, ribosoomi subühikutevahelised sillad, eukariöodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13, translatsioon, TOR signaalrada

CERCS kood: P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

## **Effect of the ribosome intersubunit bridges eB12 and eB13 on the TOR signaling pathway in budding yeast**

Ribosome is an universal molecular complex, which consists of ribosomal RNA and protein molecules. The function of the ribosome is to perform translation which is also known as protein synthesis. It has previously been shown that the functionality of eukaryotic ribosome depends on the presence of eukaryotic-specific intersubunit bridges eB12 and eB13 (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). TOR signaling pathway (Target of Rapamycin) is a nutrient-sensitive pathway which regulates cell growth, ribosome biogenesis, protein synthesis, autophagy and lipid metabolism (Loewith and Hall, 2011; Adami *et al.*, 2007). The aim of the current thesis was to analyze whether the absence of eukaryote-specific bridges eB12 and eB13 in the ribosome affects the TOR signaling pathway.

Keywords: ribosome, budding yeast, ribosomal intersubunit bridges, eukaryote-specific bridges eB12 and eB13, translation, TOR signaling pathway

CERCS code: P320 nucleic acids, protein synthesis

# SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| SISUKORD .....  | 3  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....  | 5  |
| SISSEJUHATUS .....  | 6  |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....   | 7  |
| 1.1 Ülevaade <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ribosoomist.....   | 7  |
| 1.1.1 80S ribosoomi struktuur.....  | 7  |
| 1.1.2 Ribosoomi 40S subühik .....   | 8  |
| 1.1.3 Ribosoomi 60S subühik .....   | 10 |
| 1.2 Ribosoomi subühikutevahelised sillad .....  | 11 |
| 1.2.1 Ribosoomivalgud eL19 ja eL24 ja nende poolt moodustatavad<br>subühikutevahelised sillad B12 ja eB13 .....                   | 12 |
| 1.3 TOR signaalirada .....  | 14 |
| 1.3.1 TOR-i signaaliraja aktiivsuse määramine .....   | 19 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA .....  | 20 |
| 2.1 Töö eesmärgid.....  | 20 |
| 2.2 Materjal ja meetodika.....  | 20 |
| 2.2.1 Töös kasutatud tüved ja sööde.....  | 20 |
| 2.2.2 TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsimine pagaripärmi rakkudes .....   | 21 |
| 2.2.3 Rakkude lüüsimine .....   | 22 |
| 2.2.4 <i>Western blot</i> analüüs.....  | 23 |
| 2.3 Tulemused .....   | 24 |
| 2.3.1 Hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 ja Sky1 valkude tuvastamine<br><i>western blot</i> analüüsil .....                  | 24 |
| 2.3.2 TOR signaaliraja aktiivsus <i>S. cerevisiae</i> metsiktüüpi rakkudes.....   | 25 |
| 2.3.3 TOR signaaliraja aktiivsus <i>S. cerevisiae</i> eL19 kontrolltüves.....   | 27 |
| 2.3.4 TOR signaaliraja aktiivsus subühikutevahelise eukarüoodi spetsiifilise<br>silla eB12 puudumisel pagaripärmi ribosoomis..... | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.5 TOR signaaliraja aktiivsus subühikutevaheliste eukariooti spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumisel pagaripärmi ribosoomis ..... | 29 |
| 2.4 Arutelu .....   | 32 |
| KOKKUVÕTE .....   | 34 |
| RESÜMEE .....   | 35 |
| TÄNUSÕNAD .....   | 37 |
| KASUTATUD ALLIKAD .....   | 38 |
| LISAD .....   | 41 |
| LIHTLITSENTS .....  | 43 |

## KASUTATUD LÜHENDID

A-sait- aminoatsüülsait/ aktseptorsait transpordi RNA-le

CHX- tsükloheksimiid (ingl. *cycloheximide*)

eIF2- eukarüoodi initsiatsioonifaktor 2 (ingl. *eukaryotic initiation factor 2*)

E-sait- transpordi RNA väljumissait

h- väikses ribosoomi subühikus paiknev rRNA heeliks.

kDa- kilodalton

MDa- megadalton

mRNA- informatsiooni RNA (ingl. *messenger RNA*)

P-sait-peptidüülsait

RNA- ribonukleinhape

rpm- pöört minutis (ingl. *revolutions per minute*)

rRNA- ribosomaalne RNA (ingl. *ribosomal RNA*)

RT- ruumitemperatuur

r-valk- ribosoomivalk

SDS- naatriumlaurüülsulfaat (ingl. *sodium dodecyl sulfate*)

TCA- trikarboksüülhape (ingl. *tricarboxylic acid*)

tRNA- transpordi RNA (ingl. *transfer RNA*)

wt- metsiktüüp (ingl. *wild type*)

YPD- glükoosi sisaldav rikas sööde (ingl. *yeast extract + peptone + dextrose*)

## SISSEJUHATUS

Ribosoom on universaalne molekulaarne kompleks, mis koosneb ribosomaalsetest RNA-dest (rRNA) ja valgumolekulidest. Ribosoom viib läbi translatsiooni ehk valgu sünteesi. Käesolevas uurimistöös on mudelina kasutusel pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) 80S ribosoom. 80S ribosoom koosneb kahest subühikust, milleks on suur 60S subühik ja väike 40S subühik. Eukarüootse pagaripärmi 80S ribosoom koosneb neljast rRNA-st ja 79 valgust. Seitsmekümne üheksast valgust 33 on olemas kõikides organismides, 35 on ühised eukarüootidel ja arhedel ning 11 on eukarüoodi spetsiifilised (Ben-Shem, *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012; Ban *et al.*, 2014). Selleks et saaks toimuda translatsioon on vajalik subühikute assotsieerimine 80S ribosoomiks. Selle protsessi käigus moodustuvad subühikutevahelised sillad, mille funktsiooniks on kontrollida subühikutevahelist korrektset liikumist ehk roteerumist (Ben-Shem *et al.*, 2011; Tamm *et al.*, 2019).

TOR signaalirada on toitainetundlik rada, mis reguleerib rakkude kasvu, valkude sünteesi, ribosoomi biogeenis ja lipiidide metabolismi (Loewith ja Hall, 2011; Adami *et al.*, 2007). Signaalirada on rapamütsiini tundlik, sellest ka tema nimi rapamütsiini märklaud (ingl. *Target of Rapamycin*). Eelnevalt on teada, et Sky1 ja Ksp1 valkude fosforüülimise tase sõltub TOR signaaliraja aktiivsusest (Huber *et al.*, 2009). Teada on, et TOR signaaliraja inhibeerimisel rapamütsiini poolt toimub Sky1 ja Ksp1 valkude hüperfosforüülimine (Huber *et al.*, 2009). Tsükloheksimiid põhjustab TOR signaaliraja hüperaktiveerimist, seega Ksp1 ja Sky1 valgud on hüperfosforüülitud (Huber *et al.*, 2009). TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsimiseks kasutatakse inimese gripiviiruse hemaglutiniini antigeeni epitoobiga liidetud Ksp1-HA ja Sky1-HA valke, mida detekteeritakse *western blot* meetodil. Antud töö esimese eesmärgi raames uuriti, kas kõigis antud uurimistöös kasutatavates pagaripärmi tüvedes on võimalik tuvastada hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 ja Sky1 valke.

eL19 ja eL24 on eukarüoodi spetsiifilised ribosoomi valgud (r-valgud) mis on struktuuriliselt sarnased. Mõlemad valgud koosnevad kolmest domeenist: N-terminalne-, keskmine-, C-terminaalne domeen. C-terminaalsed  $\alpha$ -heelikaalsed domeenid moodustavad eB12 ja eB13 sillad. Mõlemate sildade olemasolu pole eluks hädavajalik, kuid nende puudumine mõjutab ribosoomi funktsionaalsust ja rakkude kasvu (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). eB12 ja eB13 sildade puudumisel on häiritud 80S ribosoomide moodustamine *in vitro* (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). Käesolevas uurimistöös teiseks eesmärgiks on analüüsida pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste eukarüoodi spetsiifiliste eB12 ja eB13 sildade puudumise mõju TOR signaalirajale.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Ülevaade *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomist

### 1.1.1 80S ribosoomi struktuur

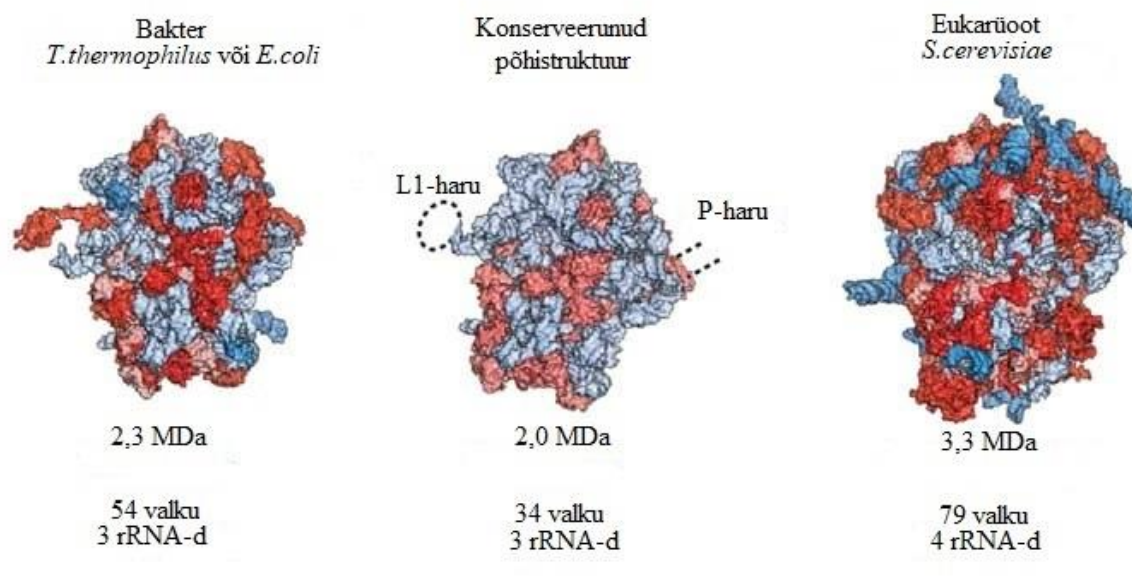
Ribosoom on universaalne molekulaarne kompleks, mille funktsiooniks on viia läbi valgusünteesi ehk translatsiooni. Translatsiooni protsessis kasutatakse valkude sünteesiks matriitsina (ingl. *template*) informatsiooni RNA ( mRNA ingl. *messenger RNA*) ja aminohapete kohale toomiseks transpordi RNA ( tRNA ingl. *transfer RNA*). Ribosoom koosneb väiksest subühikust ja suurest subühikust, mis omakorda koosnevad rRNA-dest ja valgumolekulidest. rRNA-d ja valgumolekulid on olemas kõikides elusorganismides ja nad moodustavad funktsionaalseid keskuseid ribosoomis, mis on olulised translatsiooni toimumisel. Ilma ribosoomideta ei saaks rakk elada, sest elus püsimiseks on vaja valke (Wilson ja Doudna, 2012; Woolford ja Baserga, 2013).

Kõikide elusorganismide ribosoomidel, nii prokarüootidel kui ka eukarüootidel on olemas konserveerunud põhistruktuur (Melnikov *et al.*, 2012) (Joonis 1). Ribosoomi konserveerunud põhistruktuur, mille massiks on ~2,0 MDa, koosneb 34 konserveerunud valgust ja kolmest rRNA molekulist. Kolmekümne neljast valgust 19 valku asuvad suures subühikus ja 15 valku väikses subühikus (Melnikov *et al.*, 2012). Konserveerunud põhistruktuuris paiknevad peamised ribosoomi funktsionaalsed keskused: peptidüültransferaasi tšenter, mRNA kanal, dekodeerimistsenter ja tRNA-si siduvad A, P ja E saidid (Melnikov *et al.*, 2012).

Pagaripärmi 80S ribosoomi molekulmass on 3,3 MDa (Joonis 1) ning see koosneb väikesest 40S subühikust ja suurest 60S subühikust. 80S ribosoom koosneb neljast ribosomaalsest RNA-st, milleks on 5S rRNA, 5,8S rRNA, 18S rRNA ja 25S rRNA. Lisaks sisaldab 80S ribosoom 79 valku, millest 33 on olemas kõigis elusorganismides, 35 on arhede ja eukarüoodi spetsiifilised ning 11 on eukarüoodi spetsiifilised (Joonis 1) (Ban *et al.*, 2014;Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013). Pagaripärmi ribosoomis ei arvestata konserveerunud valkude hulka P-valgud. Ribosoomi valgud, mida kokku on 79 jagunevad subühikute vahel, 46 valku suures subühikus ja 33 valku väikses subühikus (Wilson ja Doudna, 2012; Ben-Shem, *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012).

Ometi esineb prokarüootide ja eukarüootide ribosoomidel struktuurilisi erinevusi. Eukarüoodi ribosoom on keerukam ja 40% suurem võrreldes prokarüoodi ribosoomiga, kuna sisaldab eukarüoodi spetsiifilise valke, valkude domeene ja rRNA lisasegmente (Ben-Shem, *et al.*, 2011;

Melnikov *et al.*, 2012). rRNA lisasegendid on järjestused, mis on spetsiifilised eukariootsete rRNA molekulide jaoks (Ben-Shem, *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013). Enamus eukariotoodis spetsiifilisi osasi paiknevad ribosoomi pinnal ja nende olemasolu on tähtis, kuna see stabiliseerib ribosoomi struktuuri ning aitab šaperonide ja translatsioonifaktorite valkudel seonduda ribosoomiga (Dresios *et al.*, 2006).



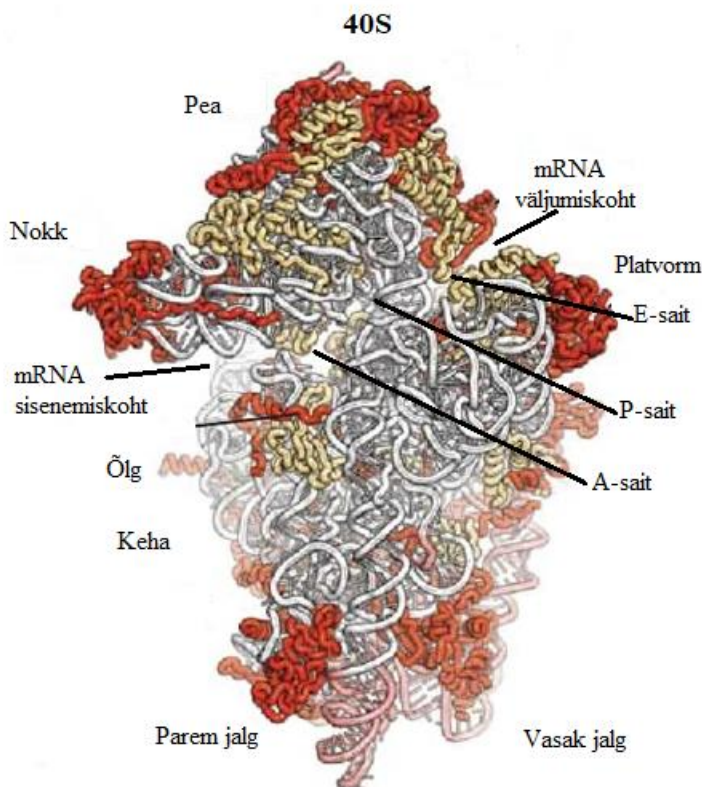
**Joonis 1. Ribosoomi võrdlus prokariootide ja eukariootide vahel, koos konserveerunud põhistruktuuriga.** Nii eukariootide kui ka prokariootide ribosoomidel on konserveerunud põhistruktuurid, mis koosnevad ribosomaalsetest RNA-dest (helesinine) ja valkudest (roosa). Joonisel on kujutatud ribosoomidel tumesiniselt prokariootide- ja eukariootide spetsiifilised rRNA järjestused ja punaselt valgud. Lisaks on näidatud iga ribosoomi mass megadaltonites (MDa) ja neis koosnevate valkute ja rRNA-de arv. ( Modifitseeritud Melnikov *et al.*, 2012 järgi.)

