

TARTU ÜLIKOOL

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

**Pagaripärmi ribosoomi peptidüültransferaasi keskuse piirkonnas paiknevate  
evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonide mõju  
temperatuuritundlikkusele**

Magistritöö

30 EAP

Ronald Varik

Juhendajad Margus Leppik, PhD

Prof. Tiina Tamm, PhD

TARTU 2025

## INFOLEHT

### **Pagaripärmi ribosoomi peptidüültransferaasi keskuse piirkonnas paiknevate evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonide mõju temperatuuritundlikkusele**

Ribosoomi koostises olevad RNA molekulid sisaldavad palju modifitseeritud nukleotiide. Ribosomaalse RNA modifikatsioonidel on tähtis roll ribosoomi funktsiooni optimeerimisel. Väikesed tuumakese RNA-d ehk snoRNA-d on üheks viisiks, kuidas rRNA modifikatsioonide muster määratakse. Eriti tähtis roll on omistatud modifikatsioonidele, mis asuvad ribosoomi funktsionaalsetes piirkondades nagu näiteks peptidüültransferaasi keskuses. PTC-s leidub nii evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioone kui ka mittekonserveerunud modifikatsioone. Käesolevas töös selgitatakse, kuidas nelja konserveerunud PTC modifikatsiooni ( $\Psi$ 2826, Um2921, Gm2619, m<sup>5</sup>C2870) puudumine mõjutab *S. cerevisiae* külmatundlikkust.

**Märksõnad:** ribosoom, rRNA, snoRNA, valgusüntees, PTC, modifikatsioonid

**CERCS kood:** P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

### **Temperature sensitivity affected by evolutionarily conserved rRNA modifications in the peptidyl transferase center of budding yeast ribosomes**

The RNA molecules that make up the ribosome contain many modified nucleotides. Ribosomal RNA modifications play an important role in optimizing ribosomal functions. Small nucleolar RNAs, or snoRNAs, are one way to determine the pattern of rRNA modifications. A particularly important role has been attributed to modifications located in functional regions of the ribosome, such as the peptidyl transferase center. Both evolutionarily conserved rRNA modifications and non-conserved modifications are found in the PTC. This masters thesis explains how the absence four conserved PTC modifications ( $\Psi$ 2826, Um2921, Gm2619, m<sup>5</sup>C2870) affect cold sensitivity in *S. cerevisiae*.

**Keywords:** ribosome, rRNA, snoRNA, protein synthesis, PTC, modifications

**CERCS code:** P320 Nucleic acids, protein synthesis

## SISUKORD

<b>INFOLEHT</b> .....	<b>2</b>
<b>SISUKORD</b> .....	<b>3</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>7</b>
1.1 Ribosoomi struktuur.....	7
1.2 Ribosoomi biogenees.....	9
1.3 Translatsioon.....	11
1.4 rRNA modifikatsioonid PTC-s.....	12
1.5 snoRNA-d.....	15
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>18</b>
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Metoodika.....	18
2.2.1 Kasutatud plasmiidid, praimerid, söötmed ja tüved.....	18
2.2.2 Genoomse DNA eraldamine liitumatsetaadi meetodil.....	22
2.2.3 snR geenide amplifitseerimine genoomselt DNA-lt PCR meetodil.....	22
2.2.4 DNA puhastamine FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit-ga.....	23
2.2.5 Restriktaasi töötlus.....	23
2.2.6 Ligeerimine.....	24
2.2.7 E.coli transformeerimine.....	24
2.2.8 Plasmidi kontrollimine koloonia PCR meetodil.....	25
2.2.9 FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit.....	26
2.2.10 Pagaripärmi transformeerimine liitumatsetaadi meetodil.....	26
2.2.11 Pärm 80S ribosoomide puhastamine.....	27
2.2.12 Ribosoomidest rRNA puhastamine fenool/kloroform meetodil.....	28
2.2.13 CMCT-ga modifitseerimine $\Psi$ määramiseks.....	29
2.2.14 Praimer ekstensioon.....	29
2.2.15 Tilk-külv analüüs.....	30
<b>2.3 TULEMUSED JA ARUTELU</b> .....	<b>31</b>
2.3.1 Tüvede konstrueerimine.....	31
2.3.2 Konstrueeritud plasmidi sisaldavatest tüvedest puuduvad vaid evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonid.....	33
2.3.3 Konserveerunud modifikatsioonid mõjutavad külmatundlikkust.....	39
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>44</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>45</b>
<b>TÄNUSÕNAD</b> .....	<b>46</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>47</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b> .....	<b>51</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>52</b>

