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

G3BP2 valgusünteesi reguleeriv mõju IFITM1 mRNA-le

Bakalaureusetöö
12 EAP
Minna-Maria Lass

Juhendajad Phd Arto Pulk
Abbas Mansour

TARTU 2022

G3BP2 valgusünteesi reguleeriv mõju IFITM1 mRNA-le

Lühikokkuvõte:

Bakalaureuse töö eesmärgiks oli hinnata RNA-seonduvate valkude (G3BP2 ja Caprin-1) mõju valgusünteesile kasutades selleks rakuvaba HEK293FT *in vitro* translatsioonisüsteemi, mis oli kodeeritud reporter IFITM1 mRNA-ga. Tulemustest selgus, et G3BP2 valgul on IFITM1 reportervalgule vähene positiivne mõju valgusünteesile. Sama leiti, et Caprin-1 ja G3BP2 koostoimel on tugev ~ 16 kordne inhibeeriv mõju IFTIM1 translatsioonile. Tulemused viitavad, et G3BP2 ja Caprin-1 mõjutavad IFITM1 mRNA valgusünteesi.,

Märksõnad: ribosoom, RNA-seonduv valk, mRNA, G3BP2, IFITM1

CERCS: Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees (P320)

Regulatory effect of G3BP2 protein synthesis on IFITM1 mRNA

Abstract:

The aim of the bachelor's thesis was to evaluate the effect of RNA-binding proteins (G3BP2 and Caprin-1) on protein synthesis using the cell-free HEK293FT in vitro translation system encoded by reporter IFITM1 mRNA. The results showed that the G3BP2 protein had a little positive effect on the IFITM1 mRNA reporter translation in the HEK293FT cell-free system. The Caprin-1 and G3BP2 co-effect on IFTIM1 mRNA translation was monitored. The effect of both proteins on the IFITM1 mRNA translation was remarcable, 16 ~ fold inhibition was seen. Results indicate that G3BP2 and Caprin-1 regulate the IFITM1 mRNA protein synthesis levels.

Ketwords: ribosome, RNA-binding protein, mRNA, G3BP2, IFITM1

CERCS: Nucleic acids, protein synthesis (P320)

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 4
SISSEJUHATUS 7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 8
1.1 Valgusüntees ja initsiatsioonifaktorid 8
1.2 RNA-seonduvad valgud 9
1.3 G3BP seos SG-ga 13
1.4 G3BP-de mõju IFITM1-3 mRNA translatsioonile 14
2. EKSPERIMENTAALOSA 16
2.1 Töö eesmärgid 16
2.2 Materjalid ja metoodika 16
2.2.1 HEK293FT rakkude kasvatamine 16
2.2.2 Rakuvaba *in vitro* translatsiooniekstrakti valmistamine HEK293FT rakkudest 17
2.2.4 Koloonia PCR DH5α rakkudele 19
2.2.5 IFITM1 mRNA matriits DNA kloneerimine 19
2.2.6 IFITM1-LUC mRNA matriits DNA amlifitseerimine 21
2.2.7 mRNA T7 *in vitro* transkriptsioon 22
2.2.8 mRNA-le cap1-struktuuri lisamine 22
2.2.9 *In vitro* translatsioon G3BP2 valguga 23
2.2.10 *In vitro* translatsioon valkudega G3BP2 ja Caprin-1 25
2.2.11 Lutsiferaasi koguse mõõtmine translatsiooniproovidest 25
2.3.1 G3BP2 mõju IFITM1-Luc mRNA translatsioonile 26
2.3.2 Caprin-1 ja G3BP2 koosmõju hindamine IFITM1 mRNA translatsioonile 27
KOKKUVÕTE 29
KIRJANDUSE LOETELU 31
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS 39

KASUTATUD LÜHENDID

ASD - autismispektri häire (*Autism spectrum disorder)*

Caprin-1 - tsütoplasmaatilise aktivatsiooni ja proliferatsiooniga seotud valk (*cell cycle associated protein 1*)

CBP - cap-seonduv valk (*cap-binding proteiin*)

c-myc – inimese proto-onkogeen (*human proto-oncogene*)

CRD - C1q-ga seotud domeen (*C1q-related domain*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)

DMEM/GlutaMAX – Dulbecco modifitseeritud sööde: toitainete segu L-glutamiin (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/GlutaMAX*)

eIF1 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 1 (*eukaryotic initiation factor 1*)

eIF1A – eükarüootne initsiatsioonifaktor 1 A (*eukaryotic initiation factor 1 A*)

eIF2 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 (*eukaryotic initiation factor 2*)

eIF2α – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*)

eIF2B – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 B (*eukaryotic initiation factor 2 B*)

eIF3 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 3 (*eukaryotic initiation factor 3*)

eIF4A – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 A (*eukaryotic initiation factor 4 A*)

eIF4E – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 E (*eukaryotic initiation factor 4 E*)

eIF4F – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 F (*eukaryotic initiation factor 4 F*)

eIF4G – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 G (*eukaryotic initiation factor 4 G*)

eIF5 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 5 (*eukaryotic initiation factor 5*)

eIF5B – eükarüootne initsiatsioonifaktor 5 B (*eukaryotic initiation factor 5 B*)

EDTA – etüleendiamiintetraatseethape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA - egasihape (*egtazic acid)*

ER – endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmatic reticulum)*

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

G3BP – Ras-GAP SH3 domeeniga seostuv valk (*Ras-GAP SH3 domain binding protein*)

GADD34 - kasvu peatamist ja DNA kahjustusi indutseeritav valk 34 (*growth arrest and DNA damage-inducible proteiin 34*)

GCN2 – seriini ja treoniini valkude üldkontrolli mitterepresseeritav valk 2 (*general control nonderepressible 2*)

HBSS – Hank'i balansseeritud soolalahus (*Hanks' balanced salt solution*)

HEK293FT – inimese embrüonaalse neeru rakuliini 293 FT (*Human embryonic kidney cell lines 293 FT)*

HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfaat (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid*)

HR-1 - homoloogsed piirkonnad 1 (*homological areas 1*)

HR-2 - homoloogsed piirkonnad 2 (*homological areas 2*)

HRI - heemi reguleeritud inhibiitor (*heme regulated inhibitor)*

IFITM1 - interferooni poolt indutseeritud transmembraanne valk 1 (*interferon induced transmembrane protein 1)*

IFN - interferoonide signaalirada (*interferon signaling pathway*)

JMJD6 - Jumonji C-domeeni siduvate valgu 6 (*Jumonji C-domain binding protein 6*)

LB - Luria-Bertani puljong (*Luria-Bertani Broth*)

MCF7 - rinnavähi rakuliin 7 (*Michigan Cancer Foundation-7*)

MCF7.MDR – multiresistentsed inimene rinnavähi rakud (*multidrug-resistant human Michigan Cancer Foundation-7*)

Met-tRNA$_i^{Met}$ – metioniiniga aminoatsüleeritud initsiaator-tRNA (*initiator tRNA aminoacylated with methionine*)

m^{7}GpppN – 7-metüülguanosiin (*7-methylguanosine*)

nRNAg – neuronite RNA graanul (*neuronal RNA granul*)

NTF2 - N-terminaalne tuuma transpordifaktor 2 (*N-terminal nuclear transport factor 2*)

nsp3 – rotaviiruste mittestruktuurne valk 3 (*rotavirus nonstructural protein 3*)

PABP – polü-A-seostuv valk (*poly(A)-binding protein*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PKR - RNA-sõltuv proteiini kinaas (*dsRNA-dependent kinase*)

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PN / STRP – penitsilliini-streptomütsiini segu (*penicillin-streptomycin mixture*)

PRMT1 - arginiini metüültransferaasi 1 (*arginine methyltransferases 1*)

PRMT2 - arginiini metüültransferaasi 2 (*arginine methyltransferases 2*)

PxxP - proliini-rikas piirkond (*prolin-rich region*)

snRNA – väikse tuuma RNA (*small nuclear RNA*)

RBD - RNA-seonduva domeeni (*RNA-binding domain*)

RBP – RNA-d siduv valk (*RNA-binding protein*)

hnRNP - heterogeense tuuma ribonukleoproteiin (*heterogeneous ribonucleoprotein particle*)

RNP1 – ribonukleoproteiin 1 (*ribonucleoprotein 1*)

RNP2 – ribonukleoproteiin 2 (*ribonucleoprotein 2*)

RRG - arginiini-glütsiini rikas piirkond (*arginine-glycine rich region*)

RRM - RNA äratundmise motiiv (*RNA recognition motif*)

SAM - S-adenosüülmetioniin (*S-adenosylmethionine*)

SG – stressigraanulid (*stress granules*)

TAE – tris-atsetaat-EDTA (*tris-acetate-EDTA*)

TCEP – tris(2-karboksüetüül)fosfiin (*tris(2-carboxyethyl)phosphine*)

U2O5 - inimese luu osteosarkoomi epiteelirakud (*human bone osteosarcoma epithelial cells*)

USP10 - ubikvitiinispetsiifiline peptidaas 10 (*Ubiquitin Specific Peptidase 10*)

UTR – mittetransleeriv regioon (*untranslated region*)

60S – eukarüootne ribosoomi suur alaühik (*eukaryotic large ribosomal subunit*)

40S – eukarüootne ribosoomi väike alaühik (*eukaryotic small ribosomal subunit*)

SISSEJUHATUS

Käesoleva töö eesmärgiks oli hinnata RNA-seonduvate valkude (RBP) Caprin1 ja G3BP2 mõju translatsioonile, milleks kasutati rakuvaba HEK293FT *in vitro* translatsioonisüsteemi, mis oli kodeeritud IFITM1-Luc mRNA-ga. Töögrupp on viimased 4 aastat tegelenud neuronite RNA graanulite (nRNAg) uurimisega, mis on vajalikud spetsiifiliste mRNAde transpordiks aksodendriitidesse lokaliseeritud valgusünteesiks. nRNAg koosneb translatsiooniliselt inaktiivsetest ribosoomidest, mRNA-st kui ka RBP-de kompleksidest. nRNAg on olulised pikaajalise mälu tekkes ja ebanormaalne transport on seotud neurodegeneratiivsete haigustega.

Töörühm on eelnevalt leidnud mitmeid nRNAg koosseisus olevaid RNA-seonduvaid valke, millest enim huvi on pakkunud G3BP2 ja Caprin-1 valgud. Kasutades keemilist ristsidumist koos mass-spektromeetrilise tuvastamisega on uurimisrühm identifitseerinud võimaliku interaktsiooni G3BP2 ja ribosomaalse valgu eS28 vahel, mis asetab G3BP2 40S subühiku E-saidi lähedal või ka samasse taskusse, kus eukarüootne translatsiooni initsiatsiooni faktori 3d (eIF3d) alaühik seostub. Pole täpselt teada, kuidas G3BP2 võiks ribosoomidega seostuda ja reguleerida mRNAde valgusünteesi. Kuna G3BPd sisaldavad madala kompleksusega domeene, siis ei ole valgust ka täielikku struktuuri, ainult teatud domeenide (NTF2) kristallstruktuur on lahendatud. Seega potentsiaalne krüo-EM struktuur G3BP2 ja ribosoomide vahel võimaldaks paremini mõista kuidas G3BP2 mõjutab mRNAde valgusünteesi või RNA graanulite moodustumist.

Moodustamaks komplekse G3BP2 ja ribosoomide vahel ning hindamaks nende aktiivsust, kasutati rakuvaba HEK293FT *in vitro* translatsioonisüsteemi. Kirjandusest on teada, et G3BP2 seostub IFITM1 mRNA 3'UTR osaga, seega bakalaureusetöös kontstrueeriti ja sünteesiti reporter mRNA, mis sisaldas IFITM1 mRNA 5' ja 3' UTR järjestust ning kodeeriv osa sisaldas lutsiferaasi järjestust. IFITM1-LUC mRNAd ja puhastatud G3BP2 ja Caprin-1 valke kasutati *in vitro* valgusünteesi katses, et hinnata nende mõju. Tulemused võimaldaks moodustada *in vitro* komplekse uuritavate mRNAde ja RBPde ning ribosoomide vahel, mida välja puhastades saaks kasutada struktuuribioloogilistes uuringutes.