### 1.1.2 Ribosoomi 40S subühik

Pagaripärmi ribosoomi 40S subühik koosneb 18S rRNA-st ja 33 r-valgust (Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013). 18S rRNA on 1800 aluspaari pikk ning sisaldab kümnet eukariootide spetsiifilist lisasegmenti (Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013). Kolmekümne kolmest ribosoomivalgust 15 on konserveerunud, 12 on arhede- ja eukariootide spetsiifilised ja 6 on ainult eukariootide spetsiifilised (Ban *et al.*, 2014; Melnikov *et al.*, 2012). Ribosoomi 40S subühiku kolmedimensionaalsel struktuuril on olemas pea, nokk, platvorm, õlg,



jalad, keha, mRNA sisenemis- ja väljumiskoht ning A, P, E-saidid (Melnikov *et al.*, 2012; Yusupova *et al.*, 2001) (Joonis 2).



## Joonis 2. Eukarüoosi ribosoomi 40S subühik.

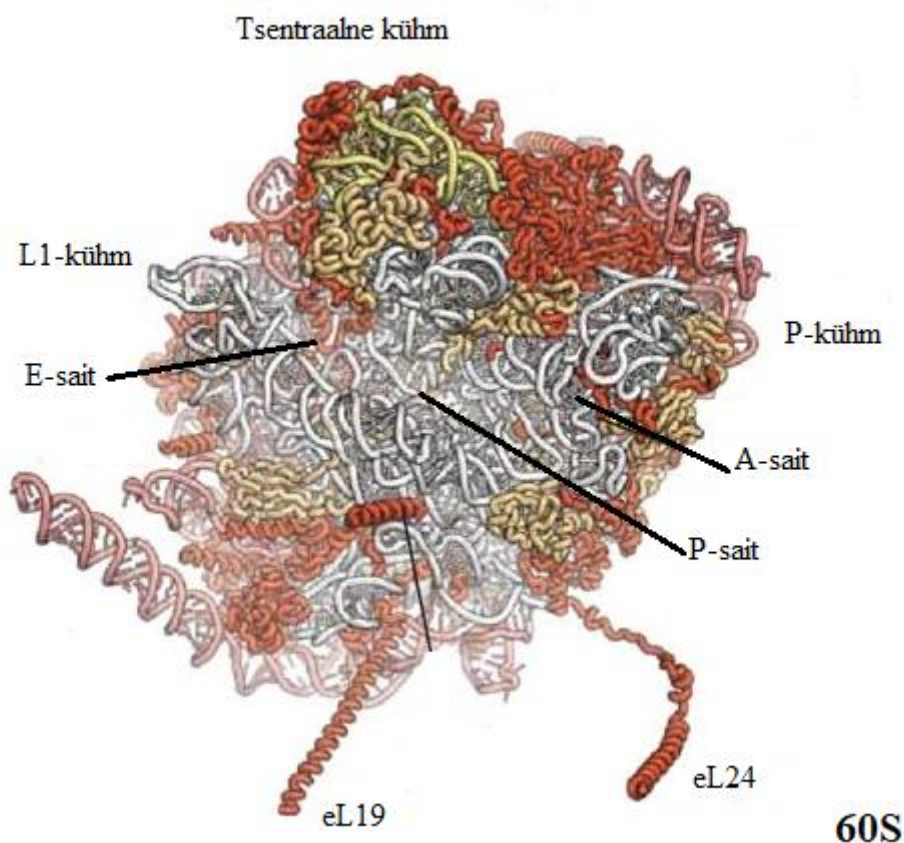
Joonisel on kujutatud 40S ribosoom. Konserveerunud põhistruktuur on kujutatud erinevate värvidega, valgega (rRNA) ja oranžiga (valgud). Eukarüoosi spetsiifilised rRNA lisasegmendid ja valgud on punased. Joonisele on lisatud 40S subühiku osad, milleks on pea, nokk, platvorm, vasak jalg, pareml jalg, keha ja õlg. Veel on näidatud, kus asuvad mRNA sisenemis- ja väljumiskoht, E-, P- ja A-saidid. ( Modifitseeritud Melnikov *et al.*, 2012 järgi.)

40S subühiku ülesandeks on translatsiooni initsiatsioonis siduda initsiatsioonifaktoreid (Melnikov *et al.*, 2012; Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012). Initsiatsioonifaktorid toovad endaga kaasa initsiaator tRNA, mis aitab start koodonit ära tunda üheaheelalises mRNA-s. Start koodoni peal toimub 40S ja 60S subühiku ühinemine (Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Elongatsiooni etapis on 40S subühikul suur roll, seal asub dekodeerimistsenter (Melnikov *et al.*, 2012). Protsessis edastab 40S subühik geneetilist teavet, valides mRNA koodonitele (kolm kõrvuti asetsevat nukleotiidi mRNA-s) vastavad õiged aminoatsüül-tRNA-d (Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012). tRNA-del on 40S subühikus tRNA seondumissaidid, milleks on A ehk aminoatsüül-(A)-sait (sisenemis sait) (A-sait), P ehk peptidüül-(P)-sait (P-sait) ja E ehk väljumis-(E)-sait (E-sait) (Melnikov *et al.*, 2012; Yusupova *et al.*, 2001).

40S süühikus asub ka mRNA kanal, millest liigub läbi üheaahelaline RNA, mille sisenemiskoht asub nokka ja öla vahel ning väljumiskoht asub pea ja platvormi vahel (Melnikov *et al.*, 2012; Yusupova *et al.*, 2001) (Joonis 2). mRNA kanalis toimub mRNA sekundaarstruktuuride lahtiarutamine, ilma selleta tekkiks translatsiooni aeglustumine või isegi peatumine (Chen *et al.*, 2013; Yusupova *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Ribosoomi 60S subühik

Pagaripärmi ribosoomi 60S subühik koosneb kolmest RNA-molekulist (5S rRNA, 5,8S RNA, 25S RNA) ja 46 valgust. (Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013; Ban *et al.*, 2014). 60S subühikus on 18 eukarüooidile iseloomuliku rRNA lisasegmenti. Neljakümne kuuest valgust 18 valku on konserveerunud, 23 on rahede ja eukarüootide spetsiifilised ja 5 on eukarüooidi spetsiifilised (Ban *et al.*, 2014). 60S subühikul on kroonilaadne struktuur, mis koosneb tsentraalsest kühmusest (ingl. *central protuberance*), L1-kühmusest (ingl. *L1-stalk*) ja P-kühmusest (ingl. *P-stalk*) (Melnikov *et al.*, 2012; Klinge *et al.*, 2011) (Joonis 3).



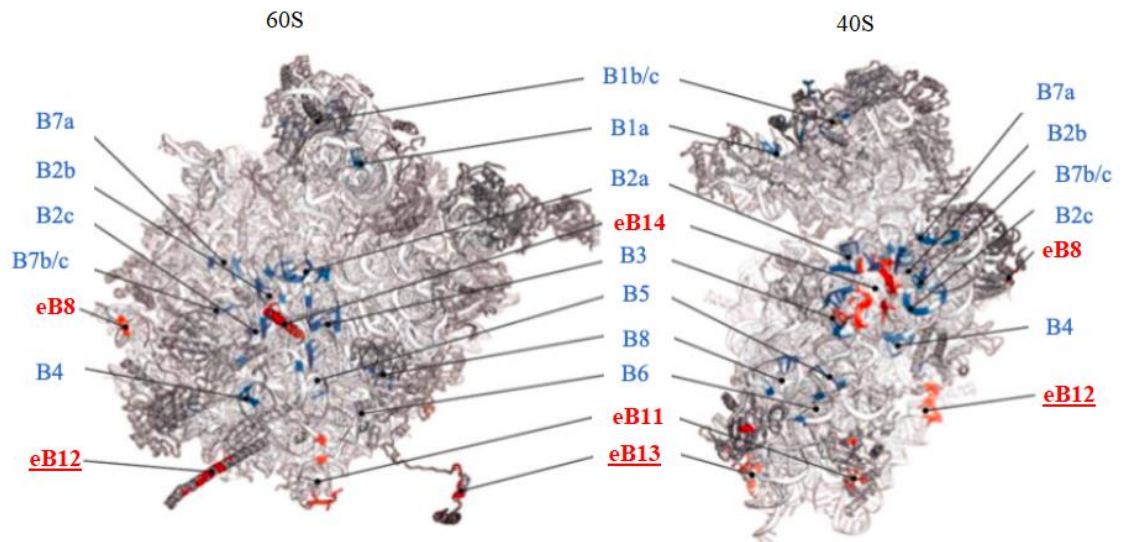
**Joonis 3. Eukarüooidi ribosoomi 60S subühik.** Joonisel on kujutatud 60S ribosoom. Konserveerunud põhistruktuur on kujutatud värvidega, valgega (rRNA) ja helearanžiga (valgud). Eukarüooidi spetsiifilised osad punaselt. Märgitud on 60S subühiku osad: A, P, E-saidid, P ja L1 kühmused, tsentraalne kühm. R-valgud eL24 ja eL19 on käesolevas töös olulised. (Modifitseeritud Melnikov *et al.*, 2012 järgi.)

60S subühikus paiknevad A, P ja E-saidid, kus toimub tRNA seondumine (Melnikov *et al.*, 2012; Woolford ja Baserga, 2013). Translatsiooni initsiatsiooni etapis moodustub 80S ribosoom initsiatsioonifaktorite kaasabil. Kui hakkab toimuma translatsioon elongatsiooni etapp, siis ribosoomi sisenev aminotsüül-tRNA seondub A-saidiga. P-sait hoiab tRNA-d, mis kannab moodustavat polüpeptiidahelat ja E-saidis toimub tRNA väljumine ribosoomist (Melnikov *et al.*, 2012). 60S subühiku tähtsamaks osaks on peptidüültransferaasi keskus, kus katalüüsitakse peptiidside moodustumist (Wilson ja Doudna, 2012; Cech, 2000; Woolford ja Baserga, 2013)

## 1.2 Ribosoomi subühikutevahelised sillad

80S ribosoom koosneb 40S ja 60S subühikust. Selleks et 80S ribosoom moodustuks ja translatsiooni saaks toimuda on vaja, et toimuks subühikutevaheline assotsieerimine. Subühikute assotsieerumisel moodustuvad subühikutevahelised sillad, mida eukarüootses ribosoomis on 17 (Tamm *et al.*, 2019; Ben-Shem, *et al.*, 2011; Kisly *et al.*, 2016) (Joonis 4). Subühikutevahelistel sildadel esinevad kolme tüüpi ineteraktsioonid, mille abil saab toimuda subühikutevaheline ühinemine. Nendeks on valk-valk, rRNA-rRNA ja rRNA-valk interaktsioonid (Ben-Shem, *et al.*, 2011; Tamm *et al.*, 2019; Kisly *et al.*, 2016) (Joonis 4). Kõiki eelnevaid interaktsioone sisaldavad subühikutevahelistest sildadest 12, mis on konserveerunud kõikides elusorganismide ribosoomides ja paiknevad ribosomaalsete funktsionaalsete keskuste lähedalt. Sillad abistavad ribosoomi funktsionaalseid keskuseid (Yusupov *et al.*, 2001; Kisly *et al.*, 2019). Eukarüoodi spetsiifilisi sildasid on 5 ja nendest neli paiknevad ribosoomis perifeersetes regioonides. Need sillad omavad rRNA-valk ja valk-valk tüüpi interaktsioone (Ben-Shem *et al.*, 2011; Kisly *et al.*, 2016) (Joonis 4).

Subühikutevaheline interakteerumine mängib suurt rolli initsiatsiooni ja elongatsiooni käigus (Tamm *et al.*, 2019). Translatsiooni initsiatsiooni toimumiseks on vaja, et subühikud ühineksid start koodonis. Subühikute ühinemine toimub initsiatsiooni lõppfaasis kui preinitsiatsiooni kompleks on jõudnud start koodonini ning toimub start koodoni äratundmine. Translatsioonis elongatsiooni käigus toimub subühikute omavaheline roteerumine (liikumine üksteise suhtes), mis tagab translatsioon. Translokatsioon on ribosoomi liikumine polüpeptiidahela sünteesil mööda mRNA-d tripeletite kaupa. Translokatsiooni käigus tRNA-d liiguvad ribosoomi sees: A saidist P saiti ja P saidist E sait (Noller *et al.*, 2017; Frank *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2013).

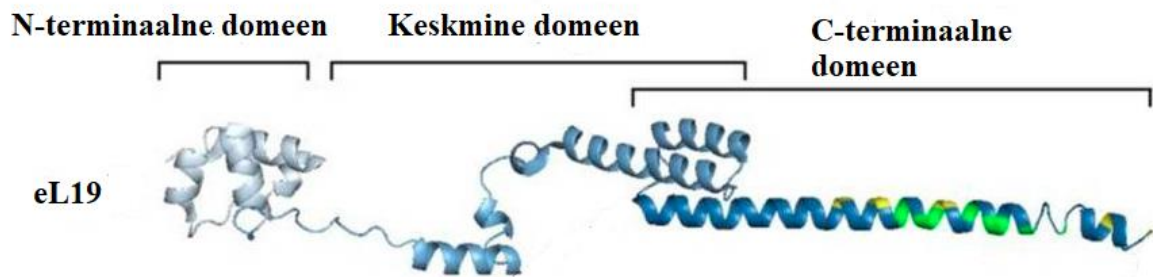


**Joonis 4. Subühikutevahelised sillad pagaripärmi ribosoomis.** Joonisel on kujutatud 60S subühik vasakul, 40S subühik paremal, sinisega on tähistatud konserveerunud sillad, punasega on tähistatud eukariöodi spetsiifilised sillad. Sillad eB12 ja eB13 on alla joonitud, kuna neid uuritakse käesolevas töös ( Modifitseeritud Ben-Shem *et al.*, 2011 järgi.)