Lisa 1.....	52
Lisa 2.....	53
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>54</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

ASE – *antisens element* (antisens element)

CF – *core factor* (tuuma faktor)

dNTP – *deoxyribonucleotide triphosphate* (deoksüribonukleotiidtrifosfaat)

eIFs – *eukaryotic initiation factors* (eukarüotsed initsiatsiooni faktorid)

ES – *expansion segments* (laiendus segmendid)

ETS – *external transcribed spacer* (välimine transkribeeritud RNA vahelüli)

ITS – *internal transcribed spacer* (sisemine transkribeeritud RNA vahelüli)

LSU – *large subunit* (suur subühik)

MCS – *multicloning site* (multikloneerimis sait)

PET – *peptide exit tunnel* (peptiidi väljumis tunnel)

Pol – *polymerase* (polümeraas)

PTC – *peptidyl transferase center* (peptidüültransferaasi keskus)

RBF – *ribosome biogenesis factor* (ribosoomi biogeneesi faktor)

RNP – *ribonucleoprotein* (RNA-ga seonduv valk)

SSU – *small subunit* (väike alaühik)

TBP – *TATA-box binding factor* (TATA-ga seonduv faktor)

UAF – *upstream activating factor* (ülesvoolu seonduv transkriptsiooni aktiveeriv faktor)

UTR – *untranslated region* (mittetransleeritav regioon)

## SISSEJUHATUS

Ribonukleiinhape ehk RNA osaleb väga paljudes erinevates rakulistes protsessides. Seetõttu esineb rakkudes palju erineva suuruse ja struktuuriga RNA-sid. Kõige tuntumad ja levinumad on mRNA, tRNA ja rRNA, mis on valgusünteesi läbiviimisel kesksel kohal. Käesolevas töös käsitletakse rRNA evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioone, millest enamuse tekkimise eest vastutavad snoRNA-d. Seetõttu on snoRNA-d tähtsaks osaks ribosoomide biogeneesis ja seetõttu nende olulisus esineb enne kui ribosoom sünteesi alustab.

snoRNA-d on väikesed tuumakese RNA-d, mille ülesandeks on ära tunda rRNA positsioon, mida modifitseerida. Selleks, et modifikatsioon toimuks peab snoRNA rRNA-ga komplementaarselt paarduma. rRNA-s olevatest modifikatsioonidest on enamuses riboosi 2'-O metüülatsioonid ja uridiinide isomeriseerimine pseudouridiinideks. Neid modifikatsioone suunavad vastavalt C/D snoRNA-d ja H/ACA snoRNA-d. Selliste modifikatsioonide poolt mõjutatud nukleotiidid asuvad tihtipeale ribosoomi funktsionaalsetes piirkondades, näiteks peptidüültransferaasi keskuses, peptiidi väljumistunnelis, tRNA sidumiskohtades, dekodeerimiskeskuses ja ribosoomi subühikute vahelisel alal. Osad funktsionaalsetes piirkondades asuvad modifikatsioonid on evolutsiooniliselt konserveerunud.