Bakalaureusetöö tulemused näitavad, et töös kasutatud IFITM1-Luc mRNA translatsiooni efektiivsus on korrelatsioonis G3BP2 ja Caprin-1 valkude seondumisega ning on võimalik kasutada komplekside moodustamiseks.

Töö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis struktuuribioloogia suunal.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Valgusüntees ja initsiatsioonifaktorid

Translatsioon on mRNA-lt vastavalt geneetilisele koodile valkude ehk polüpeptiidide sünteesimine. Nimetatud protsess leiab aset ribosoomides, mida eukarüootsetel rakkudel leidub suuremalt jaolt tsütoplasmas või endoplasmaatilise retiikulumi (ER) pinnal. Ribosoomid jaotuvad kaheks subühikuks – väike ja suur subühik -, mis eukarüootsetel rakkudel on vastavalt 40S- ja 60S-subühikud. Peale eelpool nimetatud subühikute ja mRNA on translatsiooni alustamiseks vajalikud veel initsiaator-tRNA ja initsiatsiooni- kui ka elongatsioonifaktori. (Heinaru, 2012, Alberts, 2014).

Translatsioon jaotub kolmeks peamiseks etapiks, milleks on initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Kuna translatsiooni initsiatsioon on eukarüootides kõrgelt reguleeritud läbi mRNA mittekodeerivate alade (5’ ja 3’ UTR, polü(A)-saba), initsiatsioonifaktorite ja nende modifikatsioonide (näiteks fosforüülimine) kaudu, siis lühike ülevaade on antud translatsiooni initsiatsioonist eukarüootides. Esmalt seondub rakutuumas *cap*-seonduv valk (CBP) mRNA 5’ terminaalses otsas 7-metüülguanosiiniga (m^7GpppN) ja mRNA toimetatakse tsütoplasmasse, kus see omakorda seodub eIF4F kompleksiga (Heinaru, 2012, Topisirovic *et al.*, 2011). eIF4F kompleks koosneb *cap*-seonduvast valgust eIF4E, eIF4G (*scaffolding* valk, mis seob kõiki teisi eIF4F valke), eIF4A (ATP sõltuv DEAD-box RNA helikaas, mis harutab lahti mRNA sekundaarstruktuure) ja polü(A)-siduvast valgust (PABP) (Hinnebusch *et al*., 2016). Enne mRNA-eIF4F kompleksi liitumist 43S-ribosoomiga (sisaldades eIF3, eIF5-GTP, eIF1 ja eIF1A) liitub ribosoomi väikese alaühikuga ternaarne kompleks, mis sisaldab initsiaator $tRNA_i^{Met}$, eukarüootset initsiatsiooni faktor 2 (eIF2) ja GTP. Tekkinud 40S kompleksi initsiatsioonifaktoritega nimetatakse 43S-preinitsiatsiooni kompleksiks. 43S-preinitsiatsiooni kompleksiga liitub lõpuks mRNA-eIF4F kompleks, misjärel moodustub 48S-initsiatsiooni kompleks. 48S initsiatsiooni kompleks hakkab mRNA-d 5’-UTR 3’ suunas lugema (skaneerima), kus on abiks eIF1 ja eIF1A, kuniks leiab initsiatsioonikoodoni AUG. AUG koodoni leidmisel laetakse initsiaator $tRNA_i^{Met}$ 48S kompleksi P-saiti eIF2 abil ja peale eIF2 GTP hüdrolüüsi vabaneb see osaliselt kompleksist. Seejärel liitub kompleksiga 60S subühik koos eIF5B-GTP, mis indutseerib täieliku eIF2 vabanemise, lisaks vabanevad eIF5-GDP, eIF1 ja eIF3. Peale eIF5B-GTP hüdrolüüsi vabanevad eIF5B ja eIF1A. Selle tulemusel on moodustunud 80S kompleks, mis hakkab katalüüsima peptiidsidemete moodustamist (Heinaru, 2012, Sekiyama *et al*., 2015, Kumar *et al*., 2016, Hinnebusch *et al*., 2016).

Eelnevalt kirjeldatud protsessi on võimalik erinevates etappides mõjutada, seda nii inhibitsiooni, fosforülatsiooni kui ka väliste tegurite mõjul. Olulisel kohal on eIF2 aktiivsus, kuna see on üks osake kolmekomponentsest kompleksist, millest sõltub edasine translatsiooni aktiivsus (Hinnebusch ja Lorsch, 2012). eIF2 on heterotrimeerne valk, mille subühikuteks on eIF2α, eIF2β ja eIF2γ (Schmitt *et al.,* 2010). eIF2γ on guaniini siduv valk, mis on oma struktuurilt ja järjestuselt sarnane eukarüootsete elongatsiooni faktori 1A-ga (eEF1A), ning tema külge kinnitub $tRNA_i^{Met}$ (Gaspar *et al.*, 1994, Schmitt *et al.*, 2002). eIF2β sisaldab lüsiini N-terminaalses otsas, mis on oluline guaniini vahendamisel eIF2B ja eIF5 vahel, ning tsinki siduvaid motiive C-terminaalses otsas, mis on seotud GTP hüdrolüüsiga (Asano *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 1997). Kuid seejuures on leitud, et eIF2α on peamine eIF2 regulaator. Selle valgujärjestuses on Ser51, mis on peamiseks sihtmärgiks erinevatele kinaasidele raku stressi olukorras. Enoplasmaatilise retiikulumi stressi (mittevoltunud valkude stress) puhul aktiveerub PERK, heemi reguleeritud inhibiitor (HRI) aktiveerub heemi, raua ja oksüdatiivse stressi puhul, GCN2 aktiveerub aminohapete puuduse puhul ja RNA-sõltuv proteiini kinaas (PKR) aktiveerub interferoonide poolt kui seondub RNA kaheaheliste osadega (Muaddi *et al*., 2010) Positsioonist Ser51 fosforüleeritud eIF2-GDP seob endaga pöördumatult eIF2B, mille ülesandeks on eIF2 varustada guaniiniga, mille tulemusena valgusüntees peatub (Ito *et al*., 2004, Sudhakar *et al*., 2000).

Lisaks eIF2 on teised translatsiooni initsiaator faktorid reguleeritud läbi modifitseerimise. Näiteks eIF4A O-Glc-atsetüleerimine positsioonidest Ser322/323 häirib initsiatsioonikomplekside moodustamist ja spetsiifiliselt kahjustab eIF4G interakteerumist eIF4Aga ja samas häirub ka eIF4A RNA sekundaarstruktuuride lahti voltumise aktiivsus (Li *et al*., 2019).

1.2 RNA-seonduvad valgud

Eukarüootsetes rakkudes toimub mRNA süntees ehk transkriptsioon rakutuumas. Transkriptsiooni käigus produtseeritud pre-mRNA protsessitakse mRNAks splaissingu käigus, kus eemaldatakse intronid. Eukarüootide mRNAle lisatakse transkriptsiooni käigus *cap*-struktuur, mis kujutab endast seitsmendast positsioonist metüleeritud pööratud guanosiin nukleotiidi (Ramanthan *et al*., 2016). Seejärel mRNA transporditakse tsütoplasmasse, kus toimub valgusüntees, mis on vahendatud ribosoomide poolt (Cooper, 2000). Kui mRNA-d on vaja transportida raku kaugematesse punktidesse (närvirakkude dendriidid ja aksonid) või kaitsta stressi korral, siis säilitatakse neid mittetransleerivaid mRNA-sid membraanita

graanulites, mida nimetatakse *messenger* ribonukleoproteiinideks (mRNP). Spetsiifilisemaks näideteks on stressigraanulid (SG), neuronaalsed RNP graanulid ja P-kehakesed (Anderson ja Kedersha, 2006). Nad sisaldavad erinevaid translatsioonifaktoreid, ribosomaalseid subühikuid, helikaase ja RNA-d siduvaid valke (Kedersha *et al.,* 2002, Kedersha *et al.,* 2005, Anderson ja Kedersha, 2006).

Eelnevalt kirjeldatud protsesse reguleerivad erinevad RNA-seonduvad valgud (RBP) ning väiksed stabiilsed mikro RNAd. RBP-d hõlmavad suurt klassi valke, kuhu kuulub enam kui 2000 valku, mis interakteeruvad transkriptidega erinevates RNA põhistes protsessides (Corley *et al.*, 2020). Enim kirjeldatud RBP on RNA-d ära tundev motiiv (RRM), mis koosneb kuni 80 aminohappest, mis omakorda moodustavad RNA-seonduva domeeni (RBD) (SenGupta, 2013). RBD-d leidub valkudes, mis seonduvad pre-mRNA-ga, mRNA-ga, rRNA-ga ja snRNA-ga. RBP motiive leidub, kas rohkemal või vähesemal määral kõigis RNA produktides. Sellest tulevalt võib järeldada, et RBP motiivid kui ka RNA-seonduvad domeenid on iidselt olulised raku elutegevuses (Burd ja Dreyfuss, 1994; Dreyfuss *et al*, 1988). Järgnevalt kirjeldatakse motiive, millel on oluline tähtsus kirjeldatavas töös.

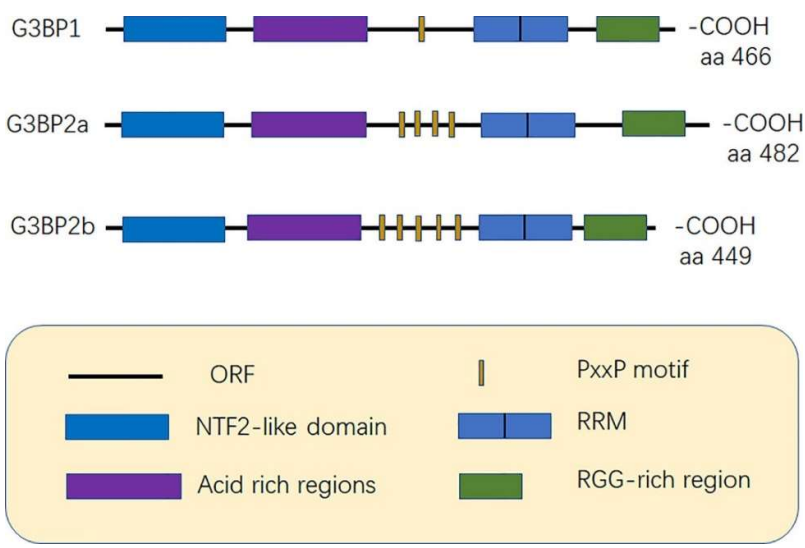
RRM mängib olulist rolli RNA splaissimisel, protsessimisel, valgusünteesil ja transpordil (Birney *et al.*, 1993). RBPd tunnevad ära erinevaid RNA konsensusjärjestusi või sekundaarstruktuure. RRM järjestused võivad sisaldada kahte tüüpi konsensusjärjestusi, RNP1 ja RNP2. RNP1 konsensusjärjestus on oktameerne (R/K)-G-(**F**/**Y**)-(G/A)-(**F**/**Y**)-V-X-(F/Y), kus X tihipeale tähistab tundmatut aminohapet, ja RNP2 järjestus heksameerne (L/I)-(**F**/**Y**)-(V/I)-X-(N/G)-L (SenGupta, 2013). RRM järjestused võivad valgus esineda ühe või mitme koopiana ja sageli koos teiste RNA siduvate järjestustega, nagu seda on RS (Arg-Ser) või RGG (Arg-Gly-Gly) (Dreyfuss *et al*, 1988; Moras ja Poterszman, 1995; Burd ja Dreyfuss, 1994).

Bakalaureuse töö raames uuriti kahe RNA-seonduva valgu (G3BP2 ja Caprin-1) mõju valgusünteesile, kasutades IFITM1 kodeeritud mRNAd. G3BPd on ~ 68 kDa RNA-seoselised valgud, mis on oma nime saanud läbi selle, et see seondub rakkudes Ras-GTPaasi aktiveeriva valgu GAP-ga SH3 domeenis. G3BPd omavad fosforüülimisest sõltuvat RNA endonukleaasset aktiivsust ehk nad on ensüümid, mis lõikavad RNA-ahelaid molekuli sees (Krapp *et al*, 2017). G3BP on võimeline lõikama c-myc mRNAd kui Ser149 on fosforüülitud (Tourriere *et al.*, 2001). G3BP olemasolu on oluline paljudele signalisatsiooniradadele, näiteks Wnt/β-kateniini ja Ras signaalirajad, ja on ka tähtis RNA metabolismi reguleerija. Samuti on G3BP oluline SG-de moodustumisel ning nende aktiivsusel. Täiendavalt on G3BP oluline ka antiviiruse vastasel

mehhanismil, mille juures on tähtis interferoonide olemasolu (Parker *et al*., 1996, Kang *et al*., 2021).