### 1.2.1 Ribosoomivalgud eL19 ja eL24 ja nende poolt moodustatavad subühikutevahelised sillad B12 ja eB13

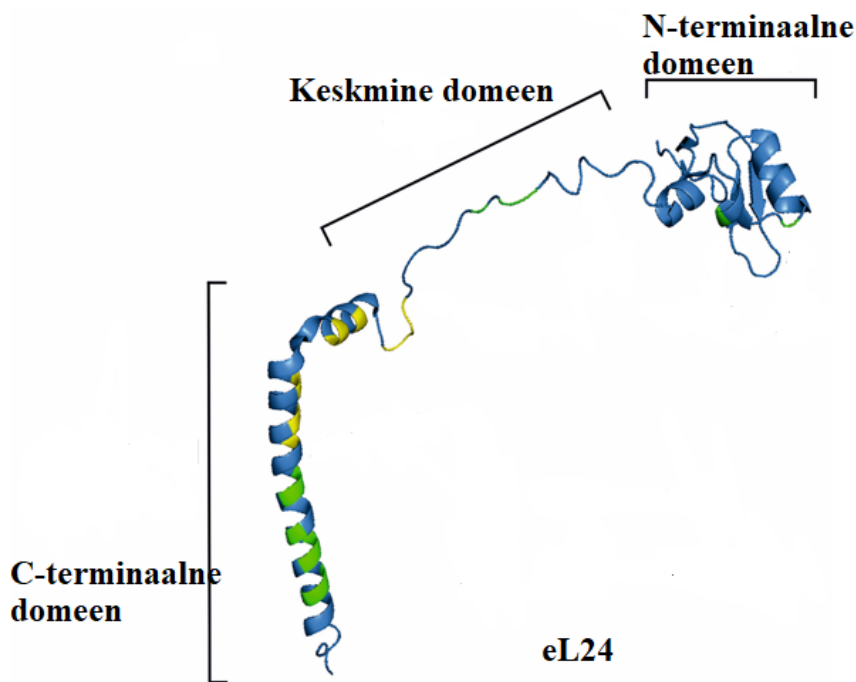
Ribosoomi valgud eL19 ja eL24 on eukariöodi spetsiifilised r-valgud, mis osalevad sildade eB12 ja eB13 moodustamisel (Tamm *et al.*, 2019) (Joonis 3) (Joonis 4). eB12 ja eB13 sillad, kuna nende põhikomponentideks on pikad eL19 ja eL24 r-alkude  $\alpha$ -heeliksid. Need heeliksid on näha 60S ja 40S subühiku juures, kus nad ulatuvad välja üks A-saidi ja teine E-saidi poolsest osast (Joonis 4). eB12 ja eB13 sildade puudumisel on häiritud 80S ribosoomi moodustumine *in vitro*. (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). Mõlemad sillad ei ole eluks hädavajalikud, kuid nende puudumine mõjutab ribosoomi funktsionaalsust ja rakkude kasvu (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019).

eL19 koosneb N-terminaalsest, keskmisest- ja C-terminaalsest domeenist (Joonis 5). eL19 N-terminaalne ja keskmine domeen on tähtsad, et toimuks pre-rRNA õige lõikamine. C-terminaalne domeen on oluline eB12 silla moodustamisel (Kisly *et al.*, 2016). Subühikutevahelise eB12 silla moodustavad C-terminaalne domeen kontaktis 18S rRNA lisasegmendiga ja eS7 või uS17 r-alkuga. eS7 ja uS17 r-alku funktsioon on stabiliseerida silda (Kisly *et al.*, 2016).



**Joonis 5. Valgu eL19 struktuur.** Joonisel on kujutatud eL19 valgus struktuuri, milleks on N-terminaalne domeen, keskmine domeen ja C-terminaalne domeen. Joonisel on roheline ja kollasega kujutatud aminohapped, mis osalevad silla moodustamisel. ( Modifitseeritud Kisly *et al.*, 2016 järgi.)

eL24 on eL19 valguga struktuuriliselt sarnased. Valgud erinevad üksteisest domeenide funktsioonide poolest. eL24 valgus N-terminaalne domeen osaleb translatsiooni initsiatsiooni etapis *in vitro* (Kisly *et al.*, 2019). Subühikutevahelise eB13 silla moodustavad keskmine domeen ja C-terminaalne domeen interaktsioonis eS6 r-valguga ja 18S rRNA heeliksiga (h10, h6 ja h44) (Ben-Shem *et al.*, 2011; Kisly *et al.*, 2019). eL24 ei ole eluks hädavajalik. Samas eL24 valgus N-terminaalse domeeni olemasolu on pärmi rakkudele hädavajalik kui puudub funktsionaalne eB12 sild (Kisly *et al.*, 2019) (Joonis 6).



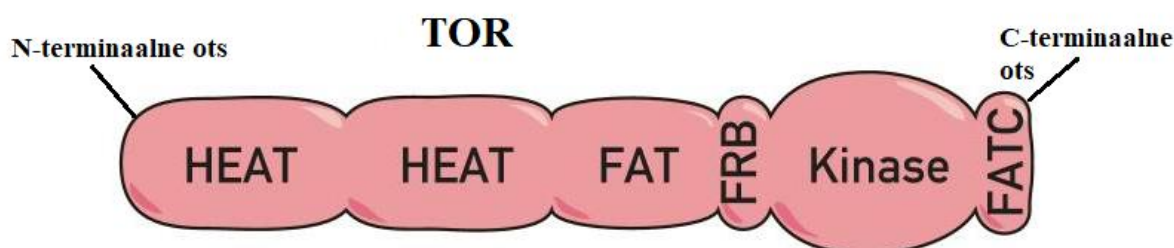
**Joonis 6. Valgu eL24 struktuur.** Joonisel on kujutatud eL24 valgu struktuur, milleks on N-terminaalne domeen, keskmine domeen ja C-terminaalne domeen. Joonisel on näidatud kollase ja rohelisega aminohapped, mis osalevad silla moodustumisel ( Modifitseeritud Kisly *et al.*, 2019 järgi.)

### 1.3 TOR signaalirada

TOR-i signaaliraja olulisus väljendub rakutsükli regulatsioonis. See on toitainetundlik rada, mis kontrollib rakkude kasvu ja vananemist (Loewith ja Hall, 2011; Adami *et al.*, 2007). Signaalirada mõjutab antibiootikum rapamütsiin, mis pärssib selgroogsetel organismidel immuunsust, blokeerides T-abistajarakkude signaalide edasikandumist. Rapamütsiin on looduslik sekundaarne metaboliit ja lipofiilne makroliid, mis kontrollib rakkude kasvu. Sellest tuleneb ka nimi TOR-i signaalirada ehk rapamütsiini märklaud (Rapamütsiini sihtmärk, ingl. *Target of Rapamycin*). Kui TOR signaalirada tajub keskkonnategurite (toitainete) muutust siis toimub rakkude retseptorite abil raja inaktiveerumine. Toitainete vähesuse tõttu pole mõtet energiat kulutada täielikult TOR signaaliraja funktsioneerimiseks. Teise võimalusena tekitada rakkudes TOR signaaliraja inaktiveerimist on rapamütsiiniga. Sellest tingituna kaaperdab rapamütsiin TOR-i rajas paikneva FKBP12-valgu kompleksi, et suhelda selle kaudu TOR kompleksiga ja pärssida rakutsükli edasist tööd, peatades kasvu rakutsükli G1 varajases faasis. FKBP on kasvu jaoks mitteoluline kofaktor ja retseptor, mida mõjutab rapamütsiin ( Loewith ja Hall, 2011). Rapamütsiin-FKBP12 kompleks mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust ja sellest tingituna toimub translatsiooni pärssimine. See kutsub esile füsioloogilised muutused, mis

esinevad ka statsionaarsesse faasi sisenevatel näljas olevatele rakkudele (G0). TOR signaaliraja aktivatsioonis toimuvad muudatused on seotud paljude haigustega, nagu näiteks diabeet, vähkkasvajad, rasvumine ja neurodegeneratsioon. TOR-i raja avastamisele ja funktsiooni selgitamisele mängis suurt rolli pärm *Saccharomyces cerevisiae* (Loewith ja Hall, 2011).

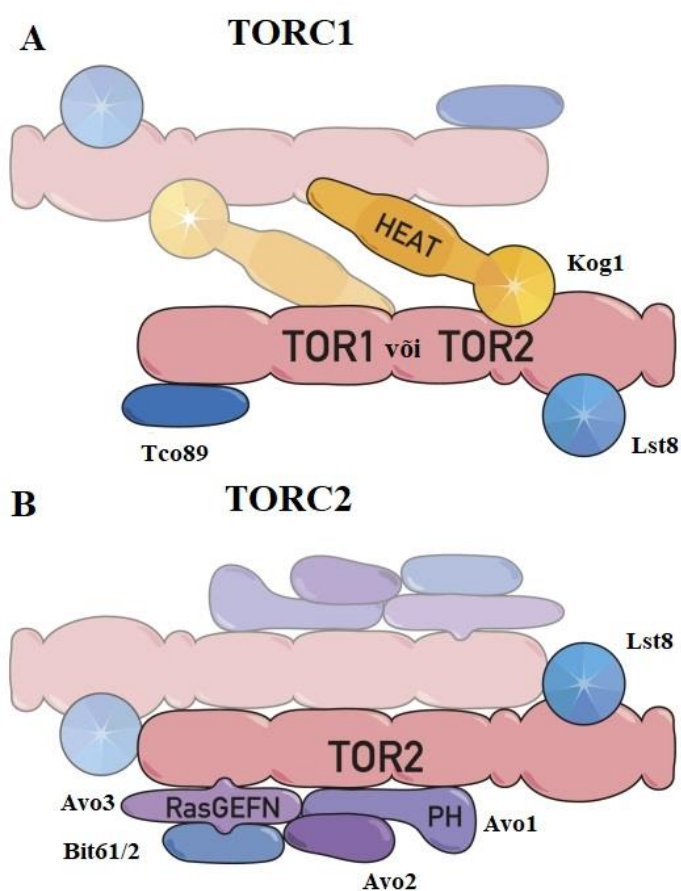
TOR kompleksid on oma domeenistruktuuri poolest sarnased. Nii TORC1 valgu kompleks kui ka TORC2 valgu kompleks koosnevad struktuuriliselt konserveerunud TOR1 ja TOR2 valgukinaasidest. TOR1 ja TOR2 kinaasid hoiavad esimest kompleksit koos ja on üksteisega 67% identsed (Loewith ja Hall, 2011). TOR kinaaside N-terminaalses osas on kaks HEAT-korduste plokki. HEAT-kordustele järgnevad FAT-domeen, FRB-domeen, kinaasi domeen ja FATC-domeen (Joonis 7). FAT domeen sisaldab modifitseeritud kordusi, mis on teisendatud HEAT-kordustest. FRB domeen annab täieliku resistentsuse FKBP12-rapamütsiin kompleksi suhtes, kuna seal asub FKBP-12 seondumise koht. Seondumiskohas tekkinud mutatsioonid takistavad täielikult rapamütsiini sidumist ja ei mõjuta TOR signaaliraja aktiivsust. Kinaasi domeeni ülesandeks on fosforüülida seriini ja treoniini jääke valgusubstraatides. FATC domeen asub alati FAT- domeeni C-terminaalses osas ja on vajalik kinaasi aktiivsuse jaoks (Joonis 7).



**Joonis 7. Konserveerunud TOR valgu struktuur.** TOR valgu struktuur koosneb domeenidest, mis on järjestiku paigutatud. Joonisele on illustreeritud HEAT-kordused, FAT-, FRB-, kinaasi- ja FATC-domeenid ( Modifitseeritud Loewith ja Hall, 2011.)

TOR signaaliraja esimene kompleks on TORC1, mis on dimeerne ja osaleb kasvukontrollis ning on rapamütsiinitundlik. TORC1 kompleks omakorda sisaldab Kog1, Tco89, Lst8 ja kas TOR1 või TOR2 (Loewith *et al.*, 2002; Wedman *et al.*, 2003) (Joonis 8A). Kõik TORC1 kompleksi valke saab pärssida rakusise retseptor FKBP12-rapamütsiini kompleksiga, mis näitab et kompleks ei kahjusta TORC1 struktuurilist terviklikkust (Loewith *et al.*, 2002; Loewith ja Hall, 2011). FKBP mõjutab otseselt TORC1 kompleksis TOR1 või TOR2 kinaase, millest tingituna inhibeerib TOR signaaliraja raja aktiivsust. Kog1 on vajalik TOR1 ja TOR2 kinaaside seondumiseks ja seda kasutavad erinevad valgud. Kog1 seondumine TOR

kinaasidega on aga keeruline, sest enne seda seondumist seondub Kog1 paljude teiste valkude domeenidega. Lst8 funktsioon on stabiliseerida TORC1 kompleksiga seondumist TOR1 või TOR2 kinaasidega. EGO-kompleks asub rakus lüsoosoomi membraanil ja tunnetab aminohapete hulga muutust rakus. Kui aminohapete hulk rakkudes väheneb saadab EGO-kompleks signaali TORC1 kompleksile, reguleerides aktiivsust ülesvoolu nii negatiivselt kui ka positiivselt. Signaali vahendajaks on Tco89 ( Loewith ja Hall, 2011, Binda *et al.*, 2009). EGO-kompleks koosneb neljast valgust (Ego1, Ego3, Gtr1 ja Gtr2), kus Gtr1/Gtr2 on Ras-perekonna GTPaasid ning on TORC1 kompleksi aktivaatorid (Kim *et al.*, 2008). TORC1 kompleks on aktiivne, kui raku kasvutingimused on sobivad ja elukeskkonnas ei leidu rapamütsiini (Loewith ja Hall, 2011; Huber *et al.*, 2009) (Joonis 8).



**Joonis 8. TORC1 ja TORC2 kompleksite skeem.** Joonisel A on kujutatud TORC1 kompleks ja selle kompleksi koostises paiknevad valgud: TOR1/TOR2, Kog1, Lst8 ja Tco89. Joonisel B on kujutatud TORC2 kompleks ja seda kompleksi moodustuvad valgud: TOR2, Lst8, Avo1, Avo2, Avo3 ja Bit61/2 ( Modifitseeritud Loewith ja Hall, 2011.)