On näidatud, et rRNA modifikatsioonid on raku konkurentsivõime jaoks olulised. Arvatakse, et eriti olulisteks osutuvad evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonid. Varasemalt töögrupis koostatud kolme snoRNA deletsiooniga pagaripärmi tüvi ei sisalda ribosoomile tähtsaid modifikatsioone peptidüültransferaasi keskuses. On näidatud, et vastav tüvi on metsiktüüpi pärmiga võrreldes nii translatsiooni kui ka kasvu poolest aeglasem.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida katsesüsteem, mis võimaldaks täpsemalt keskenduda kindlate modifikatsioonide olulisuse väljaselgitamiseks pagaripärmi rRNA-s. Enamus snoRNA-d juhivad kahte modifikatsiooni, mis muudab deletsioonide kaudu modifikatsiooni mõju väljaselgitamise keeruliseks. Käesoleva töö käigus konstrueeriti pagaripärmi tüvi, millest on puudu ainult evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonid ( $\Psi$ 2826, Um2921, Gm2619, m<sup>5</sup>C2870), et hinnata vaid nende rRNA modifikatsioonide puudumise mõju raku temperatuuritundlikkusele.

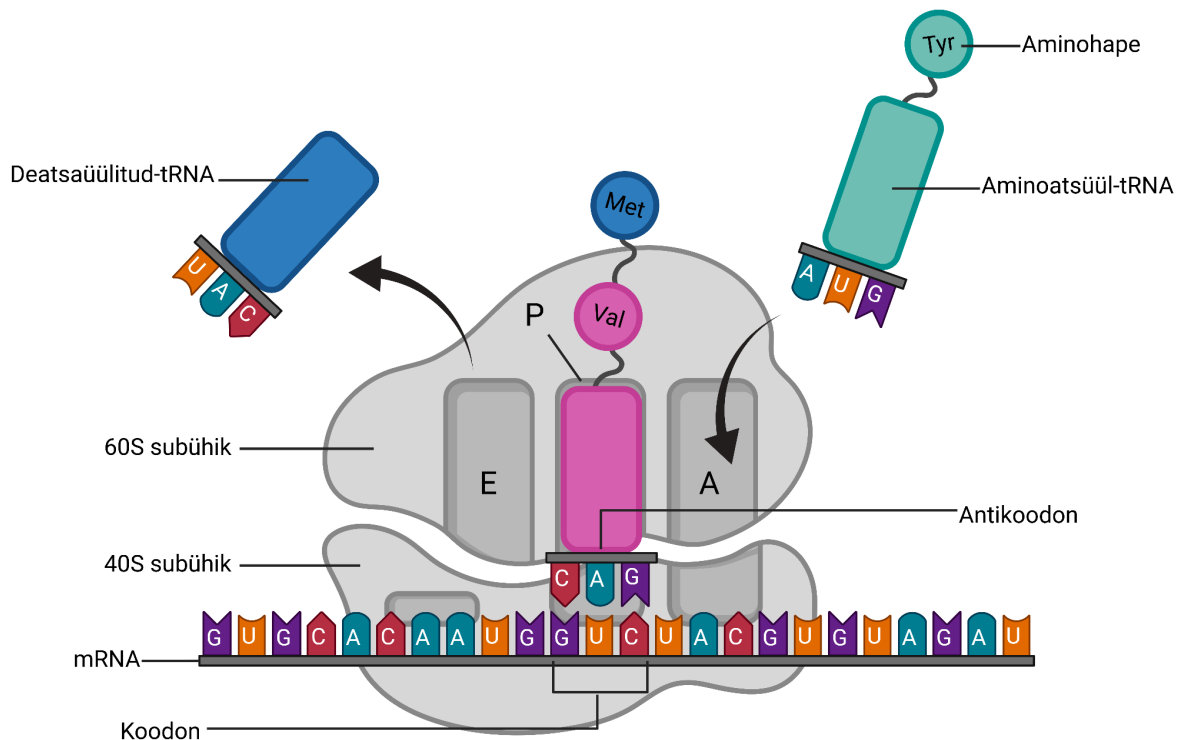
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Ribosoomi struktuur

Ribosoomid on makromolekulaarsed RNA- Valk kompleksid, mis vastutavad valgusünteesi toimumise eest kõigis organismides. Ribosoomide avastajaks on George Emil Palade, kes nägi neid esimesena elektronmikroskoobiga 1953. aastal. George Emil Palade, Albert Claude ja Christian de Duve said 1974. aastal ribosoomide avastamise eest Nobeli meditsiiniauhinna (nobelprize.org). 2009. aastal anti Nobeli keemiaauhind ribosoomi struktuuri ja mehhanismi kirjeldamise eest järgmistele teadlastele: Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz ja Ada E. Yonath (nobelprize.org). Nende teadlaste loodud ribosoomi struktuurid on tugisammas, millel põhineb tänapäeva arusaam valgusünteesist.