G3BP omab kahte valguvormi, millest imetajatel on G3BP1 ja G3BP2, mille omavaheline sarnasus ulatub kuni 59%-ni (Kennedy *et al*. 2001). G3BP2 omab ka kahte homoloogi – G3BP2a ja G3BP2b. Nende kahe omavaheline erinevus seisneb G3BP2b geeni keskpiirkonnas, kus puuduvad aminohapped 243-275, mistõttu nimetatakse teda splaissitud isovormiks (Kennedy *et al.*, 2001). G3BP-sarnaseid valke on leitud erinevates organismides, näiteks *Drosophilia melanogaster*-i homoloogina Rasputin, mida kodeerib Rin geen, ja ka *Arabidopsis Thaliana*-st (Laver *et al*, 2020, Krapp *et al*, 2017). G3BP valke ekspresseeritakse kõigis imetaja rakkudes, millest G3BP1 leidub enim neerudes ja kopsudes ning samal ajal G3BP2 ekspresseeritakse enimalt ajus ning peensooles (Kennedy *et al*., 2001, Kang *et al*., 2021).

G3BP-d kuuluvad RNP perekonda ja temas leiduvad motiivid on väga sarnased hnRNP motiividele (Parker *et al* 1996). Nimelt avastati, et RGG motiivid, mis on G3BP aminohapete järjestuses 428-450 positsioonil, on 75% identsed hnRNP RGG motiiviga ning RNP1 ja RNP2 domeenid, mis on G3BP aminohapete järjestuses 342-385 positsioonil, on 40,4% identsed hnRNP domeenidega. Samuti leiti, et aminohapete 144-221 vahel on happeline domeen, mis on 41% sarnane hnRNP domeenile. G3BP koosneb viiest eristatavast motiivist/domeenist, milleks on N-terminaalne tuuma transpordifaktor 2 (NTF2), proliini-rikas (PxxP), RNA-d äratundev (RRM), arginiini-glütsiini rikas (RRG) ja happerikas piirkond (Burd ja Dreyfuss, 1994) (joonis 1). NTF2 struktuur on homodimeerne, kus on kolm α-heeliksit ja üks beetaleht. See domeen on seotud tuumatranspordiga ja rakkude lokaliseerumisega. Samuti on see seotud SG inhibitsooniga. Proliini-rikas piirkond ehk PxxP on oluline antiviiruse vastaste partiklite ja kinaaside aktiveerimisel ning SG-de moodustumisel. RRM domeeni esineb G3BP järjestuses kahes korduses ning see domeen on tähtis RNA-ga seondumisel tänu enda konserveerunud hüdrofoobsetele aminohappelistele sabadele. Kuna RRG motiiv sisaldab palju arginiini, siis on see sageli metüleeritud, mis omakorda inhibeerib SG-s moodustumist. Arginiinid, mida peamiselt metüleeritakse on positsioonides Arg-435, Arg-447 ja Arg-460 (Vognen *et al.*, 2013, Guillen-Boixet *et al.*, 2020, Reineke ja Lloyd., 2015, Tsai *et al.*, 2017).



Joonis 1. G3BP struktuur. G3BP sisaldab viite erinevat motiivi, milleks on N-terminaalne tuuma transpordifaktor 2 (NTF2), proliini-rikas domeen (PxxP), RNA-d äratundev motiiv (RRM), arginiini-glütsiini rikas (RRG) ja happerikas piirkond. G3BP1 ja G3BP2 saab eristada PxxP motiivide arvu järgi, kus G3BP1-l on üks PxxP motiiv, samas kui G3BP2a ja G3BP2b on vastavalt neli ja viis PxxP motiivi.

Caprin-1 on ~166 kDa tsütoplasmaatilise aktivatsiooni ja proliferatsiooniga seotud valk, mis on ekspresseeritud kõigis rakkudes. Selle tase tõuseb, kui puhkeolekus olevad rakud sisenevad rakutsüklisse, ja väheneb, kui proliferatsioon lakkab ning rakud diferentseeruvad (Grill *et al*., 2004). Lisaks leidub seda aju hipokampuses ja neokorteksis nende neuronite dendriitsetes postsünaptilistes graanulites (Shiina *et al*., 2005). Caprin-1 seondub ka G3BP-ga, mis mõjutab SG-de formatsiooni (Kedersha *et al*., 2016). Caprin-1 jagab kahte domeeni enda Caprin-2 paraloogiga, milleks on homoloogsed piirkonnad 1 (HR-1) ja 2 (HR-2). Caprin-2 erinevus Caprin-1-st seisneb tema C-terminaalsest otsast leitud C1q-ga seotud domeen (CRD), mis on homoloogne C1q globulaarse valgu peadomeeniga. Nii Caprin-1 kui Caprin-2 HR-2 domeenidel on RGG-motiivid, mistõttu kuuluvad nad RBP perekonda (Wu *et al*., 2019). Ajus leidub Caprin-1 valku nii polüsoomidega seotult kui translatsiooniliselt vaigistatud mRNP-des (Angenstein *et al*., 2005). Caprin-1 soodustab RNA graanulite kokkupanemist ja vastutab sellega seonduvate mRNA-de transpordi eest (Shiina *et al*., 2005; Shiina *et al*., 2010, Kedersha *et al*., 2016). Caprin-1 on vastutav pikajalise mälu tekkel, mistõttu selle puudumine või *knockdown* põhjustab sünaptiliste ühenduste vähenemist dendriitidel ja närvivõrgustiku tiheduse vähenemist (Shiina *et al*., 2010; Shiina ja Tokunaga, 2010). Lisaks on leitud seoseid

autismispektri häire (ASD) laadset käitumist, kellel on nonsenssmutatsioon Rng105/caprin1 geenis (Ohashi *et al*., 2016; Jiang *et al*., 2013).

1.3 G3BP seos SG-ga

SG-d koosnevad mRNA-st, mitmest eukarüootsete translatsiooni initsiatsiooni faktorist (eIF4G, eIF3, eIF5A), väikestest ribosomaalsetest subühikutest ning sisaldavad erinevaid RNA-d siduvaid valke, sealhulgas G3BP-d ja Caprin-1 (Kedersha *et al*., 2005). Imetajarakkudes SG-d moodustuvad olukorras, kus seriini/treoniini kinaas fosforüleerib eIF2α, et suruda alla translatsiooni initsiatsiooni. Selle tulemusel vabaneb polüsoomidest suurel hulgal mRNA-d. SG-d moodustamine on rakkudele stressist taastumiseks hädavajalik toiming ning on mRNA-le möödavaks/ajutiseks salvestuskohaks (Kedersha *et al*, 1999, Takayama *et al*, 2018). SG moodustuvad ka viirusinfektsiooni korral ja paljud viirused kasutavad erinevaid mehhanisme, et takistada SG moodustamist viiruse kodeeritud mRNA-l. Näiteks *Semliki Forest* viiruse infektsiooni puhul viiruse mittestruktuurne valk (nsP3) C-terminaalne osa seostub G3BPga ja liidab G3BPd viiruse replikatsiooni kompleksiga ning seeläbi on inhibeeritud SG moodustumine viiruse mRNAl (Panas *et al.*, 2012).

Arvatakse, et SG-l on südamik, mis on rikastatud G3BP1 tugeva kestaga, mida on võimalik kiiresti kokku ja lahti pakkida, andes sellega stressigraanulitele plastilisuse ja ka tugevuse. Oletatakse, et südamike moodustamine võib olla oluline mRNP-de kokkupanemisel nende stabiilsemaks muutmiseks. Pole veel kindlaid tõendeid, kuidas toimub SG-de kokkupakkimine kui SG-del puudub selline dünaamiline ning plastiline kest. Kui selle moodustumist mingil viisil häiritakse, soodustab see ebanormaalsete graanulite teket ning seeläbi degeneratiivsete haiguste kujunemist (Jain *et al*., 2016, Rinn ja Guttmann, 2014). Matsuki *et al*. (2012) vaatlesid, kuidas täpsemalt G3BP olemasolu mõjutab SG aktiivsust. G3BP2 moodustab homo- või heteromultimeerseid ühendeid G3BP1-ga, et indutseerida SG teket. Leiti, et kuigi G3BP2 on vähem aktiivsem kui G3BP1, on ta stressi puudumisel siiski võimeline moodustama SG-laadset aktiivsust. Seejuures mõlema valguvormi puudumisel rakust ei moodustu SG-sid vastuseks eIF2α fosforüülimisele või eIF4A inhibitsoonile (Kedersha *et al*, 2016).

Tsai *et al*. (2016) uurisid, kuidas on G3BP1 C-terminaalne RGG domeen oluline SG-ga seondumisel töödeldes selleks U2OS rakke arseniidiga, et tekitada stressitingimused. Leiti, et kuigi G3BP1-RGG ekspressioon oli kahjustatud, moodustus spontaanselt ikkagi SG-sid stressiolukorra vastu. G3BP1 on SG-de südamikus domineeriv valk, mistõttu on G3BP1 fosforüleerimine ja/või arginiini metüleerimine RGG domeenis SG moodustumisel olulised

faktorid. G3BP1 metüleeritakse valgu arginiini metüültransferaaside 1 ja 5 (PRMT1 ja PRMT5) abil ning demetüleerib Jumonji C-domeeni siduvate valgu 6 (JMJD6) abil. G3BP1 metüleeritus sõltub raku oksüdatiivsest stressist, mida kontrollib PRMT 1, ja endoplasmaatilise retiikulumi stressist või kuumašokist, mida kontrollib PRMT 5. JMJD6 on SG-de komponent, mis interakteerub G3BP1-ga ning demetüleerib seda (Tsai *et al*, 2017).

Nagu ülalpool sai kirjeldatud, on G3PB1 RGG domeenil SG koostamisel kriitiline funktsioon. Samal aja on oluline ka valgu NTF2 domeen, mis interakteerub teiste SG komponentidega, nagu Caprin-1 ja USP10, ning ühendab nad RGG-ga. Caprin-1 sidumine G3BP1-ga soodustab SG-de moodustumist, kui samal ajal USP10 ja G3BP1 kompleks pärsib. USP10 on tuntud kui efektiivne deubikvitineerija, et suurendada enda sihtmärk valgu stabiilsust. Caprin-1 on tsütoplasmaatiline valk, mille funktsiooniks arvatakse olevat G3BP1 anfiinsuse suurendamine RNA-ga seondumiseks. (Takayama *et al*, 2018, Guillen-Boixet *et al*, 2020, Reineke *et al*, 2015, Solomon *et al.*, 2007).

1.4 G3BP-de mõju IFITM1-3 mRNA translatsioonile

Iga päev puutub elusorganism kokku võimalike patogeensete viiruste või bakteritega, mis võivad tekitada infektsioone. Sellega võitlemiseks on organismidel välja kujunenud kaitsemehhanism, nimelt kaasasündinud immuunsüsteem. Nimetatud mehhanism ei ole konkreetse patogeeni suhtes spetsiifiline, mistõttu on süsteemile abiks erinevad valgu rühmad kui ka fagotsüütrakud, et kiiresti ära tunda sissetunginud võõrkehi. (Alberts, 2014) Paraku on kaasasündinud imuunsüsteemil ka oluline roll nii kasvaja kui ka vähi arengul. Choi *et al.* (2015) näitasid, et kui võtta sihtmärgiks interferoonid ja nende signaalvastused ning neid inhibeerida, siis vaigistatud rinnavähi faktorid aktiveeruvad.