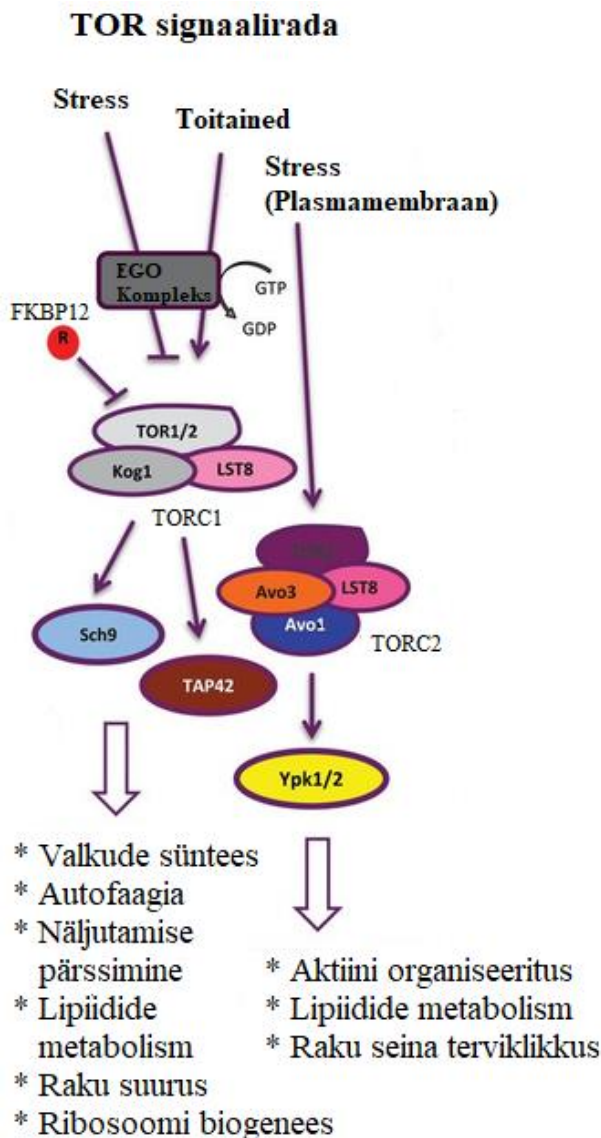
TOR signaaliraja teine kompleks on TORC2, mis on multimeer ja rapamütsiini suhtes tundetu. TORC2 on rapamütsiinitundetu, sest FKBP-rapamütsiin seondub ainult TORC1 kompleksiga. TORC2 kompleks koosneb TOR2-st, Avo1-st, Avo2-st, Avo3-st, Bit61/2 ja Lst8-st. Valk Avo1 kaitseb TORC2 kompleksi FKBP-rapamütsiini kompleksi eest, maskeerides FKBP-



rapamütsiini seondumiskohta. Lst8 stabiliseerib TOR2 ja on vajalik selleks, et TOR2 kinaas oleks aktiivne. Avo1 ja Avo3 valkudes on autofosforüülivad saidid ehk kinaas fosfolüürib iseennast. Nende funktsioon pole tänapäeval teada. Lisaks seonduvad valgud Avo1 ja Avo3 TOR2 kinaasi N-terminaalse HEAT-regiooniga, et moodustada terviklik TORC2 kompleks. Avo2 aitab TORC2 seonduda plasmamembraaniga. Samuti pole teada Bit61/2 täpset funktsiooni (Loewith ja Hall, 2011) (Joonis 8).

TOR-id on jagatud erinevatesse signaaliharudesse, mis koosnevad erinevatest efektorradadest ja kontrollivad ühiselt rakkude massi, läbi erinevate mõjutuste kaudu (toitained ja stress). TORC1 signaaliraja aktiivsus on mõjutatud vastusena keskkonnategurites, näiteks toitainetest. TORC1 on tundlik aminohape, lämmastiku ja glükoosisisalduse muutusest ning nende ainete puudumisel pärsib signaaliraja. Rapamütsiiniga mõjutades vallandub samasugune vastus, mis toitainete näljaga. Rapamütsiini seondumine FKBP12 valgu kompleksiga ja TOR1 või TOR2-ga põhjustab translatsiooni initsiatsiooni märkimisväärset vähenemist mõjutades initsiatsioonifaktor 2 (eIF2) ning G1 faasi peatumist läbi erinevate regulatsioonide. EGO kompleks on TORC1 reguleerija, mis edastab toitainete muutustest tingitud signaale Tco89 valgu abil TORC1-le. Rakud lõpetavad jagunemise, aeglustavad ainevahetuse ja liiguvad G0-olekusse kui keskkonnatingimused pole kasvuks sobivad. Seda nimetatakse TORC1 ülesvoolu regulatsiooniks. Lisaks reguleerib signaaliharu läbi substraatide Sch9 ja Tap42: valkude sünteesi ja lagundamist, lipiidide metabolismi, näljutamise pärssimist, mRNA sünteesi ja lagundamist, ribosoomide biogeneesi, toitainete transporti ja autofaagiat (ehk rakusiseste komponentide lagundamine) (Joonis 9). TORC1 peamiseks funktsiooniks on translatsiooni reguleerimine vastusena keskkonnateguritele. Sobilik keskkonna olemasolule fosforüülib ja aktiveerib TORC1 Sch9 substraadi ja toimub ribosoomi biogenees, mis on eelduseks efektiivseks translatsiooniks (Urban *et al.*, 2007). See regulatsioon on mõjutatav rapamütsiin-FKBP12 kompleksi poolt. Ribosoomi biogeneesi regulatsioon toimub paralleelselt läbi kahe teguri substraadi Sch9 ja transkriptsiooni faktori Sfp1 kaudu. Kui keskkond pole sobilik reguleerib fosforüülitud Sfp1 negatiivselt TORC1 aktiivsust ja see omakorda inhibeerib Sch9, millest tingituna toimub ribosoomi biogeneesi vähenemine (Lempiäinen *et al.*, 2009; Loewith ja Hall, 2011). Sellest tingituna reguleeritakse ribosoomide koostisse kuuluvaid komponente, väheneb rRNA, tRNA ja r-valkude kogus ja see mõjutab translatsiooni aktiivsust negatiivselt (Powers ja Walter, 1999). Sch9 inhibeerimine põhjustab RNA Pol(I) ja Pol(III) aktiivsuse vähenemist, mille tagajärjel 5S ja 35S rRNA tootmine langeb (Powers ja Walter, 1999; Loewith ja Hall, 2011). 35S rRNA transkriptsiooni langus põhjustab 18S, 5,8S ja 25S rRNA molekulide langust rakkus (Powers ja Walter, 1999). Tap42 reguleerib translatsiooni alustamist, kui TOR

signaalirada on aktiivne on Tap42 valk seotud valgu fosfotaasi 2A alühikutega (PP2A), mille kaudu reguleeritakse translatsiooni algatamist. Kui TOR signaalirada on inaktiveeritud toimub Tap42 valgu ja PP2A allüksuste lahkumine, translatsiooni ei alustata (Cardenas *et al.*, 1999). Tap42 fosforüülimine toimub Tor2 kinaasi poolt. Eelnevalt mainitud regulatsioonid nimetatakse TORC1 allavoolu regulatsiooniks. Seda signaaliharu peetakse rakkude kasvu ajalise kontrolli vahendajaks (Loewith ja Hall, 2011) (Joonis 9).



**Joonis 9. TOR signaalirada.** Joonisel on kujutatud TORC1 ja TORC2 signaaliradasid. TORC1 kompleksi mõjutavad toitained ja ta reguleerib valkude sünteesi, autofaagiat, näjutamise pärssimist, lipiidide metabolismi, ribosoomi biogeneesi ja raku suurust. Kui aga TORC1 kompleksiga seondub rapamütsiin-FKBP12 kompleks siis see inhibeerib TORC1 kompleksi aktiivsust. TORC2 mõjutab stress ja ta reguleerib aktiini organiseeritus, lipiidide metabolismi ja rakuseina terviklikkust. TORC2 on rapamütsiini suhtes tundetu ( Modifitseeritud Henriques *et al.*, 2014.)

Teiseks signaaliharuks on TOR2 unikaalne haru, mis reguleerib aktiini tsütoskeletti rakkude polarisatsiooni, endotsütoosi (ehk vesiikulite abil väliskeskkonnast makromolekulaarste komponentide omastamine) ja sfingolipiidide sünteesi. See signaaliharu kontrollib rakkude kasvu ruumiliselt (Loewith ja Hall, 2011) (Joonis 9).

### **1.3.1 TOR-i signaaliraja aktiivsuse määramine**

Sch9 on AGC perekonna valgukinaas ja TORC1 otsene substraat. TORC1 fosforüülib Sch9 kuut jääki (Thr737, Thr723, Ser726, Ser758, Ser765 ja Ser711) mis asuvad C-terminaalses osas (Loewith ja Hall *et al.*, 2011). TORC1 poolt fosforüülimine on vajalik Sch9 aktiivsuse jaoks. Sch9 valgukinaas on aktiivne ka siis kui TORC1 kompleksil puudub ülesvoolu stiimul (Urban *et al.*, 2007). Kui fosforüülitavad treoniini ja seriini jäägid asendataksealaniiniga muutub Sch9 mittefunktsionaalseks (Urban *et al.*, 2007). Sch9 vahendab TORC1 kompleksilt saadud signaale muutub läbi mitmete mõjutuste kaudu: blokeerib G0-rakufaasi sisenemiseks vajalike valkude fosforüülitust ja antagoniseerimist. Fosforüülitatud Sch9 on vajalik efektiivse translatsiooni initsieerimise säilitamiseks ja ribosoomi biogeneesiks vajalike RNA polümeraas II sõltuvate geenide reguleeritud ekspressiooniks (Urban *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2009). TOR-i aktiivsust mõõdetakse valgualanalüüsi (*western blot*) meetodi abil, kus vaadeldakse TORC1 substraadi Sch9 valgu fosforüülimist (Loewith ja Hall, 2011 ; Urban *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2009). Aktiivne Sch9 fosforüülib järgmisi märklaudvalke nagu näiteks Ksp1 ja Sky1, mille funktsioonideks on geeniekspressiooni regulatsioon. Sch9 märklaudvalkude fosforüülimist on varasemalt uuritud ja saadud teada, et tsükloheksimiidiga töödeldes toimub Ksp1 ja Sky1 valkude aeglasem liikumine geelelektroforeesil, mis viitab ülefosforüülimisele. Rapamütsiiniga töödeldes toimub nende valkude kiirem liikumine geelelektroforeesil, kuna valgud on hüpofosforüülitatud (Huber *et al.*, 2009).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud töös uuritakse seda, kuidas eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumine mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust pagaripärmi rakkudes. eL19 ja eL24 on eukarüoodi spetsiifilised r-valgud, mis on struktuuriliselt sarnased ja koosnevad kolmest domeenist (N-terminaalne domeen, keskmine domeen ja C-terminaalne domeen). Valkudel on olemas domeenid, mis on arhede/eukarüoodi-spetsiifilised ja domeenid, mis on omased ainult eukarüootidele (Tamm *et al.*, 2019). Eukarüoodi spetsiifilised domeenid moodustavad sildasid eB12 ja eB13. Mõlemad sillad ei ole eluks hädavajalikud, aga nende puudumine mõjutab ribosoomi funktsionaalsust ja rakkude kasvu (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). On teada, et eB12 ja eB13 sildade puudumisel on häiritud 80S ribosoomide moodustamine *in vitro* (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). Sild eB13 mängib suurt rolli translatsiooni initsiatsioonis ja elongatsioonis (Kisly *et al.*, 2019). Totaalse proteoomi analüüsil nähti, et sildade puudumisel väheneb r-valkude kogus, mis võib olla põhjustatud TOR raja aktivatsiooni vähenemisest (Kisly, Remme ja Tamm, avaldamata andmed). Selleks, et analüüsida TOR raja aktiivsust, vaadeldakse Sky1-HA ja Ksp1-HA valkude fosforüülimist *western blot* meetodil (Huber *et al.*, 2009). Selle põhjal püstitati eesmärgid:

1. Välja selgitada, kas pagaripärmi tüvedes on võimalik tuvastada HA epitoobi järjestusega liidetud Ksp1 või Sky1 valkude ekspressiooni.
2. Analüüsida, kas rakkudes, mille genoomist on kustutatud paraloogilised *RPL19A* ja *RPL19B* geenid ja eL19A metsiktüüpi variant ekspresseerub plasmiidilt on TOR signaaliraja aktiivsus muutunud muutnud.
3. Analüüsida TOR signaaliraja aktiivsust pagaripärmi rakkudes ribosoomi eB12 ja eB13 sildade puudumisel.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud tüved ja sööde

Käesolevas töös kasutatud pagaripärmi tüved on välja toodud tabelis 1.

Pagaripärmi rakkude kasvatamiseks kasutati glükoosi sisaldavat rikas söödet (YPD) (1% *Bacto* pärmiekstrakt, 2% glükoos ja 2% *Bacto* peptoone). Pärmide kasvatamisel vedelsöötmes areeriti kultuure loksutil (*Infors HT Multitron*) 30 °C juures, 180 pööret minutis (rpm). Tardsöötme valmistamiseks lisati vedelsöötmele 2% agarit.

**Tabel 1. Töös kasutatud pagaripärmide tüved.**

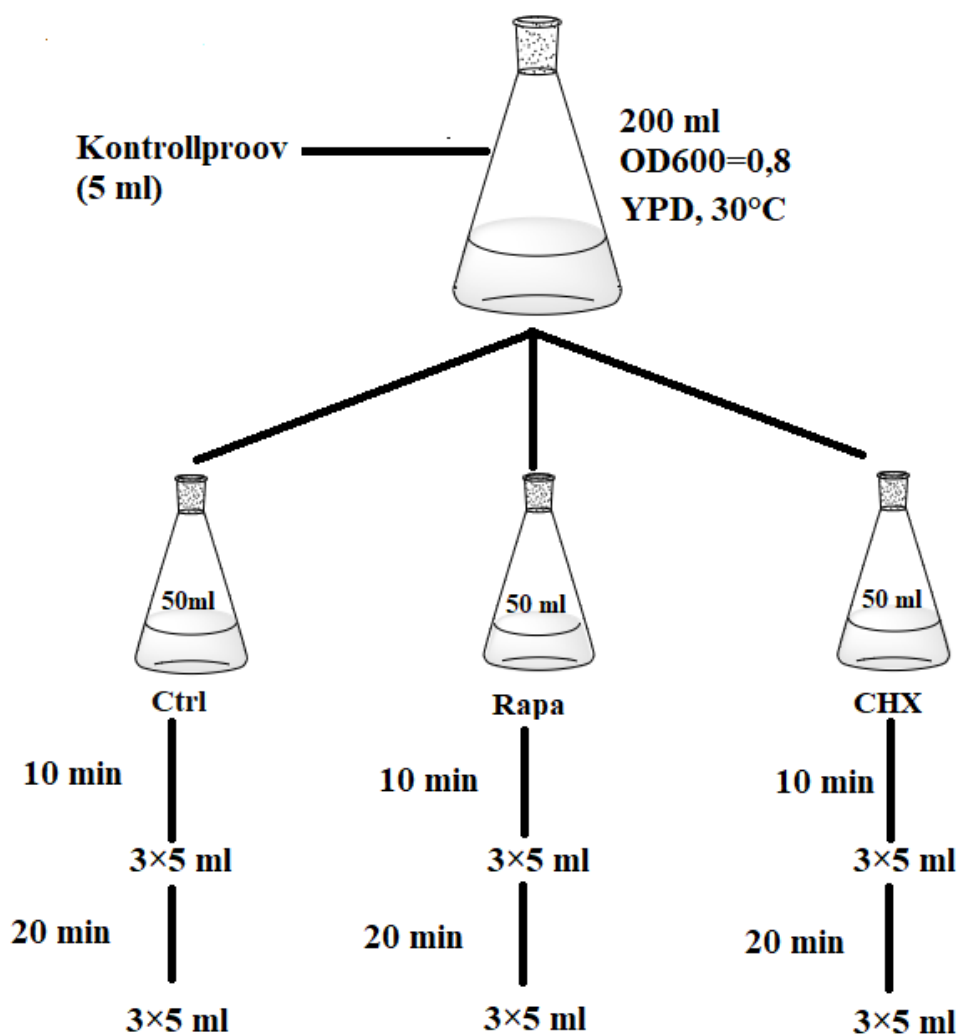
Kõik tüved on pärit labori kollekttsioonist (tehtud prof. Tiina Tamme poolt) ja on konstrueeritud S288C tüve baasil.