Kõik ribosoomid koosnevad kahest erineva suurusega subühikust (Ramakrishnan, 2002). Eukarüootsed ribosoomid ehk 80S ribosoomid koosnevad väikesest 40S (SSU) ja suurest 60S subühikust (LSU) (Joonis 1) (Ben-Shem *et al.*, 2011). Väike subühik koosneb 18S rRNA-st (*ribosomal RNA*) ja 33-st ribosomaalsest valgust, 60S alaühik koosneb 25S rRNA-st, 5,8S rRNA-st, 5S rRNA-st ja 49-st ribosomaalsest valgust (Ben-Shem *et al.*, 2011). Ribosoomi katalüütilist funktsiooni täidab rRNA ning selle funktsiooni täitmiseks on rRNA 3D struktuur väga oluline (Ramakrishnan, 2002). Ribosomaalsed valgud tagavad selle, et rRNA 3D struktuur oleks korrektne ja stabiilne (Lafontaine ja Tollervey, 2001).

Transleeriva 80S ribosoomi moodustamiseks peavad subühikud olema ühendatud ja see ühendus toimub läbi ribosomaalsete sildade (Tamm *et al.*, 2019). Eukarüootse ribosoomi subühikud on omavahel ühendatud 17 ribosomaalse silla kaudu (Spahn *et al.*, 2001). Enamus ribosomaalsetest sildadest on konserveerunud (Anger *et al.*, 2013). Subühikutevahelised kontaktid võivad olla rRNA-rRNA, rRNA-Valk või Valk-Valk interaktsioonid (Ben-Shem *et al.*, 2010). Lisaks ribosomaalsetele sildadele ühendavad eukarüootse ribosoomi subühikuid ka rRNA lisajärjestused ehk 60S laiendus segmendid (*expansion segments*, ES) (Ben-Shem *et al.*, 2011).



**Joonis 1. Ribosoomi skemaatiline struktuur translatsiooni ajal.** Joonisel on näha ribosoomi väikest 40S ja suurt 60S subühikut, mRNA ja tRNA koodon antikoodon paardumist, aminoatsüül-tRNA-d saabumas A ehk aminoatsüül keskusesse, peptidüül-tRNA-d P ehk peptidüül keskuses ja deatsüülitud-tRNA-d lahkumas E ehk deatsüülitud-tRNA väljumis saidist ([Biorender.com](http://Biorender.com)).

40S alaühik sisaldab kolme funktsionaalset piirkonda – mRNA sidumiskanal, dekodeerimiskeskus ning translatsiooni initsiatsiooni faktorite sidumiskohad. Esimeseks on mRNA sidumiskanal, mis mahutab endasse transleeritava mRNA (*messenger RNA*) ning mille kaudu ribosoom mRNA peal edasi liigub (Wang *et al.*, 2022). mRNA sidumiskoht sisaldab ka elemente, mille järgi ribosoom leiab õige startkoodoni, millelt valgusünteesi alustada (Wang *et al.*, 2022). 40S subühik sisaldab ka dekodeerivat keskust, mille ülesandeks on kontrollida, kas translatsiooni käigus saabuva aminoatsüül-tRNA (*transfer RNA*) antikoodon on komplementaarne mRNA koodoniga, mis on oluline täpseks valgusünteesiks (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Seda kontrolli teostab eukarüootides 18S rRNA (Wang *et al.*, 2022). 40S alaühik on ka seondumiskohaks mitmetele eukarüootsetele initsiatsiooni faktoritele (eIFs), mis aitavad mRNA-ga seonduda, õiget startkoodonit leida ja 60S subühikul

ühineda, et moodustada transleeriv 80S ribosoom, mis sünteesib kahe subühiku koostöös mRNA info põhjal valgu (Majumdar *et al.*, 2003).