Interferoonid on tsütokiinid, mida eraldatakse rakulise immuunsüsteemi vastusena viirusinfektsiooni, pahaloomulise kasvaja või mõne muu patogeeni jaoks. Alam ja Kennedy (2019) uurisid, kuidas G3BP-d mõjutavad interferoone indutseerivaid transmembraanseid valke (IFITM), täpsemalt IFITIM1-3 geenide suhtes. Eksperimendis kasutati kahte rakuliini, MCF7 ja MDR. MCF7. MCF7 rakud ei ekspresseeri IFITM1-3 valke ja MDR.MCF7 rakuliin on erinevate ravimite suhtes resistentne. Kuna MCF7 rakuliin on tundlik interferoonide signaalirajale (IFN), siis on võimalik indutseerida IFITM geenide ekspressiooni välise signaaliga (IFNα). Keemiaravi tõttu tekkivad DNA kahjustused võivad (IFN) hüperaktiviseerida ja selletõttu olla suureks rolliks kasvajate metastaaside metabolismil (Gajewski ja Corrales, 2015). Veel lisaks leiti, et nii G3BP1 kui ka G3BP2 on olulised IFITM1-

3 tootlikkusele, seondudes nende 3’-UTR otstega. *In vivo* translatsiooni tulemused näitasid, et G3BP1-2 puudumisel rakus, IFITM1-3 lutsiferaasi reportervalgui ekspressioon vähenes kuni 50%. Kus juures kontroll mRNA (βF1ATPaas) ekspressioon suurenes G3BP1 *knockdown* rakkudes, ja ei muutunud G3BP2 *knockdown* rakkudes. Seega tulemused viitavad, et G3BP1-2 seostuvad IFITM1-3 mRNA 3′-UTR järjestustele ja reguleerivad nende mRNAde ekspressiooni, suurendades valgusünteesi. Pakutakse välja, et G3BP-d interakteeruvad IFITM1-3 ekspressioonil kaks korda: alguses läbi MEK/ERK raja ja teine kord seondudes 3’-UTR otsaga. See on kasulik selleks, et alguses tunneks MEK/ERK rada ära ohu ning laseks IFITM1-3 geenidel aktiveeruda ning seejärel seondub 3’-UTR sabaga, et käivitada interferooni valkude translatsioon (Kennedy ja Alam, 2019).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on:

RNA-seonduvate valkude G3BP2 ja Caprin-1 mõju hindamine valgusünteesile, kasutades raku vaba HEK93FT *in vitro* translatsioonisüsteemi, mis on kodeeritud reporter IFITM1 mRNA-ga.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 HEK293FT rakkude kasvatamine

Inimese embrüonaalse neeru rakuliini HEK293FT rakke kasvatati töös kasutamiseks kolm korda. Algmaterjalidena kasutati vedelas lämmastiku aurus säilitatud 1 ml HEK293FT rakkude krüostokki, 10% veise loote seerumit (FBS) (SIGMA; REF: F7524) ning kõrge glükoosisisaldusega Dulbecco modifitseeritud söödet koos GlutaMAX-ga (DMEM/GlutaMAX) (ThermoFisher; REF: 10566016). DMEM/GlutaMAX söötmele (500 ml) lisati 50ml 10% FBS, et saada 10% FBS lõppkontsentratsioon söötmes. Samuti lisati antibiootikumid penitsilliini-streptomütsiini segu 5 ml (PN / STRP) (SIGMA; REF: P4333). 10 cm läbimõõduga rakukultuuri tassidele (ThermoScientific BioLite; REF: 130181; kultiveeritav ala 60,8 cm2) lisati 10 ml DMEM/GlutaMAX/FBS/PN/STRP söödet ning 1 ml rakke, mis seejärel kasvatati 37 ˚C süsihappegaasi (sisaldus 5%) inkubaatoris Sanyo MCO-19AIC(UV) CO2 Incubator. Peale ühte ööpäeva pärast rakkude külvamist kontrolliti faaskontrastmikroskoopi Eclipse TS100 abil HEK293FT tassile kinnitumist, peale mida tehti söötme vahetus. Vana sööde eemaldati aspiraatori abil ning lisati 10ml uut DMEM/GlutaMAX/FBS/PN/STRP söödet, et eemaldada rakustokist tulnud DMSO. Seejärel asetati rakutass tagasi 37 ˚C süsihappegaasi inkubaatorisse. HEK293FT rakud kasvavad kiirelt, mistõttu kasvatati neid keskelt läbi kuni 2 päeva, et saavutada tassil 70-80% konfluentsus. Järgnevalt eemaldati tassil kogu sööde ning pesti seda 5 ml Hank'i balansseeritud soolalahusega (HBSS) (BioWest; REF: L0607500), mis ei sisaldanud Ca- ega Mg-soolasid, et vabaneda võimalikest söötme jääkidest. Rakkude tassipinnalt lahti saamiseks, et neid jagada neljale T75 rakukultuuri pudelile (Thermo Scientific BioLite; REF: 130190; kultiveeritav ala 75 cm2), kasutati trüpsiini. Selleks lisati tassile 2.5 ml trüpsiini, mis seejärel asetati 5 minutiks inkubeerima 37 ˚C 5%-lise CO_2 kappi. Trüpsiini mõju peatamiseks lisati tassile 12.5 ml söödet, milles ka rakud eelnevalt kasvasid. Enne rakulahuse T75 pudelite vahel jagamist, mõõdeti CytoSmart rakuloenduse abil elavate rakkude kontsentratsioon lahuses, kus madalaim *gating*

range oli 10 µm. Nõnda jaotati saadud lahus nelja T75 pudeli vahel, kus igasse rakukultuuri pudelisse pipeteeriti 3.5 ml rakusöödet. Jällegi oodati 70-80% konfluentsuse saavutamist, mis võttis aega kuni 2 päeva. Konfluentsuse saavutamisel külvati rakud edasi uutele 15 cm läbimõõduga tassile (Thermo Scientific BioLite; REF: 130183; kultiveeritav ala 148 cm2), mida oli kümnes korduses, ja T75 pudelile, mida oli kolmes korduses. Selleks kõrvaldati vana sööde aspiratsiooni abil ja pesti pudeleid 15 ml HBSS-iga. Rakkude T75 pudelipinnalt lahtisaamiseks kasutati 5 ml trüpsiini lahust ning inkubeeriti 3 minutit 37 ˚C 5%-lises CO_2 kapis. Peale trüpsiiniga töötlemist lisati rakkudele 21 ml DMEM meediumit. Järgnevalt lisati igale 15 cm tassile kui ka T74 pudelisse DMEM/GlutaMAX/FBS/PN/STRP söödet vastavalt 21 ml ning 13 ml ja rakulahust vastavalt 4ml ja 1.70 ml. Rakulahuse pipeteeritav kogus arvutati vastavalt rakuloendamisel saadud tulemustele. Sarnaselt eelnevatele etappidele asetati ka need 37 ˚C juurde 5%-lise CO_2 kappi, kus seekord oli oodatav konfluentsus kuni 100%, mis võttis aega kuni 3 päeva. Seejärel rakud koguti kokku lüüsimiseks, et valmistada rakuvaba ekstrakt, mida kirjeldatakse lähemalt järgmises alapeatükis.

2.2.2 Rakuvaba *in vitro* translatsiooniekstrakti valmistamine HEK293FT rakkudest

HEK293FT rakkude lüüsimiseks kasutati isotoonilist lahust. Esmalt valmistati ette Zeba 7 kDa MWCO soola eemaldav spinkolonn (Thermo Scientific; Catalogue number: 89891). Lüüsipuhvri koostises olid 20 mM 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfaat (HEPES, pH 7.5), 150 mM KOAc, 1 mM Mg(OAc)2, 2 mM tris(2-karboksüetüül)fosfiin (TCEP) ja Biopak MQ vesi. Järgnevalt tegeleti rakkudega, kus 15 cm tassidelt eemaldati DMEM/GlutaMAX/FBS/PN/STRP sööde kuniks jäi tassile 4 ml söödet. Rakutassile kinnitunud rakke kaabitseti tassipinnalt maha plastikust spaatliga ning tekkinud lahus koguti kokku kahte 50 ml Falconi tuubi. Seejärel tsentrifuugiti kahte 50 ml Falconi tuubi nurkrootoriga lauatsentrifuugis 2000 rpm ja 4 ˚C juures 5 minutit, selleks, et rakud koguneksid põhja. Ühte rakusademega tuubi lisati 3 ml lüüsipuhvrit ja suspendeeriti kuniks pellet on lahustunud. Tekkinud lahus kanti üle teise tuubi, kus käituti sarnaselt eelnevale, ning edasi jagati see kahe jääl hoitud 2 ml Eppendorfi tuubi. Tuube tsentrifuugiti SIGMA 1-14K lauatsentrifuugiga 2000 rpm ja 4 ˚C juures 2 minutit. Peale supernatandi eemaldamist lisati ühte 2 ml Eppendorfi tuubi 1 ml lüüsipuhvrit, resuspendeeriti ning kanti üle teise 2 ml Eppendorfi tuubi, millele lisati sama kogus lüüsipuhvrit, selles etapis toimus rakkude pesu, et vabaneda söötmest. Tuube tsentrifuugiti sarnaselt eelnevale etapile. Pärast pesu lisati rakusademele samas ruumalas lüüsipuhvrit, mis sisaldas Roche Complete Ultra EDTA-free Mini tabletti (ROCHE cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free; REF: 05 892 791001; 1

tablett 10 ml kohta), mis koosneb proteaasi inhibiitorite segust. Vastavalt rakususpensiooni kogusele töödeldi seda 1 ml rakususpensiooni kohta 3µl 100 mg/ml lüsoletsitiiniga (SIGMA; REF: L4129-25MG), mille käigus kahjustub rakumembraan, mis hõlbustab rakkude lüüsi. Suspensiooni inkubeeriti 4 ˚C juures 2 minutit ja seejärel tsentrifuugiti SIGMA 1-14K lauatsentrifuugis 11 400 rpm ja 4 ˚C juures 45 s. Peale supernatandi eemaldamist lisati rakkudele samas ruumalas, Roche tabletti sisaldavat lüüsipuhvrit ja vitamiin E analoog Trolox, mida tuli lisata 1 ml kohta 4.2 µl 12 mM Troloxist. Vitamiin E analoogi eesmärk on neutraliseerida vabade radikaalide mõju rakkudele, mis tekkisid eelnevas etapis lüsoletsitiini mõjutusel. Järgnevalt lisati tekkinud rakususpensioonile erinevaid RNaasi ja proteaasi inhibiitoreid - RiboLock 0.75 U/ml, 1 ng/µl bestatiini, 100 mM PMSF ja 1 U/µl RNaasi-vaba DNaas I. Lüüsimiseks pipeteeriti 1 ml suspensiooni „LuerLock“ süstlasse (nõela suurusega 26 G), mida hakati intensiivselt läbi nõela suruma 7 korda. Tekkinud lüsaat tsentrifuugiti 11 400 rpm juures 1 min (temperatuur oli 4 ˚C). Supernatant lisati uude tuubi ja rakumembraanide sade visti minema. RNA sisaldust rakuvabas suspensioonis/ekstraktis mõõdeti NanoDrop 1000 spektrofotomeetri abil A260. neelduvuse juures. Tekkinud rakuekstrakt jagati 50 µl kaupa 1.5 ml tuubidesse, mis seejärel vedelas lämmastikus külmutati ning säilitati -80 ˚C juures.