| Tüve number | Tüve nimi          | Genotüüp  |
|-------------|--------------------|---|
| TYSC309     | WT                 | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>   |
| TYSC660     | WT/KSP1-HA         | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 KSP1-HA::HIS3MX6</i>  |
| TYSC661     | WT/SKY1-HA         | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 SKY1-HA::HIS3MX6</i>  |
| TYSC669     | eL19/KSP1-HA       | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 KSP1-HA::HIS3MX6 [pRS315-RPL19A]</i>  |
| TYSC682     | eL19/SKY1-HA       | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 SKY1-HA::HIS3MX6 [pRS315-RPL19A]</i>  |
| TYSC671     | ΔeB12/KSP1-HA      | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 KSP1-HA::HIS3MX6 [pRS315-rpl19A<sub>1-146</sub>]</i>  |
| TYSC683     | ΔeB12/SKY1-HA      | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 SKY1-HA::HIS3MX6 [pRS315-rpl19A<sub>1-146</sub>]</i>  |
| TYSC685     | ΔeB12ΔeB13/KSP1-HA | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6 KSP1-HA::HIS3MX6 [pRS315-rpl19A<sub>1-146</sub>] [pRS314-rpl24A<sub>1-65</sub>]</i> |
| TYSC684     | ΔeB12ΔeB13/SKY1-HA | <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6 SKY1-HA::HIS3MX6 [pRS315-rpl19A<sub>1-146</sub>] [pRS314-rpl24A<sub>1-65</sub>]</i> |

## 2.2.2 TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsimine pagaripärmi rakkdes

Pagaripärmi rakke kasvatati üleöö 15 ml YPD vedelsöötmes. Üleöö kultuur lahjendati 200 ml YPD söötmesse optilise tiheduseni (OD600) 0,25 ning kasvatati loksutil eksponentsiaalse kasvufaasini (OD600=0,8) (Joonis 10). Kultuurist võeti kontrollproov (5 ml). Ülejäänud kultuur jagati kolmeks 50 ml kultuuriks. Esimesele kultuurile lisati rapamütsiini (firma *Sigma-Aldrich*) lõppkontsentratsioonini 200 nM. Teisele kultuurile lisati tsükloheksimiidi (firma *Sigma-Aldrich*) lõppkontsentratsioonini 25 µg/ml. Kolmandale kultuurile lisati 10 µl lahust A (86% EtOH, 10% Tween-20). Rakke kasvatati loksutil 30 °C juures, 180 rpm. Peale 10 min ja 20 min kasvatamist kultuuridest võeti proovid (5 ml). Kõikidest proovidest koguti rakud

tsentrifuugimise teel (*Hettich Rotina 420R* tsentrifuug, rootor 4732 *Swing-out*) 2 min 3200 rpm 4°C. Rakud pesti 900 µl külma mQ H<sub>2</sub>O-ga (13000 rpm, 1 min, 4°C, *Heraeus Biofuge Fresco*). Supernatant eemaldati, rakud külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80 °C juures.



**Joonis 10. TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsimise katseplaan.** Pagaripärmi rakud kasvatati 200 ml YPD söötmes 30 °C juures eksponentsiaalse kasvufaasini (OD600=0,8). Kultuurist võeti kontrollproovi (5 ml). Ülejäänud kultuur jagati kolmeks 50 ml kultuuriks. Kultuuridele lisati rapamütsiini (Rapa, lõppkonts. 200nM), tsükloheksimiid (CHX, lõppkonts. 25 µg/ml) või 10 µl lahust A ( Ctrl, 86% EtOH, 10% Tween-20). Rakke kasvatati loksutil 30 °C juures. 10 ja 20 min möödumisel võeti proovid edasiseks analüüsiks. Antud katses kasvatati iga tüve jaoks vähemalt kolme bioloogilist replikaati, väljaarvatud kaks silda puudu tüved, neis kasutati ühte bioloogilist replikaati.

### 2.2.3 Rakkude lüüsimine

Külmutatud rakud sulatati jääl, lisati 200 µl 20% trikarboksüülhapes (TCA) ja 500 µl klaaskuule (diameeter 250-500 µm). Rakud lüüsi Ribolyser masinaga (3x1 min, paus 1 min, 4 °C) ning rakulüsaadile lisati 500 µl 5% TCA. Iga tuubi põhja tehti auk, tuubid asetati uutesse 1,5 ml tuubidesse ning fuugiti 2 min 2100 rpm 4°C (*Hettich Rotina 420R* tsentrifuug, rootor 4732

*Swing-out*). Valgud sadestati tsentrifuugimise teel 15 min 13000 rpm 4°C (*Heraeus Biofuge Fresco* tsentrifuug). Supernatant eemaldati, sademele lisati 70 µl 2x SDS puhvri (lõppkonts. 25mM Tris-HCl pH6,8, 50 mM DTT, 2% SDS, 0,1% bromofenoolsinine, 5% glütserool) ning 50 µl 1M Tris-HCl pH 8,0. Saadud proovid külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures.

#### **2.2.4 Western blot analüüs**

Proovid kuumutati 5 min 95 °C ja tsentrifuugiti toatemperatuuril (RT) 1 min 13000 rpm (*Heraeus Biofuge Pico*). Valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis (akrüülamiid:bisakrüülamiid suhe on 37,5:1) 120 V juures 1x naatriumlaurüülsulfaat (SDS) jooksupuhvris (0,4 M glütsiin, 50 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS). Markerina kasutati *PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kilodaltonit (kDa)* (*Thermo Scientific*). Valkude *semy-dry* ülekandmiseks PVDF membraanile (*Millipore Immobilon-PSQ hydrophobic* PVDF ülekande membraan, Cat.No ISEQ00010, poori suurus 0,2 µm) kasutati ülekandepuhvrit (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,13 mM SDS, 20% MetOH) ja aparati *Fastblot B44* (*Biometra*). Ülekandmine kestis 40 min pingega 15 V. Valkude koguse kontrollimiseks membraani värviti *Ponceau S* lahusega (0,1% (w/v) *Ponceau S*, 5% äädikhape). Membraani blokeeriti 1 tund RT 5% lõssipulbrit sisaldavas TBST lahuses (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20). Peale seda membraani inkubeeriti primaarsete antikehadega 1 tund RT. Primaarse antikeha lahuseks oli 12CA5 (1:2000, päritolu: Cancer Research UK), mis tunneb ära HA epitoobi järjestust. Teise primaarse antikeha lahuseks oli TAT1 (1:5000, päritolu: saadud prof. Keith Gullilt, Oxfordi Ülikool, UK), mis tunneb ära α-tubuliini. Antikehade lahused 1% lõssipulbrit sisaldavas TBST lahuses. Membraanid pesti 3x 10 min TBST lahusega. Seejärel membraanid inkubeeriti 1 tund RT HRP-ga konjugeeritud sekundaarse antikehaga (*horse anti-mouse IgG (H+L) HRP labeled*, 1:10000, firma *Vector laboratories*) antikehaga 1% lõssipulbrit sisaldavas TBST lahuses. Membraanid pesti 3x 10 min TBST lahusega. Kemoluminestsentsi signaali tekitati kitiga *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (WBKLS0100, *Millipore*) vastavalt tootjapoolsele protokollile. Kemoluminestsentsi detekteeriti aparadiga *BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS* ja *Image Lab 6.0* programmiga.

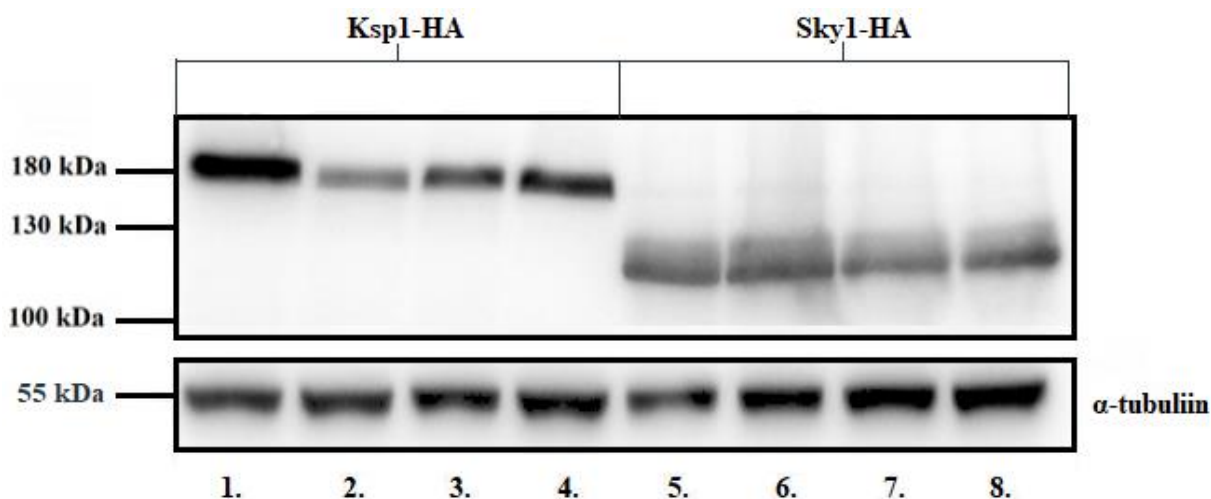
## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 ja Sky1 valkude tuvastamine

#### *western blot* analüüsil

Käesoleva töö esimene eesmärk oli välja selgitada, kas labori kollektiooni pagaripärmi tüvedes on võimalik tuvastada hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 või Sky1 valke (Ksp1-HA ja Sky1-HA). Varasemast on teada, et neid valke saab detekteerida *western blot* analüüsil, kasutades HA epitoobi spetsiifilist antikeha (12CA5) ning et nende valkude fosforüülimise detekteerimine võimaldab hinnata TOR signaaliraja aktiivsust (Huber *et al.*, 2009). Käesolevas töös kasutati metsiktüüpi tüvesid WT/KSP1-HA ja WT/SKY1-HA, mis on konstrueeritud TYSC309 (WT) tüve põhjal (Tamm *et al.*, 2019). Kontrolltüvedes eL19/KSP1-HA ja eL19/SKY1-HA on genoomist kustutatud paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning plasmiidilt ekspresseerub metsiktüüpi eL19A valk (Kisly *et al.*, 2016). Selleks, et hinnata ribosoomi subühikutevahelise silla eB12 puudumise mõju TOR signaaliraja aktiivsusele kasutati tüvesid  $\Delta$ eB12/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12/SKY1-HA. Nendes tüvedes puuduvad genoomist geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning plasmiidilt ekspresseerub valk eL19<sub>1-146</sub>. Kuna valgul eL19<sub>1-146</sub> puudub C-terminaalne helikaalne domeen, ei moodustu nende tüvede ribosoomidel silda eB12 (Kisly *et al.*, 2016; Tamm *et al.*, 2019). Selleks, et uurida kuidas eB12 ja eB13 sildade puudumine mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust kasutati tüvesid  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/SKY1-HA. Nende tüvede genoomist on kustutatud paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning *RPL24A* ja *RPL24B*. Plasmiidilt ekspresseeritakse valke eL19<sub>1-146</sub> ja eL24<sub>1-65</sub> (Tamm *et al.*, 2019). Valgul eL24<sub>1-65</sub> puuduvad keskmine ja C-terminaalne domeen, mis osalevad eB13 silla moodustamisel. Kõiki tüvesid kasvatati glükoosi sisaldavas rikkas söötmes (YPD) 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Ksp1-HA ja Sky1-HA valke detekteeriti *western blot* meetodil kasutades antikeha, mis tunneb ära HA epitoobi. Katsetulemused näitavad, et kõikides tüvedes oli võimalik tuvastada Ksp1-HA ja Sky1-HA valke (Joonis 11). Järeldati, et tüvede konstrueerimine on õnnestunud ning neid on võimalik kasutada edaspidises töös TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsil.



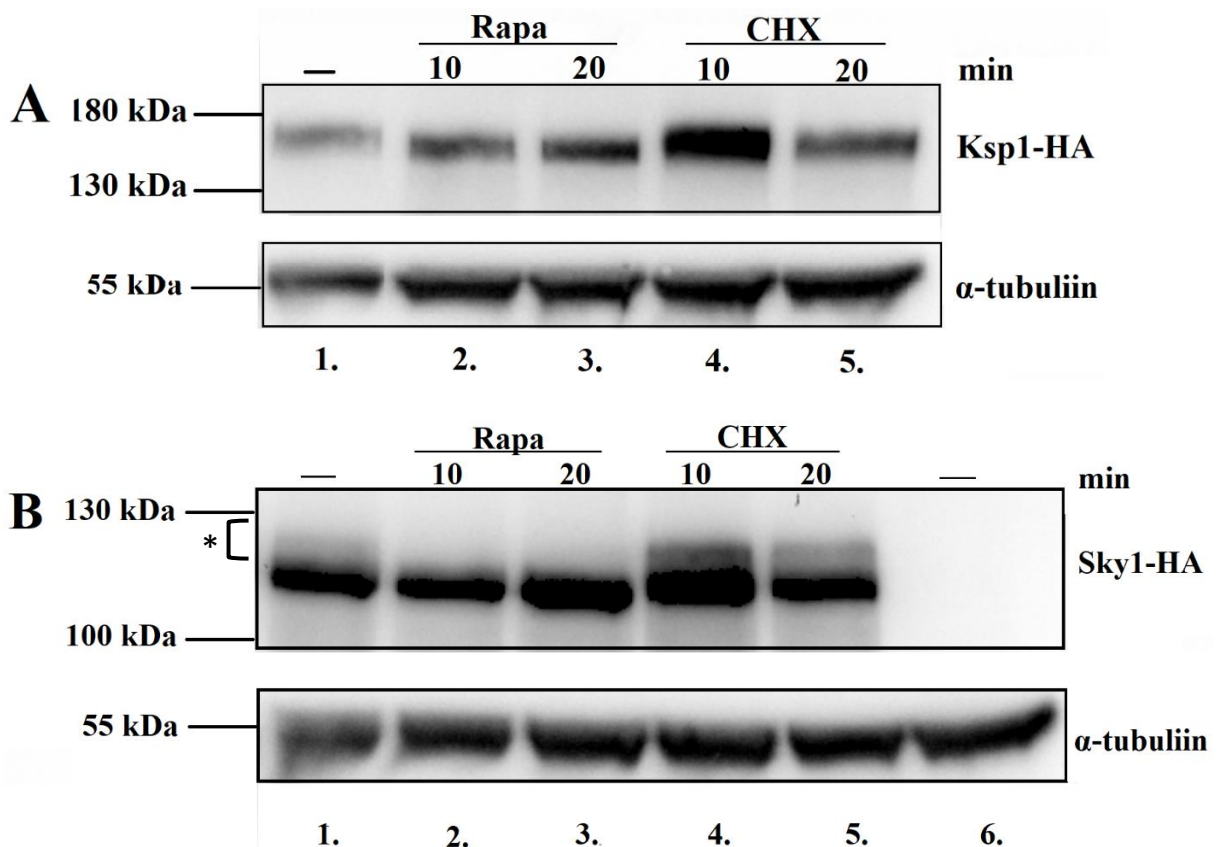


**Joonis 11. Hemaglutiniini epitoobiga Ksp1 ja Sky1 valkude tuvastamine western blot meetodil.** Pagaripärmi tüvesid kasvatati YPD söötmes 30°C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Sky1-HA ja Ksp1-HA valgud tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Joonisel on tähistatud rajad vastavalt tüvedele: 1-WT/KSP1-HA, 2-eL19/KSP1-HA, 3- $\Delta$ eB12/KSP1-HA, 4-  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA, 5-WT/SKY1-HA, 6-eL19/SKY1-HA, 7- $\Delta$ eB12/SKY1-HA, 8-  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA. Vasakul on näidatud molekulmass markerid (kDa) ja paremal on näidatud  $\alpha$ -tubuliini vööt.