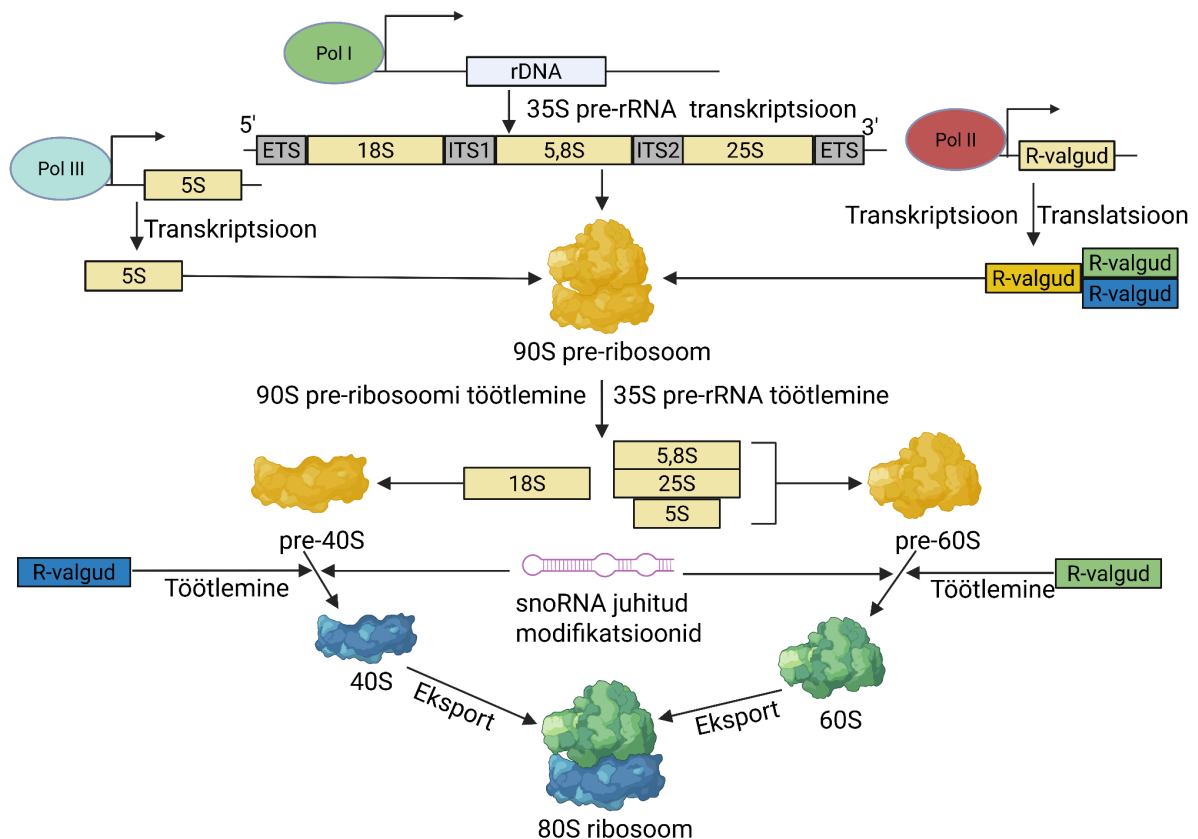
60S subühik sisaldab kolme tRNA sidumissaiti, A ehk aminoatsüül keskus, P ehk peptidüül keskus ja E ehk deatsüülitud-tRNA väljumiskeskus (Joonis 1) (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Saabuvad aminohappega laetud aminoatsüül-tRNA-d seonduvad aminoatsüül (A) keskusesse, peptidüül keskuses (P) paiknev tRNA hoiab sünteesitavat aminohappe ahelat ning E-saidi kaudu lahkuvad deatsüülitud-tRNA-d ribosoomist (Joonis 1) (Lafontaine ja Tollervey, 2001). 60S subühiku P-saidis asub peptidüültransferaasi keskus ehk PTC, milles toimub peptiidsideme süntees peptidüül-tRNA ja aminoatsüül-tRNA vahel (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Seda reaktsiooni katalüüsib eukarüootides 25S rRNA (Lafontaine ja Tollervey, 2001). 60S alaühik sisaldab ka peptiidi väljumistunnelit, mille kaudu väljuvad sünteesitud polüpeptiidid ribosoomist ning kus hakkab toimuma valgu esmane voltumine (Joiret *et al.*, 2022).