2.2.3 DNA kloonimine vektorplasmiidi pUC19

Töös kasutatava IFITM1-LUC mRNA sünteesiks vajalikku DNA-d klooniti vektorplasmiidi pUC19, mis hiljem transformeeriti DH5α rakkudesse. Eksperimenti alustati kahe restriktsiooni reaktsiooni valmistamisega, kus igas reaktsioonis kasutati, kas DNA-d või vektorit. Esimene reaktsioonisegu sisaldas 5 µl 10 x Puhver E (Promega)/ 0.5 µl BSA/ 0.5 µl HindIII (10U/µl)/ 0.5 µl BamHI (10U/µl)/ 18.5 µl MQ Biopak vesi ning 25 µl IFITM1-LUC (4.8 ng/µl) amplifitseeritud produkti. Teise reaktsioonisegu koostisosad olid 1 µl pUC19 vektor (277 ng/µl)/ 2 µl 10x puhver E/ 0.5 µl BSA/ 0.5 µl HindIII (10U/µl)/ 0.5 µl BamHI (10U/µl)/ / 15.5 µl MQ Biopak vesi. Reaktsioonisegud pandi 1.5 h 37 ˚C juurde inkubeerima. Peale inkubatsiooni inaktiveeriti restriktsiooniensüümid 10 min 65 ˚C juures. Tekkinud restriktsiooniproduktid puhastati QIAquick PCR Purification Kit-i abil. Peale puhastamist hinnati tekkinud DNA kogust spektrofotomeetri NanoDrop 1000-ga, millega mõõdeti tekkinud geneetilise materjali kogust 10x lahjenduses ja lahuse neeldumist 260 nm juures. Seejärel alustati DNA-de kloonimist pUC19 plasmiidi, kus reaktsioonilahus sisaldas 25 µl IF1-LUC DNA-d ning 2.4 µl pUC19/ 3.5 µl 10x ligaasipuhver (ThermoFisherScientific)/ 1 µl T4 DNA ligaas(1U/µl)/ 3.1 µl MQ Biopak vesi. Inserti võeti viis korda rohkem vektori suhtes. Peale reaktsioonisegu valmistamist pandi see 5 min toatemperatuurile inkubeerima. Edasi

pipeteeriti 5 µl valmistatud plasmiid DH5α rakkude sekka, misjärel inkubeeriti neid 30 min jääl. Rakkudele tehti kuumatöötlus 42 ˚C juures 40 sek, seepeale pandi rakud uuesti 2 min jääle. Rakkudele lisati 900 µl LB söödet ning viidi 37 ˚C loksutusmasinasse 1h. Peale aja möödumist tsentrifuugiti rakke SIGMA 1-14K lauatsentrifuugis 3000 rpm ja toatemperatuuril 3 min. Seejärel eemaldati supernatant nii, et tuubi jääks ~ 50 µl söödet ning misjärel rakusade suspendeeriti. Järgmisena pipeteeriti rakud ampitsilliiniga LB agari tassidele ning pandi üleööks kasvama 37 ˚C kappi.

2.2.4 Koloonia PCR DH5α rakkudele

Üleöö kasvanud plaatidel valiti välja 3 transformeeritud tüvedega kolooniat, mis suspendeeriti 10 µl LB söötmes. Edasi valmistati 3.5x Master mix-i, mis sisaldas 7 µl 10x Puhver B (SolisBiodyne)/ 7 µl 25 mM MgCl2/ 3.5 µl 10 µM M-13 f-primer/ 3.5 µl 10 µM M-13 r-primer/ 3.5 µl 4 mM dNTPs/ 0.7 µl Firepol DNA polümeraas (5U/µl) (SolisBiodyne)/ 44.8 µl MQ Biopak vesi. Kokku segati kolm 20 µl PCR reaktsiooni replikaati, mis sisaldas 19.5 µl 3.5x Master mix-i ja 0.5 µl 10 µl LB söötmes suspendeeritud rakke. PCR reaktsiooni viidi läbi sarnaselt 2.2.3 alapeatükis kirjeldatule. PCR reaktsiooni käimise ajal valmistati 1% Tris-atsetaat-EDTA agaroosgeel, mis valmistati sarnaselt 2.2.3 alapeatükis kirjeldatule. PCR reaktsioonist saadud materjalile lisati 4 µl 6x TriTrack DNA laadimisvärvi. Geelile lisati veel 5 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder (1 µg/µl) markerit, mis sisaldas 1 µl 6x TriTrack DNA laadimisvärvi. Geelelektroforeesi teostati toatemperatuuril 100 V juures kuni 40 minutit. Kasutades 314 nm UV-lampi lõigati suurusmarkeri 2000 bp triibu lähedalt geelitükikesi, kuna IFITM1-Luc DNA sisaldab 2015 aluspaari. DNA eraldamiseks geelist kasutati sarnaselt 2.2.3 alapeatükis kirjeldatule GeneJET protokolli. Spektrofotomeetri NanoDrop 100 abil hinnati DNA neeldumist 260 nm, peale mina säilitati seda -20 ˚C juures.

2.2.5 IFITM1 mRNA matriits DNA kloneerimine

Töös tarvitatava mRNA sünteesiks vajaminevat DNA-d amplifitseeriti polümeraas ahelreaktsiooni (PCR) mehhanismi abil. Reaktsioonisegu sisaldas 10 µl 5 x Phusion HF puhver (ThermoFischerScientific)/ 2.5 µl 10 µM IFITM1-F praimer/ 2.5 µl 10 µM IFITM1-R praimer (mõlema praimeri järestus tabel 2)/ 2.5 µl mM dNTP/ 1.25 µl Phusion HF DNA polümeraas (2U/µl)(ThermoFischerScientific)/ 1.25 µl DMSO/ 2.5 µl IFITM1-LUC DNA (4.8 ng/µl) (tellitud IDT), mille DNA järjestus on toodud tabelis 1. PCR reaktsiooni viidi läbi PCR masinas Eppendorf MasterCycler ep gradient S. Programm koosnes järgnevast tsüklist: 1 tsükkel (40 sek 98 ˚C juures); 35 tsüklit (10 sek 98 ˚C juures, anneling protsess: 15 s 65 ˚C ja extend protsess: 45 s 72 ˚C juures); 1 tsükkel (5 min 72 ˚C juures); 4 ˚C juures kuni lõpmatuseni.

Samal ajal kui PCR reaktsioon oli käimas, valmistati 1% agaroosgeel, mis sisaldas 2 g agaroosi ning 200 ml 1x Tris-atsetaat-EDTA (TAE). Lahust kuumutati mikrolaineahjus, kuniks agaroos oli täielikult lahustunud, misjärel jäeti see jahtuma kuni 50-60 ˚C-ni. Kui lahus oli jahtunud soovitud temperatuurini, pipeteeriti sinna etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioonis 0.5 µg/ml. Pärast seda valati lahus geeli vormi ning asetati see geelivanni, mis täideti 1x TAE puhvriga..

Tabel 1. Töös kasutatud DNA järjestus

IFITM1-LUC DNA (IDT)
5’ATTTCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGAAACGACAGGGGAAAGGAGGTC
TCACTGAGCACCGTCCCAGCATCCGGACACCACAGCGGCCCTTCGCTCCACGC
AGAAAACCACACTTCTCAAACCTTCACTCAACACTTCCTTCCCCAAAGCCAGA
AGATGGGCAACAACAATAACAACAACAATAACAACAATGAAGACGCCAAAAA
CATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAG
AGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCT
TTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAAtaCTTCGAAATG
TCCGTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAG
AATCGTCGTATGCAGTGAAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTTGGGCGC
GTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGA
ATTGCTCAACAGTATGAACATTTCGCAGCCTACCGTAGTGTTTGTTTCCAAAAA
GGGGTTGCAAaAAATTtTGAACGTGCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAAT
TATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAGTCGATGTACACGTT
CGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTC
CTTTGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGG
GTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGcgTCAGATTCTCGCA
TGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAG
TGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATA
TGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGA
TCCCTTCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCA
TTCTTCGCcAAAaGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAA
TTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAA
CGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATC
AGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAG
TTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGgaTACCGGGAAAACGCTGG

GCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGT
TATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCT
ACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTG
ACCGCTTGAAGTCTTTAATTAAATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAA
TTGGAATCGATatTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGCGTGGCAGGT
CTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACTTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCAC
GGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGGCCAGTCAAGTAA
CAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAA
GGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAgaTCCTCATAAAGGC
CAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTAATAGCCGCCCATAGCCTGCAAC
CTTTGCACTCCACTGTGCAA TGCTGGCCCT GCACGCTGGG GCTGTTGCCC
CTGCCCCCTT GGTCCTGCCCCTAGATACAG CAGTTTATAC CCACACACCT
GTCTACAGTG TCATTCAATA AAGTGCACGTGCTTGTGA GGATCCATTT3’

Tabel 2. Töös kasutatud praimerite järjestused.

IFITM1-R praimer (IDT)	ATTT GGATCCTCACAAGCACGTGCAC
IFITM1-F praimer (IDT)	ATTTCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGAAACG
IFIT-p60 praimer (IDT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TCACAAGCACGTGCACTTTATTG

2.2.6 IFITM1-LUC mRNA matriits DNA amlifitseerimine

Sünteesitud mRNA kasutamiseks translatsioonil on vaja polü(A)-saba, mida lisati PCR amplifikatisooni meetodi abil, kus reverse praimer sisaldas 60 nt tümidiini. Reaktsioonis kasutati 10 µl 5x puhver HF/ 2.5 µl 10 µM IFITM1-F praimer/ 2.5 µl IFIT-P60 praimer (tabel 1)/ 2.5 µl 4 mM dNTP/ 1.5 µl Phusion DNA polümeraas (2U/µl)/ 1.5 µl DMSO/ 28.5 µl MQ Biopak vesi/ 1 µl IFITM1-Luc (50 ng/µl) või 1 µl IFITM1-Luc (20 ng/µl). PCR programm koosnes tsüklitest: 1 tsükkel (40 sek 98 ˚C juures); 3 tsüklit (10 sek 98 ˚C juures, anneling protsess: 15 s 51 ˚C ja pikendus protsess: 45 s 72 ˚C juures); 32 tsükkel (10 sek 98 ˚C juures, anneling protsess: 15 s 57 ˚C ja pikendus protsess: 45 s 72 ˚C juures); 1 tsükkel (5 min 72 ˚C juures); 4 ˚C juures kuni lõpmatuseni. Järgnevad etapid läbiti sarnaselt 2.2.3 alapeatükis kirjeldatule, kus lõpuks säilitati tekkinud polü(A)-sabaga mRNA -20 ˚C juures.

2.2.7 mRNA T7 *in vitro* transkriptsioon

IFITM1-Luc mRNA *in vitro* transkriptsiooniks kasutati T7 RNA polümeraasi (RNAP), mis katalüüsib RNA moodustumist 5'-3' suunas. Transkriptsiooni algatamise protsessis tunneb T7 ära spetsiifilise promootorjärjestuse, milleks on T7 promootor. Transkripstiooni reaktsiooni reagentidena kasutati 10 µl IFITM1-Luc polü(A)-sabaga DNA-d (0.8 µg)/ 10 µl 10x T7 puhvrit, mis koosneb 0.5M Tris-HCl (pH 7.5)/ 150 mM MgCl2/ 50 mM DTT/ 20 mM Spermidiin. 100 µl transkriptsioonisegu kohta lisati 20 µl 20 mM rNTP / 2 µl RiboLock (40 U/µl)/ 2.3 µl E. coli pürofosfataasi (PPase) (NEB; M03615)/ 6 µl 32-kordset lahjendust T7 RNAP, mille koostises on 1 µl T7 RNAP (2 µg/µl), 3.2 µl 10x T7 puhver ja 27.8 µl MQ Biopak veest/ 5 µl 100 mM DTT. Seejärel kaeti 1.5 ml Eppendorfi tuubis olev reaktsioonisegu parafilmiga ning inkubeeriti seda 3h 37 ˚C inkubatsioonikapis. Peale transkriptsiooni tehti Zeba 7 kDa MWCO spinnkolonnia abil reaktsioonisegule puhvri vahetus, et eemaldada madalmolekulaarseid ühendeid (nukleotiidid jne.). Pärast transkripstioonisegu kolonnile kandmist tsentrifuugiti seda nurkarootoriga lauatsentrifuugis 4 ˚C juures 2 min pööretel 1500 rpm, millele järgnes mRNA koguse hindamine lahuses spektrofotomeetri NanoDrop 1000 abil. Vahetatud puhvriga reaktsioonisegu töödeldi edasi DNaas I (Promega; REF: M6101), mida pipeteeriti 5 µl koos 10 µl 10-kordset DNaas I reaktsioonipuhvriga (Promega), misjärel see pandi 30 minutiks 37 ˚C juurde inkubeerima. Peale DNaas I töötlust puhastati mRNA-d Qiagen RNeasy Minikit'i abil, kus järgiti tootja ettekirjutusi. Puhastus protsessi alustati 350 µl RLT ja 250 µl 96%-se etanooli (Chem-Lab; CL00.0556.0250) lisamisega RNA lahusele, et seda sadestada, misjärel see lisati ränikolonnile ja tsentrifuugiti 10 000 rpm 25 sekundit. Tekkinud flow-through pipeteeriti tagasi kolonnile, et kindlustada RNA seondumist kolonnile, ning korrati tsentrifuugimist. Järgnevalt tehti kaks pesu kolonnile, kus mõlemal korral lisati kolonnile 500 µl RPE puhvrit, tsentrifuugiti esimesel korral 10 000 rpm 25 sek ja teisel korral 2 min. Mõlemal korral visati tekkinud flow-through ära. Seejärel asetati ränikolonn uude 2 ml tuubi ning tsentrifuugite seda 13 000 rpm 1 min, et elimineerida võimalikud RPE puhvri jäänukid. Järgnevalt inkubeeriti lahust tuubi kaas lahti 5-7 minutit 37 ˚C juures, et aurustuks liigne etanool, mis võiks häirida järgmiseid etappe. RNA elueerimiseks kolonnilt lisati sellele 50 µl RNaasi vaba vett, misjärel seda inkubeeriti 37 ˚C 1 min ja siis tsentrifuugiti 10 000 rpm 1 min. Tekkinud eluaat pipeteeriti tagasi kolonnile ning korrati eelnevat. Lõpuks mõõdeti tekkinud mRNA hulka lahuses spektrofotomeetri NanoDrop 1000 abil, misjärel proov säilitati -20 ˚C juures.