### 2.3.2 TOR signaaliraja aktiivsus *S. cerevisiae* metsiktüüpi rakkudes

Varasemast on teada, et Ksp1 ja Sky1 valkude fosforüülimise tase sõltub TOR signaaliraja aktiivsusest (Huber *et al.*, 2009). Näiteks kui TOR signaalirada on inhibeeritud rapamütsiini poolt, siis mõlemad valgud on hüpofosforüülitud. Tsükloheksimiid aga põhjustab raja hüperaktiveerimist, mille tulemusena Ksp1 ja Sky1 valgud on hüperfosforüülitud. On teada, et hüper- ja hüpofosforüülitud Ksp1 ja Sky1 valgud liiguvad SDS-poliakrüülamiid geelis erineva kiirusega, mida on võimalik kasutada TOR signaaliraja aktiivsuse hindamisel (Huber *et al.*, 2009). Seoses sellega otsustati analüüsida, kas on võimalik tuvastada rapamütsiini ja tsükloheksimiidi mõju TOR signaaliraja aktiivsusele metsiktüüpi tüvedes WT/KSP1-HA ja WT/SKY1-HA. Kõiki tüvesid kasvatati glükoosi sisaldavas rikkas söötmes (YPD) 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Kultuurid jagati kolmeks osaks: esimesele osale ei lisatud antibiootikumi, teisele lisati rapamütsiini (lõppkontsentratsioon 200 nM), kolmandale lisati tsükloheksimiidi (lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakke kasvatati loksutil 30 °C juures ning 10 ja 20 minutil peale töötlemise algust võeti kultuuridest proovid. Ksp1-HA ja Sky1-HA valke detekteeriti *westren blot* meetodil kasutades 12CA5 antikeha.

Rapamütsiini töötlemisel nii 10 kui ka 20 minutil liikus Ksp1-HA valk geelis kiiremin võrreldes töötlemata proovidega (Joonis 12A) (Lisa joonis 12).



**Joonis 12. Ksp1 ja Sky1 valkude analüüs metsiktüübi rakkudes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25 µg/ml). Rakud lüüsi ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) ja Sky1-HA (paneel B) tuvastati 12CA5 antikehaga, α-tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti WT/KSP1-HA (paneel A rajad 1-5) ja WT/Sky1-HA (paneel B rajad 1-5) ekspresseerivaid rakke. Paneel B rajal 6 on WT rakud, kus Ksp1 ja Sky1 valkudel puudub hemaglutiniini epitoop. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötamise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi. \* tähistab hüperfosforüülitud Sky1-HA.

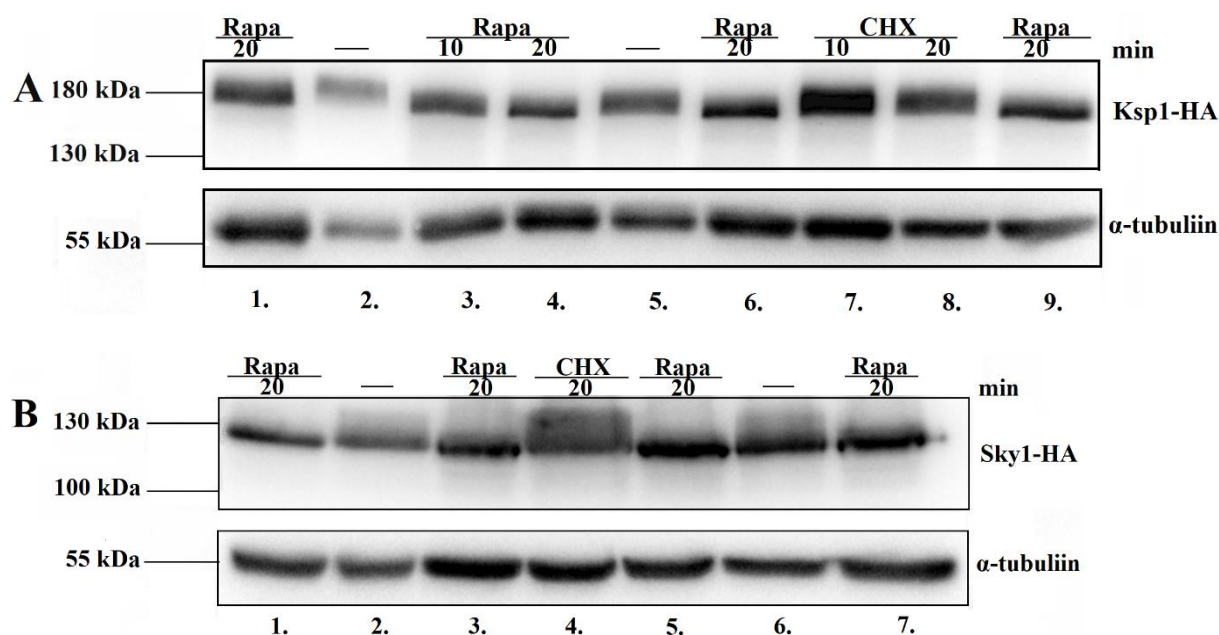
Detekteeritud Sky1-HA valgul puudus aga rapamütsiini töötlemisel hüperfosforüülitud osa (joonisel näidatud \*) kui võrrelda töötlemata prooviga (Joonis 12B). Katsetulemus viitab sellele, et rapamütsiini töötlemisel Ksp1-HA ja Sky1-HA valgud on hüperfosforüülitud, kuna TOR signaalirada on inaktiivne. Tsükloheksimiidi töötlemisel Ksp1 ja Sky1 valgud liikusid geelis sarnaselt töötlemata proovidega. See näitab, et töötlemata rakkudes TOR signaalirada on aktiivne ning mõlemad valgud on fosforüülitud. Lisaks selgus, et analüüsitud valgud on fosforüülitud sarnaselt kui võrrelda omavahel 10 minutit ja 20 minutit antibiootikumi töötlust. Analüüsiti ka metsiktüüpi (WT) tüve, kus Ksp1 ja Sky1 valkudel puudub hemaglutiniini epitoop. Selgus, et WT tüves ei ole Sky1 valk tuvastatav (Joonis 12B). See näitab, et 12CA5 antikeha seondub spetsiifiliselt valkudega, millel on olemas HA epitoop. Kokkuvõtteks

järeldati, et Ksp1-HA ja Sky1-HA valke on võimalik kasutada TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsil, mis on vastavuses varem avaldatud andmetega (Huber *et al.*, 2009).

### 2.3.3 TOR signaaliraja aktiivsus *S. cerevisiae* eL19 kontrolltüves

Järgnevas katses otsustati analüüsida, kuidas paraloogiliste *RPL19A* ja *RPL19B* geenide kustutamine genoomist ning eL19A metsiktüüpi valgu ekspresseerimine plasmiidilt mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust. Kasutati tüvesid eL19/KSP1-HA ja eL19/SKY1-HA, mida võrreldi metsiktüüpi tüvedega (WT/KSP1-HA ja WT/SKY1-HA). Rakke kasvatati vastavalt peatükis 2.3.2 kirjeldatud katseplaanile. Ksp1-HA ja Sky1-HA valke detekteeriti *westren blot* meetodil kasutades 12CA5 antikeha.

Selgus, et kontrolltüves eL19/KSP1-HA ja metsiktüübi (WT/KSP1-HA) proovides toimus rapamütsiini töötlemisel nii 10 kui ka 20 minutit Ksp1-HA valkude kiirem liikumine geelis võrreldes mõlema tüve töötlemata proovidega. See näitab, et valgud on hüpofofosforüülitud, sest TOR signaalirada on inaktiivne (Joonis 13A) (Lisa joonis 13).



**Joonis 13. Ksp1 ja Sk1 valkude analüüs eL19 kontrolltüves.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25 µg/ml). Rakud lüüsi ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) ja Sky1-HA (paneel B) tuvastati 12CA5 antikehaga, α-tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti Ksp1-HA (paneel A rajadel 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-9 eL19/KSP1-HA) ja Sky1-HA (paneel B rajadel 1-2 WT/SKY1-HA ja 3-7 eL19/SKY1-HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötlemise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

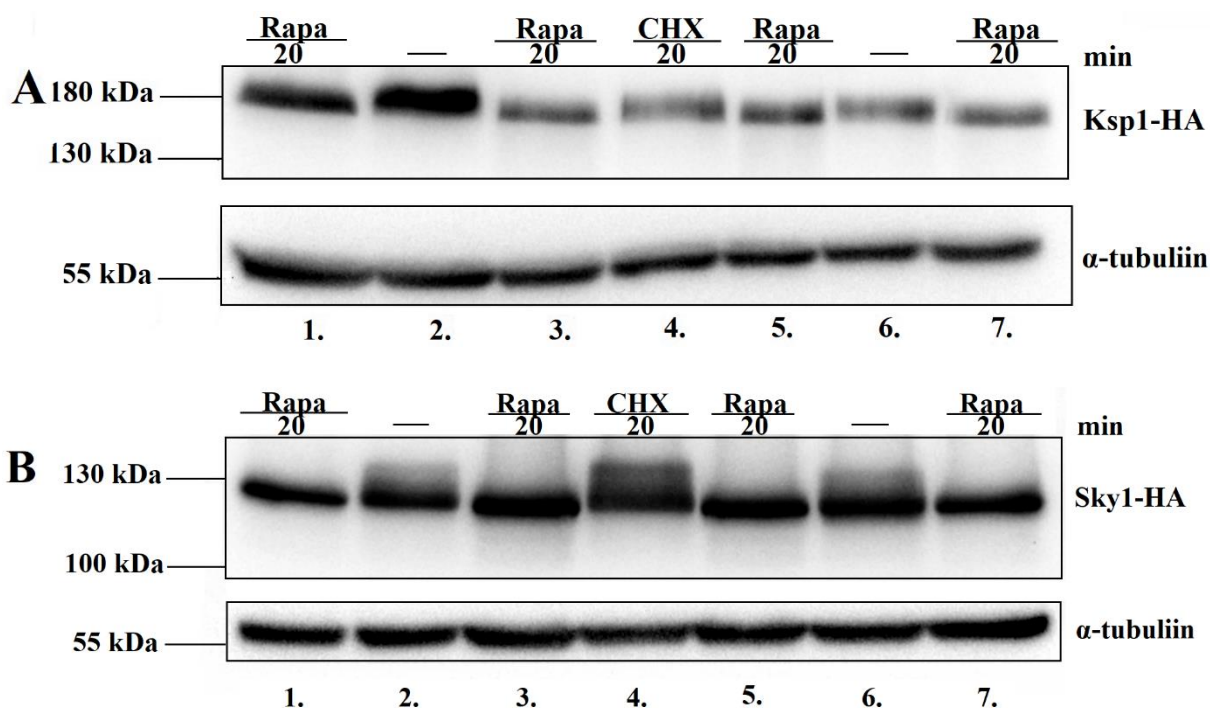
Kontrolltüve eL19/SKY1-HA detekteeritud Sky1 valgul puudub aga rapamütsiini töötlemisel hüperfosforüülitud osa, mida polnud näha ka metsiktüübi töödeldud proovis (WT/SKY1-HA) (Joonis 13B). Tsükloheksimiidiga töödeldud proovides liikusid Ksp1 ja Sky1 valgud geelis sarnaselt antibiootikumidega töötlemata proovide valkudega. Need tulemused näitavad, et töötlemata proovides on TOR signaalirada aktiivne ning Sky1 ja Ksp1 on fosforüülitud. Kokkuvõtteks järeldati, et kontrolltüve TOR signaaliraja aktiivsus on sarnane metsiktüübi omaga. Seega ei mõjuta eL19A valgu ekspresseerimine plasmiidilt TOR signaaliraja aktiivsust.

#### **2.3.4 TOR signaaliraja aktiivsus subühikutevahelise eukariöodi spetsiifilise silla eB12 puudumisel pagaripärmi ribosoomis**

Käesolevas uurimistöös katsete põhjal selgus, et täispikka eL19 valgu ekspresseerimine plasmiidilt (*rpl19AΔrpl19BΔ* genotüübi puhul) ei mõjutanud TOR signaaliraja aktiivsust võrreldes metsiktüübiga (peatükk 2.3.2). Järgneva töö etapis analüüsiti, kas eukariöodi spetsiifilise silla eB12 puudumine mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust. Selleks kasutati tüvesid  $\Delta$ eB12/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12/SKY1-HA, kus genomist on kustutatud *RPL19A* ja *RPL19B* geenid ning plasmiidilt ekspresseerub eL19<sub>1-146</sub> variant. Kuna sellel valgu variandil puudub C-terminaalne  $\alpha$ -heelikaalne domeen, ei moodustu nendes tüvedes ribosoomidel eB12 sild. Kõiki rakke kasvatati glükoosi sisaldavas rikkas söötmes (YPD) 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Kultuurid jagati kolmeks osaks: esimesele osale ei lisatud antibiootikumi, teisele lisati rapamütsiini (lõppkontsentratsioon 200 nM), kolmandale lisati tsükloheksimiidi (lõppkontsentratsioon 25 µg/ml). Rakud kasvatati loksutil 30 °C juures ning 20 minutil peale töötlemise algust võeti kultuuridest proovid. Ksp1-HA ja Sky1-HA valke detekteeriti *westren blot* meetodil kasutades 12CA5 antikeha.