## 1.2 Ribosoomi biogenees

Ribosoomi biogenees on keeruline protsess, kus kõik algab sellest, et kõik komponendid peavad olema sünteesitud õiges koguses ja kõik ribosoomi komponendid peavad olema õigesti kokku pandud. Ribosoomi biogenees algab tuumakeses, kui RNA polümeraas I alustab transkriptsiooni (Cheng *et al.*, 2020). Transkribeeritakse ribosomaalset DNA-d (rDNA) ehk DNA-d, mis kodeerib ribosomaalset RNA-d (Cheng *et al.*, 2020). Selleks, et RNA polümeraas I seonduks rDNA-ga on vaja, et transkriptsiooni faktorid UAF (*upstream activating factor*), TBP (*TATA-box binding factor*) ja CF (*core factor*) seonduksid promootor elemendiga (Thomson *et al.*, 2013). Ribosoomi biogeneesis osalevad ka RNA polümeraas III, mis transkribeerib 5S rRNA-d ja RNA polümeraas II, mis transkribeerib ribosomaalsete valkude mRNA-sid (Pelletier *et al.*, 2018).

RNA polümeraas I poolt sünteesitud RNA-d nimetatakse 35S pre-rRNA-ks, mis sisaldab tulevaseid 18S, 25S ja 5,8S rRNA-sid ühes primaarses transkriptis (Joonis 2) (Cheng *et al.*, 2020). Primaarses transkriptis on rRNA-d üksteisest eraldatud ITS1 (*internal transcribed spacer*) ja ITS2 poolt ning ümbritsetud otstes asuvate 5'-ETS (*external transcribed spacer*) ja 3'-ETS järjestuste poolt (Joonis 2) (Cheng *et al.*, 2020). 35S pre-rRNA-le kinnituvad mitmed ribosoomi biogeneesi faktorid (RBF), U3 snoRNA, Rrp5 (*ribosomal RNA processing 5*), 5S

rRNA ja ribosomaalsed valgud, mille käigus moodustub stabiilne 90S pre-ribosoom (Cheng *et al.*, 2020). Järgmises etapis lõikavad endonukleasid 5'-ETS-is asuvat A<sub>1</sub> järjestust ja ITS1-s asuvat A<sub>2</sub> järjestust, eraldades tulevased 18S rRNA ja 5,8S/25S rRNA moodustades nn pre-40S ja pre-60S partiklid (Cheng *et al.*, 2020). Pre-40S ja pre-60S subühikutele seonduvad snoRNA-d ning vastavad nukleotiidid modifitseeritakse (Pelletier *et al.*, 2018). Valmis kompleksid eksporditakse tuumast välja tsütoplasmasse (Pelletier *et al.*, 2018).



**Joonis 2. Lihtsustatud skemaatiline kujutus ribosoomi biogeneesist.** Joonisel on näha 35S rRNA transkriptsiooni polümeraas I (Pol I) poolt, 5S rRNA transkriptsiooni polümeraas III (Pol III) poolt ning R-valkude mRNA transkriptsiooni polümeraas II (Pol II) poolt. Polümeraas I poolt transkribeeritud 35S pre-rRNA-d töödeldakse ning selle protsessimise käigus vabanevad 18S, 5,8S ja 25S rRNA-d primaarsest transkriptist eraldiseisvate rRNA-na. Koos 5S rRNA ja R-valkudega moodustatakse pre-40S ja pre-60S subühikud, mida töödeldakse ning modifitseeritakse snoRNA-de poolt ning valmivad funktsionaalsed 40S ja 60S subühikud. Subühikud eksporditakse tsütoplasmasse ning moodustub transleeriv 80S ribosoomi ([Biorender.com](https://www.biorender.com)).