2.2.8 mRNA-le cap1-struktuuri lisamine

Translatsiooni alustamiseks on mRNA- l vaja peale 3' UTR otsas olevat polü(A)-saba ja ka cap-strukruuti 5'-UTR otsas. Selle teostati cappimine kasutades NEB Vaccinia viirusel

põhinevat süsteemi. Selleks pipeteeriti 1.5 ml Eppendorfi tuubi 25 µl IFITM1-lutsiferaasi mRNA-d (2 µg/µl) ja 43 µl MQ Biopak vett, mida seejärel inkubeeriti 3 min 65 ˚C juures. Pärast seda asetati proov 2 minutiks jääle ning lisati 10 µl 10x cappimis puhvrit (NEB; B2080A), 5 µl 10 mM GTP (NEB; N2080A), 5 µl 4 mM S-adenosüülmetioniin (SAM) (NEB; B9003S), 5 µl Vaccinia cappimis ensüüm (NEB; M2080S), 5 µl 50 U/µl MTaas (NEB;M0255S) ning 2 µl 40 U/µl RiboLock RNaasi inhibiitor. Lahusega 1.5 ml tuubi kaas kaeti parafilmiga ning asetati 37 ˚C inkubatsioonikappi 1.5 h. Inkubatsiooni järel kasutati RNA puhastamiseks Qiagen RNeasy Minikit'i, mida kirjeldati 2.2.7 alapeatükis. Viimasena mõõdeti mRNA neeldumine lahuses spektrofotomeetri abil ning säilitati proovi -20 ˚C juures.

2.2.9 *In vitro* translatsioon G3BP2 valguga

HEK293FT rakkude lüüsimisel saadud rakuekstrakti kasutati *in vitro* translatsioonil G3BP2 valgu mõju hindamiseks IFITM1-Luc mRNA-le. Katset korrati neli korda. Esmalt tehti ekstraktile nukleaasi töötlus, et lagundada ära endogeenne mRNA. MNasi töötluseks kasutati 50 µl ekstrakti, millele lisati 0.5 µl 1.125 U/µl MNaas, 0.75 µl 25 mM CaCl2 ja inkubeeriti toatemperatuuril 15 min. Seejärel MNase inaktiveeriti, lisades 0.6 µl 125 mM EGTA. Ühe *in vitro* translatsioonisegu ruumala oli 10 µl. mRNA ja G3BP2 pre-inkubeeriti enne translatsioonisegule lisamist. Erinevas kontsentratsioonis G3BP2 (0 – 800 nM) segati kokku 0.3 µg IFITM1-LUC mRNAga. Hoidmaks ühesugust soola (150 mM KOAc) kontsentratsiooni pre-inkubatsioonisegus, lisati vahelahjenduste kaudu erinevatele G3BP2le vastavas koguses soolalahust (Tabelid 3-5). Translatsiooni eksperimenti lisati 1.8 µl mRNA-G3BP2 pre-inkubatsioonisegu. MNase töödeldud HEK293FT rakuvaba ekstrakti lisati 5 µl, 1 µl translatsiooni segu (8.6 mM HEPES, pH7.5/ 20 mM Kreatiin fosfaat/ 0.1 µg/µl Kreatiin kinaas/ 0.1 mM spermidiin/ 100 µM aminohapped/ 1 mM ATP/GTP). Soolade ja ioonide kontsentratsioon lõppkatses oli 30 mM HEPES, pH7.5/165 mM KOAc/1 mM MgOAc/ 0.5 mM TCEP/ 0.2 mM spermidiin/ 0.1 mM putrestsiin. Nende lisamiseks tehti 10x Soolalahus, mida lisati 1 µl kümne mikroliitri reaktsioonisegu kohta. Superaas RNaas inhibiitorit (20 U/□l) lisati 0.2 µl kümne mikroliitri reaktsiooniruumala kohta. Imetajatel on 4 ensüümi, mis erinevate tingimuste juures fosforüülivad eIF2-GDP Ser51 positsioonis (Donnelly *et al*., 2013). Töös kasutatakse kahte valku K3L ja GADD34, mis defosforüülivad või mimikeerivad eIF2α subühikut. Lisafaktoritena kasutatakse ka puhastatud eIF4E ja PABP, mis tõstavad valgusünteesitaset. Seetõttu lisatakse viimasena 0.5 µl K3L/GADD34/eIF4E/PABP (27/4/2/8 µM, vastavalt) (K3L) segu. Kõigi katsete puhul tehti kaks replikaati. Seejärel inkubeeriti PCR

tuube Eppendorfi PCR masinas 30 min 30 ˚C juures. Peale inkubatsiooni mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust „Steady-Go“ programmi abil, mida kirjeldatakse 2.2.11 alapeatükis.

Tabel 3. Katses A kasutatud G3BP2 lahjendustabel

f.c G3BP2	0 µM	1 µM	2 µM	4 µM	8 µM
10 µM G3BP2	-	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl
G3BP2 säilitamispuhver (17.2x)	1µl	-	-	-	-
157 mM KOAc	9 µl	9 µl	-	-	-
165.6 mM KOAc	-	-	8 µl	-	-
192 mM KOAc	-	-	-	6 µl	-
400 mM KOAc	-	-	-	-	2 µl
f.c. K^+ (mM)	150	150	150	150	150

Tabel 4. Katses B kasutatud G3BP2 lahjendustabel

f.c. G3BP2	0 µl	100 nM	300 nM	2 µM
10 µM G3BP2	-	1 µl	1 µl	2 µl
G3BP2 säilitamispuhver (17.2x)	1 µl	-	-	-
157 mM KOAc	9 µl	99 µl	32.3 µl	-
165.5 mM KOAc	-	-	-	8 µl
f.c. K^+ (mM)	150	150	150	150

Tabel 5. Katsetes C ja D kasutatud G3BP2 lahjendustabel

f.c. G3BP2	0 µM	1 µl/ 1.1 µl	2 µl/ 2.2 µl	4 µl/ 4.4 µl	8 µl/ 8.8 µl
10 µM G3BP2	-	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl
150 mM K^+ / 20 mM HEPES7.5	2 µl	9 µl/ 8 µl	8 µl/ 7 µl	6 µl/ 5 µl	2 µl/ 1 µl
f.c. K^+ (mM)	150	150	150	150	150

2.2.10 *In vitro* translatsioon valkudega G3BP2 ja Caprin-1

Sarnaselt 2.2.9 alapeatükis kirjeldatule kasutati translatsioonil valkude G3BP2 ja Caprin-1 koosmõju hindamiseks IFITM1-Luc mRNA-le HEK293FT rakkude lüüsil saadud rakuekstrakti. Järgnevalt tehti nn baaspuhvrid Caprin-1+G3BP2 lahjenduste jaoks, mis on kirjas Tabel 6. *In vitro* translatsioon viidi läbi sarnaselt 2.2.9 alapeatükis. Segati kokku Caprin-1+G3BP2 lahjendused Ttabel 7.) ning ka DNALoBind tuubi mRNA segu, mis koosnes IFITM1-Luc mRNA-st ja 1.39x mRNA puhvrist. mRNA segu kogused arvutati vastavalt replikaatide kogusele. Preinkubatsiooniks pipeteeriti omavahel kokku 4 µl mRNA segu ja 4 µl Caprin-1+G3BP2 lahjendused, mis jäeti 5 minutiks toatemperatuurile inkubeerima. Preinkubatsioonisegu ja translatsiooni mastermix pipeteeriti eelnevalt jääl hoitud PCR tuubidesse 8.2 µl Master segu ning 1.8 µl preinkubeeritud mRNA segu. Katse jaoks tehti kaks replikaati. Seejärel inkubeeriti PCR tuube Eppendorfi PCR masinas 30 min 30 ˚C juures. Translatsioonil tekkinud valgu lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti „Steady-Go“ programmi abil, mida kirjeldatakse 2.2.11 alapeatükis.

Tabel 6. Baaspuhvrid Caprin-1+G3BP2 lahjenduste jaoks

	BBC	BB0	BB83	BB167	BB334
351 mM KOAc	51.3 µl	45.7 µl	44 µl	42.3 µl	38.9 µl
19.2% glütserool	22.6 µl	20 µl	17.5 µl	15 µl	10 µl
10 mM HEPES7.5	46.1 µl	44.3 µl	38.5 µl	32.7 µl	21.1 µl
Lõppruumala	120 µl	110 µl	100 µl	90 µl	70 µl

Tabel 7. Caprin-1+G3BP2 lahjendusrida

f.c. Caprin-1	CTRL	0 µl	0.83 µl	1.67 µl	3.34 µl	6.67 µl
Caprin-1 (10 µM)	-	-	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl
G3BP2 (20 mM)	-	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Baaspuhvrid	12 µl	11 µl	10 µl	9 µl	7 µl	3 µl (374 mM KOAc)
Lõppruumala	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

2.2.11 Lutsiferaasi koguse mõõtmine translatsiooniproovidest

Katses kasutati lutsiferaasi reagenti Steady-Glo Luciferase Assay System, mida pipeteeriti 50 µl kaupa 96 Microplate plaadile ja 4 µl *in vitro* valgusünteesi proovi. Lutsiferaasi signaali

tugevuse hindamiseks kasutati Promega Glomax 96 Microplate luminomeetri “Steady-Glo” programmi.