Eukariöodi spetsiifilise eB12 silla puudumise mõju TOR signaaliraja aktiveerimisele võrreldi tüvede proove metsiktüübiga. Tüve  $\Delta$ eB12/KSP1-HA 20 minuti proovidel, mis olid rapamütsiiniga töödeldud liikusid Ksp1-HA valgud geelis kiiremini võrreldes mõlema tüve töötlemata proovidega (Joonis 14A) (Lisa joonis 14). Töötlemata rakkude proovides on Ksp1 valgud fosforüülitud. Detekteeritud Sky1-HA valke vaadeldes on märgata hüperfosforüülitud osa töötlemata rakkude proovides mis aga rapamütsiiniga töödeldud rakkude proovides puudub (Joonis 14B). Rapamütsiiniga töödeldud proovides on näha, et mõlemad valgud on kõigi töötlemata proovidega võrreldes madalamal, mis näitab valkude Ksp1 ja Sky1 hüperfosforüülitust ja et TOR signaalirada on inaktiivne. Tsükloheksimiidiga töödeldud proovides on märgata, et Ksp1 ja Sky1 valgud liikusid geelis sarnaselt võrreldes valkudega

töötlemata rakkude proovides. See näitab, et mõlemates proovides on Ksp1 ja Sky1 valgud fosforüülitud ja seega TOR signaalirada on aktiivne. Antud katsest järeldati, et eukariöodi spetsiifilise eB12 silla puudumine ei mõjuta TOR signaaliraja aktiivsust.



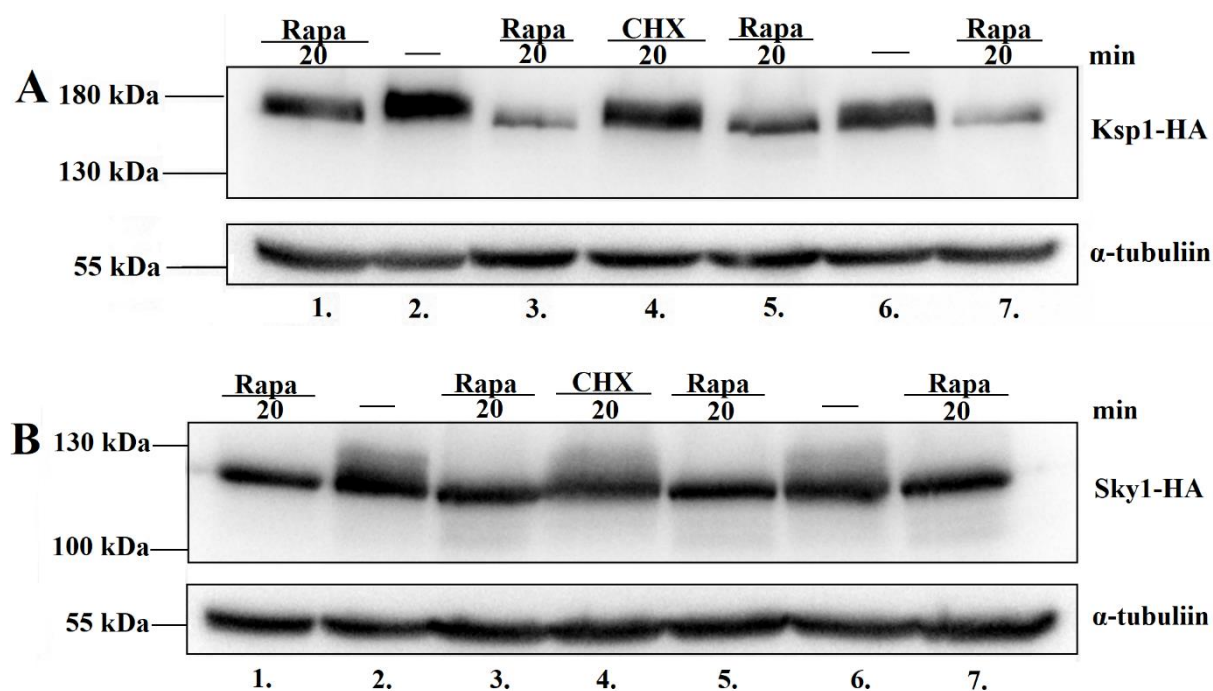
**Joonis 14. Ksp1 ja Sky1 valkude analüüs  $\Delta$ eB12 rakkudes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) ja Sky1-HA (paneel B) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiiti Ksp1-HA (paneel A rajad 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-7  $\Delta$ eB12/KSP1-HA) ja Sky1-HA (paneel B rajad 1-2 WT/SKY1-HA ja 3-7  $\Delta$ eB12/SKY1-HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötamise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

### 2.3.5 TOR signaaliraja aktiivsus subühikutevaheliste eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumisel pagari pärmi ribosoomis

Eelnevate katsete põhjal tehtud järeldustest saadi teada, et eukariöodi spetsiifilise silla eB12 puudumine ei mõjuta TOR signaaliraja aktiivsust *S. cerevisiae* rakkudes. Järgmises töötapis otsustati analüüsida TOR signaaliraja aktiivsust eB12 ja eB13 sildade puudumisel. Selleks kasutati tüvesid  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/SKY1-HA (mõlemad on *rpl19AΔ rpl19BΔ rpl24AΔ rpl24BΔ* genotüübiga), mis ekspresseerivad plasmiidilt valke eL19A<sub>1-146</sub> ja eL24A<sub>1-65</sub>. Nendel valkudel puuduvad pikad C-terminaalsed  $\alpha$ -heelikaalsed domeenid. Seega ei moodustu  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/SKY1-HA rakkude ribosoomidel eB12

ja eB13 sillad. Rakke kasvatati vastavalt peatükis 2.3.4 kirjeldatud katseplaanile. Ksp1-HA ja Sky1-HA valke detekteeriti *westren blot* meetodil kasutades 12CA5 antikeha.

Eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumise mõju TOR signaaliraja aktiveerimisele vaadeldi  $\Delta eB12\Delta eB13/KSP1$ -HA ja  $\Delta eB12\Delta eB13/SKY1$ -HA tüvedes võrreldes metsiktüübiga. 20 minuti proovides, mis olid rapamütsiiniga töödeldud, liikus Ksp1-HA valk geelis kiiremini võrreldes valkudega töötlemata proovis (Joonis 15A) (Lisa joonis 15).



**Joonis 15. TOR signaaliraja aktiivsuse analüüs fosforüülitud Ksp1 ja Sky1 valkude kaudu sildade eB12 ja eB13 puudumisel tüvedes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25 µg/ml). Rakud lüüsi ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) ja Sky1-HA (paneel B) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti Ksp1-HA (paneel A rajadel 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-7  $\Delta eB12\Delta eB13/KSP1$ -HA) ja Sky1-HA (paneel B rajad 1-2 WT/SKY1-HA ja 3-7  $\Delta eB12\Delta eB13/SKY1$ -HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötamise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

Rapamütsiiniga töödeldud rakkudes detekteeritakse Ksp1-HA valku vähem (Joonis 15A). Kuna katset sooritati ühe bioloogilise replikaadi põhjal, tuleks katset korrata ja kvalifitseerida. Tüvel, millel analüüsiti Sky1-HA valku, puudus rapamütsiini töötlemisel 20 minutil valkudel hüperfosforüülitud osa võrreldes valkudega töötlemata proovis (Joonis 15B). Mõlemad katsetulemused näitavad, et rapamütsiini töötlemisel valgud Ksp1-HA ja Sky1-HA on hüpofofosforüülitud, sest TOR signaalirada on inaktiivne. Tsükloheksimiidi töötlemisel liikusid Ksp1 ja Sky1 valgud sarnaselt töötlemata proovidega, mis viitab sellele, et TOR signaalirada

on aktiivne töötlemata rakudes ja mõlemad valgud on fosforüülitud. Kokkuvõtteks järeldati, et TOR signaaliraja aktiivsus ei muutunud rakkudes, mille ribosoomidel puuduvad eukariöodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13, sest TOR signaaliraja aktiivsus oli sarnane metsiktüübi omaga.

## 2.4 Arutelu

Käesoleva uurimistöö esmaseks eesmärgiks oli välja selgitada, kas labori kollektsiooni pagaripärmi tüvedes on võimalik tuvastada inimese gripiviiruse hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 või Sky1 valke (Ksp1-HA ja Sky1-HA). Varasemast on teada et Sky1 ja Ksp1 valke saab detekteerida *western blot* analüüsil kasutades 12CA5 antikeha ning et selline analüüs võimaldab hinnata TOR signaaliraja aktiivsust (Huber *et al.*, 2009). Näiteks valkude Ksp1 ja Sky1 fosforüülimisest on teada, et valkude töötlemisel liiguvad Ksp1 ja Sky1 kiiremini hüpofosforüülimise tõttu ja see on põhjustatud TOR signaaliraja inaktiivsusest. Tsükloheksimiidiga töödeldud rakkude proovides toimus Ksp1 ja Sky1 valkude aeglasem liikumine geelelektroforeesil, sest TOR signaalirada on hüperaktiivne ning seega Sky1 ja Ksp1 valgud on hüperfosforüülitud (Huber *et al.*, 2009). Antud töö katse põhjal selgus, et labori kollektsiooni tüvedel on võimalik Sky1-HA ja Ksp1-HA valke kasutada TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsil, nagu eelnevas teadustöös kirjeldati (Huber *et al.*, 2009). TOR signaaliraja aktiivsust saab uurida ka teistel viisidel. Eelnevalt on uuritud pagaripärmis TOR signaaliraja aktiivsust hinnates selle raja koosseisu kuuluvate valkude fosforüülimist *western blot* meetodil. Näiteks Sch9 fosforüülimise kaudu on võimalik vaadelda, kas TOR signaalirada on inaktiivne või aktiivne. Sch9 fosforüülimist detekteeritakse fosfospetsiifiliste antikehadega. Sch9 valgu hüpo- ja hüperfosforüülitud vormid liiguvad SDS-poliakrüülamiid geelis sarnase kiirusega (Urban *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2009). Käesolevas töös kasutatav gripiviiruse hemaglutiniini epitoobiga seotud Ksp1 ja Sky1 fosforüülitud valkude meetod on pigem kvalitatiivne. Kui kasutada Sch9 fosfospetsiifilist antikeha, siis selline meetod on kvantitatiivne ning sellise meetodiga oleks võimalik kvantifitseerida kui palju on Sch9 fosforüülitud vorme.

Antud uurimistöö teiseks eesmärgiks oli välja uurida, kuidas labori kollektsiooni eL19 kontrolltüvedes paraloogiliste *RPL19A* ja *RPL19B* geenide kustutamine genoomist ja eL19 valgu ekspresseerimine plasmiidilt mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust. Analüüsimiseks kasutati kontrolltüvesid eL19/KSP1-HA ja eL19/SKY1-HA ja võrreldi metsiktüüpi tüvedega (WT/KSP1-HA ja WT/SKY1-HA). On võimalik, et eL19 valgu ekspresseerimine plasmiidilt ei komplementeereri *rpl19AΔ* *rpl19BΔ* genotüüpi. Selgus, et TOR signaaliraja aktiivsus on sarnane metsiktüübiga. Katsetulemuste põhjal selgus, et eL19A ekspressioon komplementeerub, mis vastab varem avaldatud andmetele (Kisly *et al.*, 2016).

Käesolevas uurimistöö kolmandaks eesmärgiks oli uurida, kas ribosoomi eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumine mõjutab TOR signaaliraja aktiveerimist. Nende sildade moodustamisel osalevad valgud eL19 ja eL24. eL19 ja eL24 on eukariöodi spetsiifilised r-valgud, mis on struktuuriliselt omavahel sarnased. Eelnevalt on teada et eB12



ja eB13 sildade puudumine mõjutab ribosoomi funktsionaalsust ja 80S ribosoomi moodustamist. Selle tulemusena väheneb rakkudes translatsiooni tase, toodetakse vähem valke (Tamm *et al.*, 2019; Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). Totaalse proteoomi analüüsil nähti, et eB12 ja eB13 sildade puudumisel väheneb rakkudes ka r-valkude kogus (Kisly, Remme ja Tamm, avaldamata andmed). Katsetulemuste põhjal selgus, et pagaripärmi eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumine ei mõjutanud TOR signaaliraja aktiivsust.

Varasemas teadustöös on teada, et on olemas veel teisi signaaliradu, mis reguleerivad TOR signaalirajaga samu bioloogilisi protsesse. Üheks neist radadest on näiteks PKA rada, mis on osa RAS-cAMP signaalide kaskaadist ja leidub ka pagaripärmides. PKA rada on toitainetundlik ja reguleerib erinevaid kasvuga seotud protsesse, nagu translatsiooni, ribosoomide biogeneesi ja autofaagiat (Santangelo, 2006; Soulard *et al.*, 2010; Santangelo, 2006). Peale selle reguleerib PKA rada samu sihtmärk valke, mis TORC1 kompleks ja nende kaudu aktiveerib või pärsib bioloogilisi protsesse. Näiteks reguleerib PKA rada ribosoomi valkude geenide ekspressiooni ja Sfp1 transkriptsioonifaktorit. Sfp1 omakorda mõjutab Sch9 valku. Selle tagajärjel reguleeritakse ribosoomi biogeneesi aktiveerimist ja inaktiveerimist (Marion *et al.*, 2004; Soulard *et al.*, 2010).

Teiseks signaalirajaks on aminohappe tundlik Gnc2 signaalirada, mille peamiseks komponendiks on valgu kinaas Gnc2. Gnc2 signaalirada on olemas ka paripärmidel. Gnc2 kontrollib rakkudes vananemisega seotud protsesse. Näiteks reguleerib Gnc2 kinaas fosforüülides translatsiooni initsiatsiooni faktorit eIF2, millest tingituna reguleerib translatsiooni inhibeerides valkude tootmist, mis on omane ka TOR signaalirajale (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Tulevikus tuleks analüüsida PKA ja Gnc2 radasid, et vaadelda, kas muutused nendes signaaliradades põhjustavad sillamutantidel translatsioonitaseme vähenemist.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimistöös uuriti TOR signaaliraja aktiivsust labori kollektsiooni pagaripärmi tüvedes. Tüvede genoomidest oli kustutatud paraloogilised geenid ja plasmiidilt toimub valkude (eL19 ja eL24) ekspresseerimine. Kontrolltüvedel eL19/KSP1-HA ja eL19/SKY1-HA on kustutatud paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning plasmiidilt ekspresseeritakse täispikka eL19A valku. Mutantidel  $\Delta$ eB12/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12/SKY1-HA on samuti kustutatud paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning plasmiidilt ekspresseeritakse eL19<sub>1-146</sub> valku. Kuna sellel eL19 valgu variandil puudub C-terminaalne  $\alpha$ -helikaalne domeen, siis ei toimu ribosoomides eB12 silla moodustumist. Mutantidel  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA ja  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/SKY1-HA on genoomist kustutatud paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B* ning *RPL24A* ja *RPL24B*. Plasmiidilt ekspresseeritakse eL19<sub>1-146</sub> ja eL24<sub>1-65</sub> valke. Valgul eL24<sub>1-65</sub> puuduvad keskmine domeen ja C-terminaalne domeen, mis osalevad silla eB13 moodustumisel.