Ribosoomi PTC on tähtis funktsionaalne piirkond ja funktsionaalse PTC-ga ribosoomid on raku eluks vajalikud (Mitterer *et al.*, 2024). Oma tähtsuse tõttu on PTC eukarüootides tugevalt konserveerunud (Cruz *et al.*, 2024). Funktsionaalse PTC korrektseks voltumiseks on vaja DEAD-*box* (Asp-Glu-Ala-Asp) ATPaase (adenosiintrifosfaas) (Mitterer *et al.*, 2024). On näidatud, et DEAD-*box* ATPaasid osalevad enamasti RNA-ga seotud protsessides (Cruz *et al.*, 2024). Pagaripärmis on ensüümiks, mis vahendab PTC struktuuri korrektset voltumist Dbp10 (*dead box protein 10*), mis on oma olemuselt helikaas (Mitterer *et al.*, 2024). Dbp10 DEAD-*box* ensüüm muudab 25S rRNA konformatsiooni, täpsemalt heeliksiite H90 ja H92 konformatsiooni, kasutades selleks ATP-d (Cruz *et al.*, 2024).

### 1.3 Translatsioon

Translatsiooni üheks esimeseks etapiks on 43S pre-initsiatsiooni kompleksi moodustumine 40S alaühikust ja translatsiooni initsiatsioonifaktoritest ning mRNA-ga seondumine (Wang *et al.*, 2022). Translatsiooni alustamiseks on 43S kompleksil vaja leida start koodon, mis asub *cap*-iga mRNA 5'-UTR-is (*untranslated region*) (Wang *et al.*, 2022). 43S kompleks sisaldab initsiaator-tRNA-d ning see paigutatakse ribosoomi P-saiti (Wang *et al.*, 2022). Järgmises etapis seondub 43S pre-initsiatsiooni kompleksiga 60S subühik ning moodustub 80S ribosoom (Wang *et al.*, 2022). Translatsiooni elongatsioon algab kui ribosoomi A-saiti siseneb vastavat antikoodonit sisaldav aminoatsüül-tRNA, mis seondub komplementaarselt mRNA-le ning toimub esimese peptiidsideme süntees (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Järgmise mRNA koodoniga komplementaarne aminoatsüül-tRNA seondub A-saiti ja P-saiti tRNA küljes olev aminohape kantakse katalüüsi käigus A-saidis oleva tRNA aminohappe külge (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Katalüüsi teostab 60S subühikus olev PTC (Joonis 1) (Lafontaine ja Tollervey, 2001).