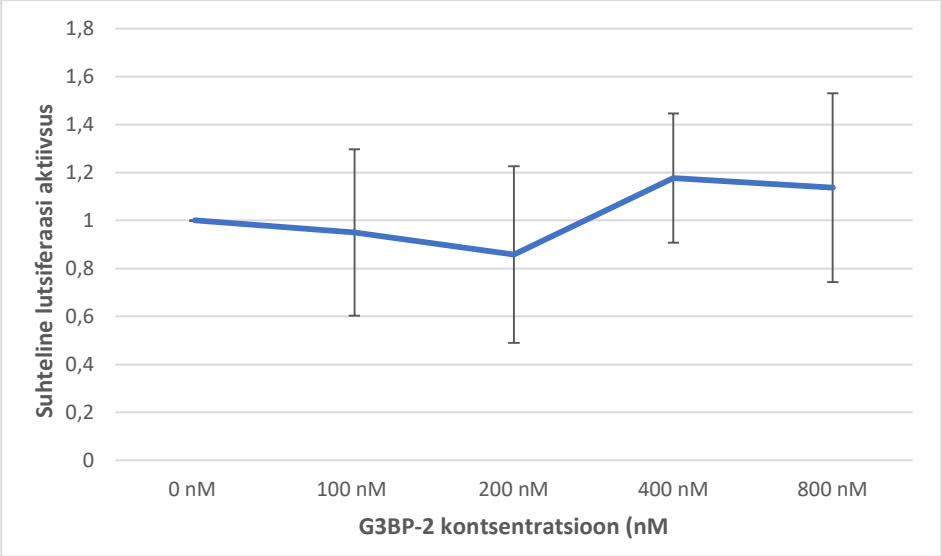
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 G3BP2 mõju IFITM1-Luc mRNA translatsioonile

Töös uuritakse G3BP2, kuna uurimisrühm tuvastas eelnevalt, et G3BP2 võiks otseselt seostuda ribosoomidega roti neuronite RNA graanulites. Nagu kirjanduse ülevaates tuleb välja, et G3BP2 on oluline roll translatsiooni regulatsioonis ning sellega seonduvate ribosomaalsete komplekside moodustamisel kui ka assambleerumisel nii stressigraanulite kui ka neuronite RNA graanulite näol. IFITM1 mRNAd kasutatakse katses, kuna *in vivo* translatsiooni eksperimendid on näidanud, et G3BP2 seondub IFITM1 mRNA 3’UTR järjestusele ja G3BP2 *knockout* rakuliinis on IFITM1 valgu ekspressioon vähenenud 50% (Alam and Kennedy, 2019). Seega võiks eeldada, et G3BP2 suurendab IFITM1 mRNA valgusünteesi taset. *In vitro* rakuvaba translatsiooni läbiviimiseks on vaja rakuvaba ekstrakti, reporter mRNAd ja lisafaktoreid (K3L, GADD34, PABP, eIF4E), mis suurendavad valgusünteesi aktiivsust. Uurimisgrupp oli eelnevalt optimeerinud *in vitro* translatsiooni süsteemi tingimusi ioonsete (K+, Mg2+), polüamiinide (spermidiin ja putresiin), lisafaktorite (K3L, GADD34, eIF4E ja PABP) ja mRNA kontsentratsiooni suhtes. Töös kasutatakse HEK293FT rakuvaba ekstrakti, mis sisaldab rakkude tsütoplasmaatilist fraktsiooni (ribosoomid, translatsioonifaktorid, tRNAd jne.). IFITM1 mRNA on *in vitro* sünteesitud ja sisaldab Cap1-struktuuri, polü(A) saba (60nt), 5’ ja 3’ IFITM1 mittetransleerivat ala ja kodeeriva osana reporter lusifraasi järjestust Inimese valk G3BP2 oli uurimisgrupi poolt eelnevalt puhastatud *E. coli* Rosetta tüves. Hindamaks G3BP2 mõju *in vitro* valgusünteesile, tiitritakse erinevates kontsentratsioonides G3BP2 statsionaarse IFITM1 mRNA kontsentratsiooni suhtes.

Tulemused näitavad, et G3BP2 valgul on IFITM1-Luc mRNA translatsiooniprotsessile mõju, kuigi tulemused replikaatide vahel on kõikuvad (joonis 3). G3BP2 kontsentratsioonidel 100 – 200 nM pole valgusünteesile märkimisväärset mõju, kuid 400 nM juures on translatsiooni aktviisus tõusnud 20%. Saadud tulemuste põhjal võib väita, et G3BP2 valgul on IFITM1 reportervalgule positiivne mõju. Alam ja Kennedy (2019) *in vivo* tulemustes oli kuni 50% aktiivsuse suurenemine näha IFITM1 3’UTR jäjestust sisaldava mRNA puhul. Katsed on muidugi erinevad, kuna *in vivo* eksperimendis kasutati G3BPde knockout rakuliine ja otseselt ei mõõdetud translatsiooni aktiivsuse suurenemist, vaid valkude puudumisel IFITM1 valgusünteesi vähenemist. Üldjoontes näitavad *in vitro* translatsiooni tulemused, et G3BP2 on

võimeline kõrgemates kontsentratsioonides suurendama valgu hulka IFITM1 mRNAlt. Saadud tulemustes esineb suurt varieeruvust, mille põhjuseks võib olla mitmete väikeste ruumalade pipeteerimine, mis võivad suurendada pipeteerimisvigade esinemist.



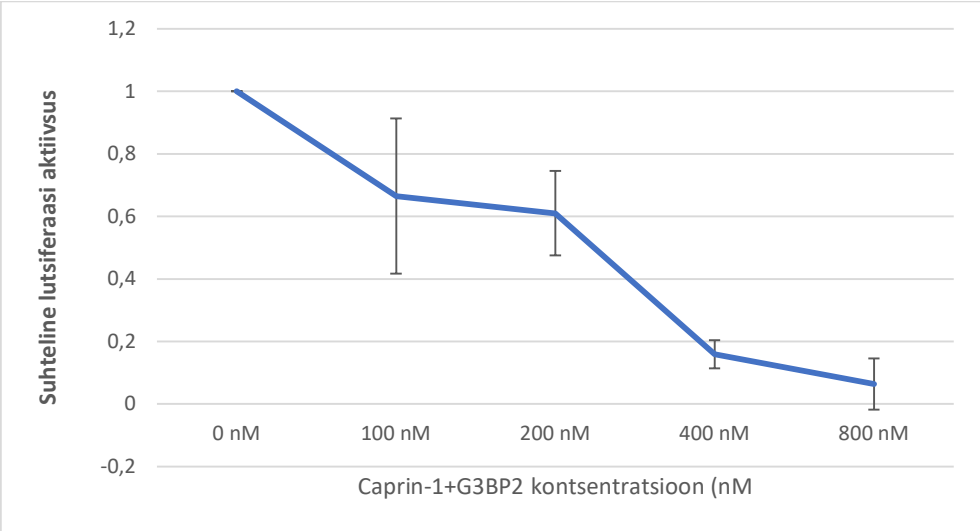
Joonis 2. G3BP2 valgu mõju IFITM1-Luc translatsioonisüsteemile HEK293FT rakuvabas ekstraktis. x-teljel on presenteeritud G3BP2 kontsentratsioonid (0 nM, 100nM, 200 nM, 400 nM ja 800 nM) IFITM1-Luc translatsioonireaktsioonil ja y-teljel suhtelised IFITM1 mRNA lutsiferaasi aktiivsused, kus G3BP2 mittelisamise punkt (0 nM) on võetud üheks (100%) ning varieeruvused arvutatud null punkti suhtes.

2.3.2 Caprin-1 ja G3BP2 koosmõju hindamine IFITM1 mRNA translatsioonile

G3BP2 ja Caprin-1 on mõlemad RNA-seonduvad valgud ning erinevate translatsiooniliste etappide mõjutajad. Caprin-1 spetsiifilisemalt mõjutab G3BP1 valgu seondumist SG-le soodustades nende teket, mistõttu võib eeldada Caprin-1 inhibeerivat mõju IFITM1-Luc translatsioonile. Varasemalt on teada, et G3BP-2 + Caprin-1 koostoimel on soodustatud SG moodustumine ja seeläbi translatsiooni inhibitsioon. Pole teada G3BP-2 ja Caprin-1 mõju IFITM1 mRNA reportervalgu sünteesile.

Mõlema valgu kooslisamisel HEK293FT *in vitro* translatsioonisüsteemile on märgatav reportervalgu translatsiooni produktiivsuse langus, mis on positiivses korrelatsioonis lisatud G3BP2 + Caprin-1 koostoimele (joonis 3). G3BP2 + Caprin1 mittelisamise ja 800 nM kontsentratsiooni erinevus on ~16 kordne. Sellest tulenevalt tõestavad tulemused Caprin-1 ja G3BP2 valgu inhibeerivat mõju IFITM1 reportervalgu translatsioonile. Samas ei saa välistada, et nähtud efekt on põhjustatud ainult Caprin-1 ja ei ole seotud G3BP2ga. Selleks tuleks teha

eksperiment ainult Caprin-1, kus ei ole lisatud G3BP2. Kahjuks ei jõutud selle bakalaurusetöö raames neid eksperimente teha. Kuna tulemused näitavad G3BP2 ja Caprin-1 tugevat inhibeerivat mõju IFITM1 mRNA translatsioonile, siis saab kasutada samu tingimusi, et moodustada suuremas koguses komplekse struktuuribioloogilisteks uuringuteks



Joonis 3. G3BP2 + Caprin-1 kompleksi mõju IFITM1-Luc translatsioonisüsteemile HEK293FT rakuvabas ekstraktis. x-teljel on presenteeritud G3BP2 + Caprin-1 reaktsioonisegu kontsentratsioonid IFITM1-Luc translatsioonil, kus 0 nM, 100nM, 200 nM, 400 nM ja 800 nM on Carpin-1 kontsentratsioonid ning G3BP2 valgu kontsentratsioon oli stabiilselt 53 µM. y-teljel on märgitud suhtelised IFITM1 mRNA lutsiferaasi aktiivsused.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös hinnati RNA-seonduvate valkude G3BP2 ja Caprin-1 mõju IFITM1 reportervalgu translatsioonile HEK293FT *in vitro* rakuekstraktis. Analüüsiti stressigraanulite kui ka neuraalsete RNA graanulite moodustamisel kesksel kohal olevate RNA-seonduvate valkude mõju translatsioonile.

Materjali vähesuse tõttu oleme kohustatud töötama väikeste kogustega ja see toob kaasa suurema pipeteerimiste ebatäpsuse. See võib seletada saadud tulemuste varieeruvust. Teine põhjus võib olla RBP-de osaliselt korrastamata struktuurid, mis võivad agregeerida. Antud töö raames jäid tegemata Caprin-1 mõju kontrollimine IFITM1-Luc valgusünteesile.

Saadud tulemustest selgub, et G3BP2 avaldab valgusünteesile positiivset mõju kui samalajal koos Caprin-1 negatiivset inhibeerivat mõju. G3BP2 mõju valgusünteesile on palju tugevam lisatud valgu kõrgematel kontsentratsioonidel kui madalamatel, kuid seejuures on erinevus vaid 0.85 kordne 0 nM ja 400 nM kontsentratsioonide vahel. G3BP2 positiivne mõju IFITM1 mRNA translatsioonile on kooskõlas kirjandusest eelnevalt teadaolnud efektile. See-eest Caprin-1 ja G3BP2 koosmõjul on tugev negatiivne mõju IFITM1-Luc mRNA translatsioonile, kus 800 nM Caprin-1 kontsentratsiooni juures on ~16 kordne lutsiferaasi aktiivsuse langus. Eelnevalt ei ole tehtud G3BP2 ja Caprin-1 koosmõjude uuringuid IFITM1 mRNAle. Tugev inhibeeriv mõju võib viidata sellele, et Caprin-1 soodustada SG laadsete mRNA komplekside teket, mis ei lase ribosoomidel IFITM1 mRNAd transleerida.

Regulatory effect of G3BP2 protein synthesis on IFITM1 mRNA

Minna-Maria Lass

Summary

This work evaluated the effect of RNA-binding proteins G3BP2 and Caprin-1 on the translation of IFITM1 mRNA using HEK293FT in vitro cell extracts. The translational activity of RNA-binding proteins, which are central to the formation of stress granules as well as neural RNA granules, was analyzed.

Due to the scarcity of the material, we are obligated to operate with small volumes and hence, it will lead to higher pipetting inaccuracy. This might explain the variability of the results obtained. Another reason could be due to partially disordered structures of RBPs, they may aggregate or bind non-specifically to PCR tubes.

The results show that G3BP2 has a positive effect on protein synthesis but also a negative and inhibitory effect of Caprin-1. The effect of G3BP2 on protein synthesis is much stronger at higher concentrations of added protein than at lower concentrations, but the difference is only 0.85-fold between 0 nM and 400 nM. In contrast, the Caprin1 and G3BP2 has a strong negative inhibiting effect on IFITM1-Luc mRNA translation, with a 16-fold decrease in luciferase activity at 800 nM Caprin-1 concentration. There is no studies previously done using both proteins (G3BP2 and Caprin-1) to evaluate their effect on IFITM1 mRNA translation. The potent inhibitory effect may suggest that Caprin-1 promotes the formation of SG-like mRNA complexes that prevent ribosomes from translating IFITM1 mRNA.

KIRJANDUSE LOETELU

1. Alam U., Kennedy D. (2019). G3BP1 and G3BP2 regulate translation of interferoon-stimulated genees: IFITM1, IFITM2 and IFITM3 in the cancer cell line MCF7. *Molecular and Cellular Biochemistry* 459: 189-204. doi: 10.1007/s11010-019-03562-3

2. Alberts B., Johanson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2014). *Molecular Biology of the Cell, 6th edition*. New York: Garland Science.