Esimesena uuriti uurimistöös, kas kõikides töös kasutatavates tüvedes on võimalik tuvastada hemaglutiniini epitoobiga liidetud Ksp1 ja Sky1 valke. Katsetulemusest saadi teada, et kõikides tüvedes on võimalik tuvastada Ksp1-HA ja Sky1-HA valke. Sellest järeldati, et tüvede konstrueerimine on õnnestunud ning tüvesid saab kasutada edaspidises töös TOR signaaliraja aktiivsuse analüüsil. Teiseks uuriti, kuidas eL19 kontrolltüvedes eL19A valgu ekspresseerimine plasmiidilt mõjutab TOR signaaliraja aktiivsuse muutust võrreldes metsiktüübiga. TOR signaaliraja aktiivsust saab vaadelda spetsiifiliste valkude (Ksp1 ja Sky1) fosforüülimise kaudu. Selgus, et kontrolltüve TOR signaaliraja aktiivsus on sarnanes metsiktüübiga omaga. Sellest järeldati et eL19A valgu ekspresseerimine plasmiidilt ei mõjuta TOR signaaliraja aktiivsust.

Kolmandaks analüüsiti töös, kuidas ribosoomi subühikutevaheliste eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 puudumine mõjutab TOR signaaliraja aktiivsust. Töös katsete põhjal selgus, et ribosoomi eB12 ja eB13 sildade puudumisel on TOR signaaliraja aktiivsus sarnane metsiktüübi rakkudes oleva signaaliraja aktiivsusega.

# RESÜMEE

## Effect of the ribosome intersubunit bridges eB12 and eB13 on the TOR signaling pathway in budding yeast

Anett Pöldes

### Summary

Ribosome is a universal molecular complex, which consists of ribosomal RNA and protein molecules. The function of the ribosome is to perform translation which is also known as protein synthesis. It has previously been shown that the functionality of eukaryotic ribosome depends on the presence of eukaryotic-specific intersubunit bridges eB12 and eB13 (Kisly *et al.*, 2016; Kisly *et al.*, 2019). TOR signaling pathway (Target of Rapamycin) is a nutrient-sensitive pathway which regulates cell growth, ribosome biogenesis, protein synthesis, autophagy and lipid metabolism (Loewith and Hall, 2011; Adami *et al.*, 2007).

In the current thesis, the activity of the TOR signaling pathway in budding yeast strains from a laboratory collection was investigated. Paralogous genes were deleted from the genomes of the strains and proteins (eL19 and eL24) were expressed from the plasmid. The control strain eL19/KSP1-HA and eL19/SKY1-HA had the paralogous genes *RPL19A* and *RPL19B* deleted and the full-length protein eL19A was expressed from the plasmid. The  $\Delta$ eB12/KSP1-HA and  $\Delta$ eB12/SKY1-HA mutants also have their paralogous genes *RPL19A* and *RPL19B* deleted and the eL19<sub>1-146</sub> protein is expressed from the plasmid. Since this variant of the eL19 protein lacks a C-terminal  $\alpha$ -helical domain, in the ribosomes the formation of the eB12 bridge cannot occur. The mutants  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/KSP1-HA and  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB13/SKY1-HA have their paralogous genes *RPL19A* and *RPL19B*, *RPL24A* and *RPL24B* deleted from genome. The eL19<sub>1-146</sub> and eL24<sub>1-65</sub> proteins are expressed from the plasmid. The eL24<sub>1-65</sub> protein lacks the middle domain and the C-terminal domain, which are involved in the formation of the eB13 bridge in ribosomes.

Firstly, it was investigated whether Ksp1 and Sky1 proteins expressed with haemagglutinine epitope could be detected from laboratory collection strains used in the study. The experimental results showed that Ksp1-HA and Sky1-HA could be detected in all strains. It was concluded that the construction of the strains was successful and these strains can be used further in the analysis of TOR signaling pathway. Secondly, it was investigated how plasmid expression of eL19A protein in eL19 control strain affects the TOR signaling pathway activity compared to wild-type cells. The activity of the TOR signaling pathway can be observed by phosphorylation

of specific proteins (Ksp1 and Sky1). The activity of the TOR signaling pathway of the control strain was found to be similar to the wild-type cells. It was concluded that expression of the eL19A protein from the plasmid did not affect the activity of the TOR signaling pathway.

Thirdly, it was investigated whether the lack of ribosomal eukaryote-specific intersubunit bridges eB12 and eB13 affect the activation of the TOR signaling pathway. Experiments showed that the absence of eukaryote-specific bridges eB12 and eB13 does not affect the activity of the TOR signaling pathway when compared with the wild-type cells.

## **Tänuõnad**

Autor tänab oma juhendajaid Ivan Kislyt ja Tiina Tamme targa juhendamise eest, ilma kelleleta poleks käesolev bakalaureusetöö valmimine võimalikus saanud. Eriti tahaks tänada Ivan Kislyit, kes on hea juhendaja ja alati abivalmis, isegi nädalavahetusel. Samuti soovib autor tänada oma vanemaid moraalse toetuse eest. Lisaks soovib autor tänada molekulaarbioloogia labori meeskonda sõbraliku, abivalmi ja toredate seltskonna eest.

## KASUTATUD ALLIKAD

- Adami, A., Garcia-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., Llorca, O. (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. *Molecular Cell*, 27, 509-516.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H., . . . Yusupov, M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 165-169.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*, 334, 1524-1529.
- Binda, M., Peli-Gulli, P., M., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Strurgill, W., T., Loewith, R., De Virgilio, C. (2009). The Vam6 GEF Controls TORC1 by Activating the EGO Complex. *Molecular Cell*, 35(5), 563-573.
- Cardenas, E., M., Cutler S., N., Lorenz, C., M., Di Como, J., C., Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & Development*, 13(24), 3271-3279.
- Cech, R., T. (2000). The Ribosome Is a Ribozyme. *Science*, 289(5481), 878-879.
- Chen, C., Zhang, H., Broitman, S. L., Reiche, M., Farrell, I., Cooperman, B. S. & Goldman, Y. E. (2013). Dynamics of translation by single ribosomes through mRNA secondary structures. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(5), 582-588.
- Dresios, J., Panopoulos, P. & Synetos, D. (2006). Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Molecular Microbiology*, 59, 1651-1663.
- Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N. & Taylor, D. J. (2007). The process of mRNA-tRNA translocation. *PNAS*, 104(50), 19671-19678.
- Henriques, R., Bögre, L., Horvath, B., Magyar, Z. (2014) Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2691-2701.
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & Development*, 23(16), 1929-1943.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, P., T., Guan, L., K. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology*, 10, 935-945.
- Kisly, I., Gulay, S. P., Mäeorg, U., Dinman, J. D., Remme, J. & Tamm, T. (2016). The Functional Role of eL19 and eB12 Intersubunit Bridge in the Eukaryotic Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2203-2216.
- Kisly, I., Tamm, T. & Remme, J. (2019). Ribosomal protein eL24, involved in two intersubunit bridges, stimulates translation initiation and elongation. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 406-420.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. & Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*, 334(6058), 941-948.

- Lempiäinen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., Shore, D. (2009). Sfp1 Interaction with TORC1 and Mrs6 Reveals Feedback Regulation on TOR Signaling. *Molecular Cell*, 33(6), 704-716.
- Loewith, R., Hall, N., M. (2011.). Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics*, 189(4), 1177-1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, L., J., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, N., M. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth Control. *Molecular Cell*, 10(3), 457-468.
- Marion, M., R., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., O`Shea, K., E. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *PNAS*, 101(40), 14315-14322.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 560-567.
- Narla, A., Ebert, L., B. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), 3196-3205.
- Noller, F., H., Lancaster, L., Zhou, J., Mohan, S. (2017). The ribosome moves: RNA mechanics and translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24, 1021-1027.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., Gorman, M., A. (2016). The integrated stress response. *EMBO reports*, 17(10), 1374-1395.
- Powers, T., Waltre, P. (1999). Regulation of Ribosome Biogenesis by the Rapamycin-sensitive TOR-signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 10(4), 987-1000.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. & Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science*, 331(6018), 730-736.
- Santangelo, M., G. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 253-282.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., Hall, N., M. (2010). The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase A Toward Some But Not All Substrates. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19), 3475-3486.
- Tamm, T., Kisly, I., Remme, J. (2019). Functional Interactions of Ribosomal Intersubunit Bridges in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 213(4), 1329-1339.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., De Virgilio, C., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, R., J., Hall, N., M., Loewith, R. (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 26(5), 663-674.
- Voigts-Hoffmann, F., Klinge, S. & Ban, N. (2012). Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(6), 768-777.
- Wedaman, P., K., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., McCaffery, M., J., Powers, T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), 1204-1220.

Wilson, N. C., Doudna, C. H., J. (2012). The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a011536.

Woolford, L. J., Baserga, S. J. (2013) Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643-681.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883-896.

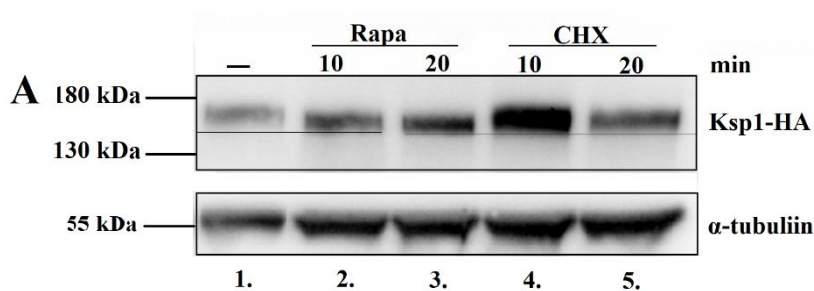
Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. & Noller, H. F. (2001). The Path of Messenger RNA through the Ribosome. *Cell*, 106(2), 233-241.

Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P. & Noller, H. F. (2013). Crystal Structures of EF-G-Ribosome Complexes Trapped in Intermediate States of Translocation. *Science*, 340(6140), 1236086.



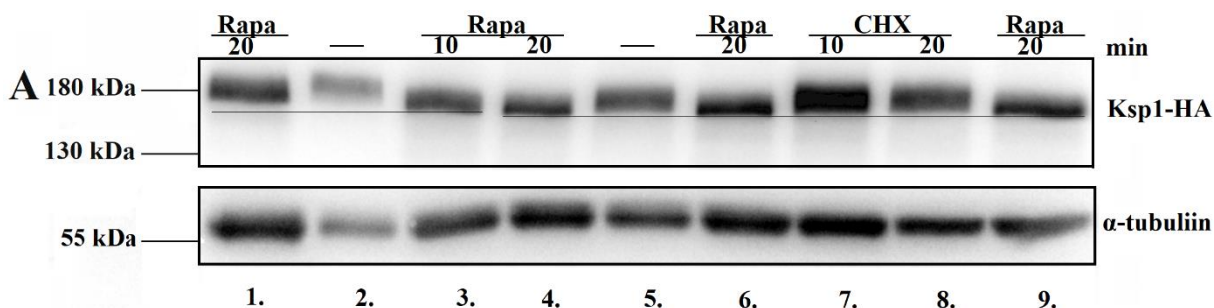
## LISAD

LISA 1. Töös kasutatud tüve WT/KSP1-HA *western blot* analüüs



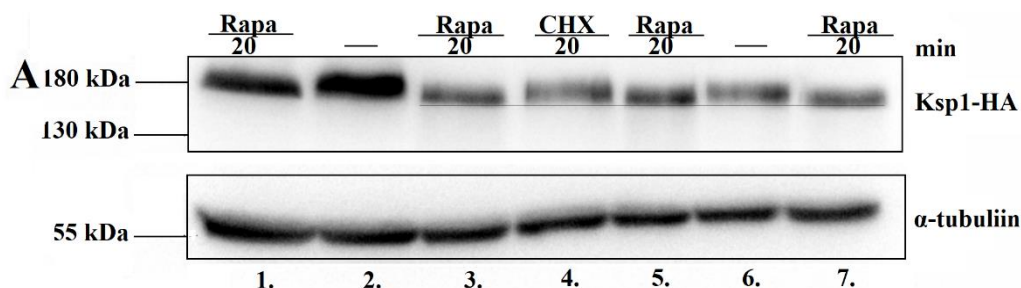
**Joonis 12. Ksp1 valgu analüüs metsiktüübi rakkudes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti WT/KSP1-HA (paneel A rajad 1-5) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötuse aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

LISA 2. Töös kasutatud tüve eL19/KSP1-HA *western blot* analüüs



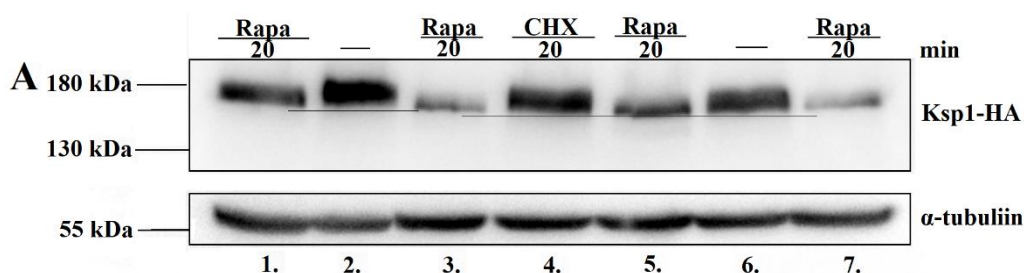
**Joonis 13. TOR signaaliraja aktiivsuse analüüs fosforülitud Ksp1 valgu kaudu eL19 kontrolltüves.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti Ksp1-HA (paneel A rajadel 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-9 eL19/KSP1-HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötuse aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

LISA 3. Töös kasutatud tüve  $\Delta eB12/KSP1$ -HA *western blot* analüüs



**Joonis 14. TOR signaaliraja aktiivsuse analüüs fosforüülitud Ksp1 valgu kaudu silla eB12 puudumisel tüvedes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti Ksp1-HA (paneel A rajad 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-7  $\Delta eB12/KSP1$ -HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötamise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

LISA 4. Töös kasutatud tüve  $\Delta eB12\Delta eB13/KSP1$ -HA *western blot* analüüs



**Joonis 15. TOR signaaliraja aktiivsuse analüüs fosforüülitud Ksp1 valgu kaudu sildade eB12 ja eB13 puudumisel tüvedes.** Pagaripärmi rakke kasvatati YPD söötmes 30 °C juures kuni eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakkudele lisati, kas rapamütsiini (Rapa, lõppkontsentratsioon 200 nM) või tsükloheksimiidi (CHX, lõppkontsentratsioon 25  $\mu$ g/ml). Rakud lüüsiiti ning valgud lahutati 8% SDS-poliakrüülamiid geelis. Ksp1-HA (paneel A) tuvastati 12CA5 antikehaga,  $\alpha$ -tubuliin tuvastati TAT1 antikehaga. Analüüsiti Ksp1-HA (paneel A rajadel 1-2 WT/KSP1-HA ja 3-7  $\Delta eB12\Delta eB13/KSP1$ -HA) ekspresseerivaid rakke. Joonisel on näidatud antibiootikumiga töötamise aeg. Miinusmärgid tähistavad eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude proove, millele ei ole lisatud antibiootikumi.

# LIHTLITSENTS

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anett Põldes

(sünnikuupäev: 15. august 1999)

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

„Ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12 ja eB13 puudumise mõju TOR signaalirajale pagaripärmis“,

mille juhendajad olid PhD Ivan Kisly ja PhD Tiina Tamm,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulga 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, alates 01.06.2024 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 iskuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigus.

Anett Põldes

**31.05.2021**