3. Anderson P., Kedersha N. (2006). RNA granules. *Journal of Cell Biology* 172 (6): 803-808. doi: 10.1083/jcb.200512082

4. Angenstein F., Evans A. M., Ling S. C., Settlage R. E., Ficarro S., Carrero-Martinez F. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Greenough W. T. (2005). Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (8): 6496–6503. doi: 10.1074/jbc.M412742200

5. Asano K., Krishnamoorthy T., Phan L., Pavitt G. D., Hinnebusch A. G. (1999). Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bϵ, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *The EMBO Journal* 18 (6): 1673-1688. doi: 10.1093/emboj/18.6.1673

6. Birney E., Kumar S., Krainer A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research* 21 (25): 5803-5816. doi: 10.1093/nar/21.25.5803

7. Burd C. G., Dreyfuss G. (1994). Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins. *Science* 265 (5172): 615-621. doi: 10.1126/science.8036511

8. Choi H. J., Lui A., Ogony J., Jan R., Sims P. J., Lewis-Wambi J. (2015). Targeting interferon response genes sensitizes aromatase inhibitor resistant breast cancer cells to estrogen-induced cell death. *Breast Cancer Research* 17 (6). doi: 10.1186/s13058-014-0506-7

9. Cooper G. M. (2000). Chapter 7. Protein Synthesis, Processing, and Regulation*The Cell: A Molecualr Approach. 2nd edition.* Sunderland (MA): Sinauer Associates.

10. Corley M., Burns M. C., Yeo G. W. (2020). How RNA-binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell* 78 (1): 9-29. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.011

11. Donnelly N., Gorman A. M, Gupta S., Samali A. (2013). The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 3493–3511. doi:10.1007/s00018-012-1252-6

12. Dreyfuss G., Philipson L., Mattaj I. W. (1988). Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *Journal of Cell Biology* 106 (5): 1419-1425. doi: 10.1083/jcb.106.5.1419

13. Gajewski T. F., Corrales L. (2015). New perspectives on type I IFNs in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 26 (2): 175-178. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.01.001

14. Gaspar N. J., Kinzy T. G., Scherer B. J., Hümbelin M., Hershey J. W., Merrick W. C. (1994). Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the γ-subunit. *Journal of Biological Chemistry* 269 (5): 3415-3422. doi: 10.1016/S0021-9258(17)41878-3

15. Grill B., Wilson G. M., Zhang K-X., Wang B., Doyonnas R., Quadroni M., Schrader J. W. (2004). Activation/Division of Lymphocytes Results in Increased Levels of Cytoplasmic Activation/Proliferation-Associated Protein-

1: Prototype of a New Family of Proteins. *The Journal of Immunology* 172 (4): 2389-2400. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2389

16. Guillen-Boixet J., Kopach A., Holehouse A. S., ... Franzmann T. M. (2020). RNA-Induced Conformational Switching and Clustering of G3BP Drive Stress Granule Assembly by Condensation. *Cell* 181 (2): 346–361.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.049

17. Heinaru A. (2012). Translatsioon ja geneetiline kood, lk 295-311. *Geneetika õpik kõrgkoolile.* Tartu Ülikooli Kirjastus: Tartu.

18. Hinnebusch A. G., Ivanov I. P., Sonenberg N. (2016) Translational control by 5′-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 352 (6292): 1413-1416. doi: 10.1126/science.aad9868

19. Hinnebusch A. G., Lorsch J. R. (2012). The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biology* 4 (10): a011544. doi: 10.1101/cshperspect.a011544

20. Huang H. K., Yoon H., Hannig E. M., Donahue T. F. (1997). GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in Saccharomyces cerevisiae. *Genes & Development* 11 (18): 2396-2413. doi: 10.1101/gad.11.18.2396

21. Ito T., Marintchev A., Wagner G. (2004). Solution Structure of Human Initiation Factor eIF2α Reveals Homologyy to the elongation Factor eEF1B. *Structure* 12 (9): 1693-1704. doi: 10.1016/j.str.2004.07.010

22. Jain S., Wheeler J. R., Walters R. W., Agrawal A., Barsic A., Parker R. (2016). ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. *Cell* 164 (3): 487–498. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038

23. Jiang Y. H., Yuen R. K., Jin X., ...Scherer S. W. (2013). Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome

sequencing. *The American Journal of Human Genetics* 93 (2): 249–263.doi: 10.1016/j.ajhg.2013.06.012, PMID: 23849776

24. Kang W, Wang Y, Yang W, Zhang J, Zheng H and Li D (2021). Research Progress on the Structure and Function of G3BP. *Frontiers in Immunology* 12: 718548. doi: 10.3389/fimmu.2021.718548

25. Krapp S., Greiner E., Amin B., Sonnewald U., Krenz B. (2017). The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus. *Virus Research* 227: 6-14. doi: 10.1016/j.virusres.2016.09.021

26. Kedersha N., Chen S., Gilks N., Li W., Miller I. J., Stahl J., Anderson P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Molecular Biology of the Cell* 13 (1): 195–210. doi: 10.1091/mbc.01-05-0221

27. Kedersha N., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. (1999). RNA-Binding Proteins Tia-1 and Tiar Link the Phosphorylation of Eif-2α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *Journal of Cell Biology* 147 (7): 1431-1442. doi:10.1083/jcb.147.7.1431

28. Kedersha N., Panas M. D., Achorn C. A., ... Anderson P. (2016). G3BP-Caprin1-USP10 Complexes Mediate Stress Granule Condensation and Associate With 40S Subunits. *Journal of Cell Biology* 212 (7): 845–860. doi: 10.1083/jcb.201508028

29. Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fritzler M. J., Scheuner D., Kaufman R. J., Golan D. E., Anderson P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *Journal of Cell Biology* 169 (6): 871–884. doi: 10.1083/jcb.200502088

30. Kennedy D., French J., Guitard E., Ru K., Tocque B., Mattick J. (2001). Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and ras GAP 120 binding studies. *Journal of Cellular Biochemistry* 84: 173–187. doi: 10.1002/jcb.1277

31. Kumar P., Hellen C. U. T., Pestova T. V. (2016). Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes & Development* 30: 1573-1588. doi: 10.1101/gad.282418.116

32. Laver J. D., Ly J., Winn A. K., ... Lipshitz H. D. (2020). The RNA-Binding Protein Rasputin/G3BP Enhances the Stability and Translation of Its Target mRNAs. *Cell Reports* 30: 3353-3367. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.066

33. Li X., Zhu Q., Shi X., ... Yi W. (2019). O-GlcNAcylation of core components of the translation initiation machinery regulates protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (16): 7857–7866. doi:10.1073/pnas.1813026116

34. Matsuki H., Takahshi M., Higuchi M., Makokha G. N., Oie M., Fujii M. (2012). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells* 18 (2): 135-146. doi: 10.1111/gtc.12023

35. Moras D., Poterszman A. (1995). RNA-protein interactions. Diverse modes of recognition. *Current Biology* 5 (3): 249-251. doi: 10.1016/s0960-9822(95)00051-0

36. Muaddi H., Majumde, M., Peidis P., Papadakis A. I., Holcik M., Scheuner D., Kaufman R. J., Hatzoglou M., Koromilas A. E. (2010). Phosphorylation of eIF2α at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency. *Molecular biology of the cell* 21 (18): 3220–3231. doi:10.1091/mbc.E10-01-0023

37. Panas M. D., Varjak M., Lulla A., Eng K. E., Merits A., Karlsson Hedestam G. B., McInerney G. M. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient

translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Molecular biology of the cell* 23 (24): 4701–4712. doi:10.1091/mbc.E12-08-0619

38. Parker F., Maurier F., Delumeau I., Duchesne M., Faucher D., Debussche L., Dugue A., Schweighoffer F., Tocque B. (1996). A Ras-GTPase-Activating Protein SH3-Domain-Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology* 16 (6): 2561-2569. doi: 10.1128/MCB.16.6.2561

39. Ohashi R, Takao K, Miyakawa T, Shiina N. (2016). Comprehensive behavioral analysis of RNG105 (Caprin1) heterozygous mice: Reduced social interaction and attenuated response to novelty. *Scientific Reports* 6: 20775. doi: 10.1038/srep20775, PMID: 26865403

40. Reineke L. C., Lloyd R. E. (2015). The Stress Granule Protein G3BP1 Recruits Protein Kinase R to Promote Multiple Innate Immune Antiviral Responses. *Journal of Virology* 89 (5): 2575–2589. doi: 10.1128/JVI.02791-14

41. Schmitt E., Naveau M., Mechulam Y. (2010). Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS letter* 584 (2): 405-412. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.002.

42. Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. (2002). The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors. *The EMBO Journal* 21 (7): 1821-1832. doi: 10.1093/emboj/21.7.1821.

43. Sekiyama N., Arthanari H., Papadopoulos E., Rodriquez-Mias R. A., Wagner G., Leger-Abraham M. (2015). Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 112 (30): E4036-4045. doi: 10.1073/pnas.1512118112

44. SenGupta D. (2013). RNA-Binding Domains in Proteins. *Brenner's Encyclopedia of Genetics 2th*: 274-276. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01356-5

45. Shiina N., Shinkura K., Tokunaga M. (2005). A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation. *Journal of Neuroscience* 25 (17): 4420–4434. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0382-05.2005

46. Shiina N, Tokunaga M. (2010). RNA granule protein 140 (RNG140), a paralog of RNG105 localized to distinct RNA granules in neuronal dendrites in the adult vertebrate brain. *Journal of Biological Chemistry* 285 (31):24260–24269. doi: 10.1074/jbc.M110.108944, PMID: 20516077

47. Shiina N., Yamaguchi K., Tokonaga M. (2010). RNG105 Deficiency Impairs the Dendritic Localization of mRNAs for Na^+/K^+ ATPase Subunit Isoforms and Leads to the Degeneration of Neuronal Networks. *Journal of Neuroscience* 30 (38): 12816-12830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6386-09.2010

48. Solomon S., Xu Y., Wang B., David M. D., Schubert P., Kennedy D., Scrader J. W. (2007). Distinct Structural Features of Caprin-1 Mediate Its Interaction with G3BP-1 and Its Induction of Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2α, Entry to Cytoplasmic Stress Granules, and Selective Interaction with a Subset of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2324-2342. doi: 10.1128/MCB.02300-06

49. Sudhakar A., Ramachandran A., Ghosh S., Hasnain S. E., Kaufman R. J., Ramaiah K. V. (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39 (42): 12929-12938. doi: 10.1021/bi0008682

50. Topisirovic I., Svitkin Y. V., Sonenberg N., Shatkin A. J. (2011). Cap and cap-binding proteins in the Control of gene expression. *Wiley Interdisciplinart Reviews* 2 (2): 277-298. doi: 10.1002/wrna.52

51. Tourrière H., Gallouzi I. E., Chebli K., Capony J. P., Mouaikel J., van der Geer P., Tazi J. (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Molecular and cellular biology* 21 (22): 7747–7760. doi:10.1128/MCB.21.22.7747-7760.2001

52. Tsai W-C., Gayatri S., Reineke L. C., Sbardella G., Bedford M. T., Lloyd R. E. (2016). Arginine Demethylation of G3BP1 Promotes Stress Granule Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 291 (43): 22671–22685. doi: 10.1074/jbc.M116.739573

53. Tsai W-C, Reineke L. C., Jain A, Jung S. Y., Lloyd R. E. (2017). Histone Arginine Demethylase JMJD6 is Linked to Stress Granule Assembly Through Demethylation of the Stress Granule-Nucleating Protein G3BP1. *Journal of Biological Chemisrty* 292 (46): 18886–18896. doi: 10.1074/jbc.M117.800706

54. Wu Y., Zhu J., Huang X., Zhou X., Du Z. (2019). Crystal structure of a dimerization domain of human Caprin-2: similar overall dimeric fold but different molecular surface properties to that of human Caprin-1. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (15): 3968-3975. doi: 10.1080/07391102.2018.1532817

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Minna-Maria Lass,

(autori nimi)

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

G3BP2 valgusünteesi reguleeriv mõju IFITM1 mRNA-le,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on PhD Arto Pulk ja Abbas Mansour,

(juhendajate nimed)

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi 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.

Minna-Maria Lass

27.05.2022