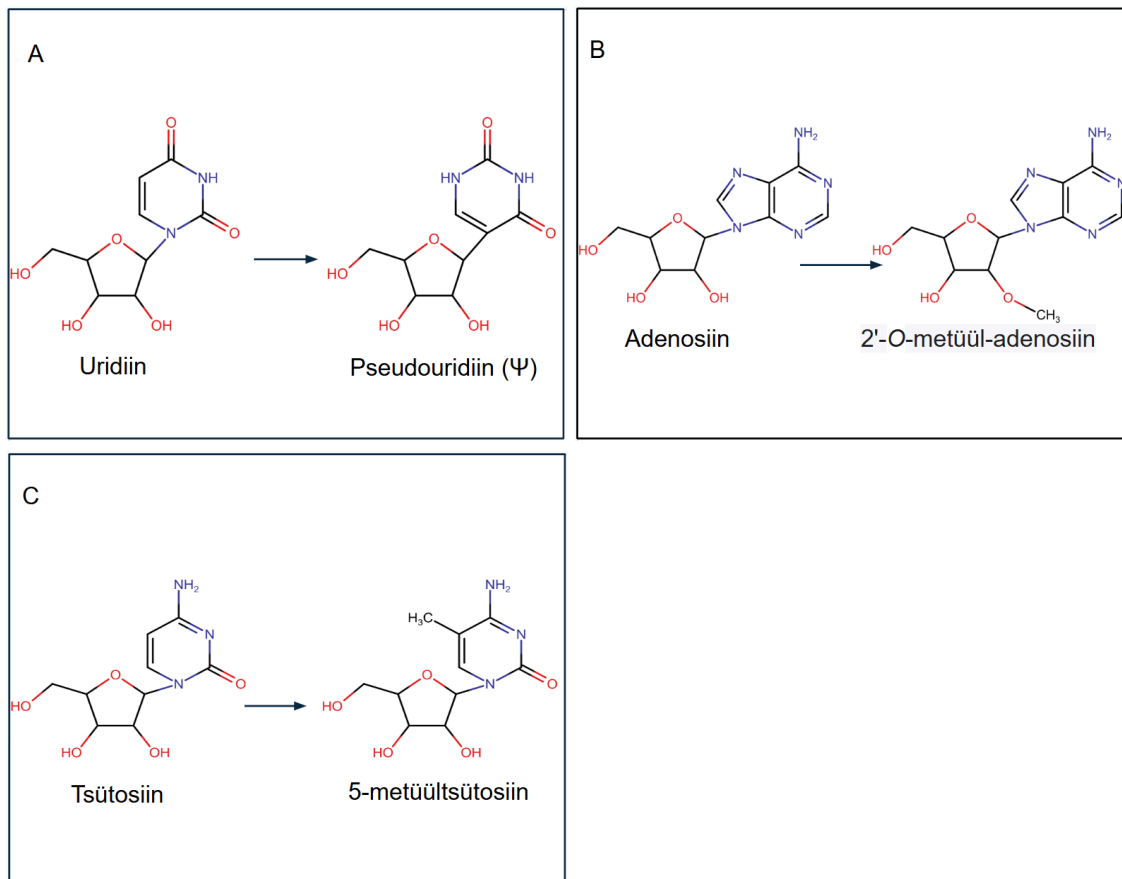
PTC-s asub A-sidumisaas (*A-loop*), mille töö on A ehk aminoatsüül saidis asuva aminoatsüül-tRNA CCA (tsütosiin-tsütosiin-adeniin) saba õigesti paigutada, tagades CCA saba küljes oleva aminohappe õige orientatsiooni PTC-s (Cruz *et al.*, 2024). Peale peptiidi ülekannet seondub ribosoomiga GTP-st (guanosiintrifosfaat) sõltuv EF-2 (*elongation factor 2*), mis liigutab mRNA-d kolme nukleotiidi ehk ühte aminohapet kodeeriva koodoni võrra edasi (Justice *et al.*, 1998). Sellega kaasneb ka tRNA-de liikumine, P ehk peptidüül keskusest liigub aminohappe üle kandnud deatsüülitud-tRNA E ehk deatsüülitud-tRNA väljumis saiti ja

A ehk aminoatsüül keskusest liigub peptiidi kinni hoidev peptidüül-tRNA P-saiti, seda tRNA-de liikumist kutsutakse translokatsiooniks (Justice *et al.*, 1998). E-saidis olev deatsüülitud-tRNA lahkub ribosoomist, samal ajal P-saidis olev peptidüül-tRNA hoiab sünteesitavat polüpeptiidi ja A-saiti liitub uus mRNA koodoniga komplementaarset antikoodonit sisaldav aminoatsüül-tRNA (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Eukarüootides transpordib õige antikoodoniga aminoatsüül-tRNA ribosoomi A-saiti EF1- $\alpha$  (*elongation factor 1- $\alpha$* ) (Lafontaine ja Tollervey, 2001).

Translatsiooni protsessi etappe korratakse, kuni mRNA stoppkoodon satub A-saiti ja 80S ribosoomile kinnituvad translatsiooni terminatsioonifaktorid, mille järgselt ribosoom ja viimane tRNA lasevad mRNA-st ja sünteesitud polüpeptiidist lahti (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Tekkinud polüpeptiid väljub ribosoomist peptiidi väljumistunneli (*peptide exit tunnel*, PET) kaudu (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Eukarüootne ribosoom sünteesib valke keskmiselt 5,6 aminohappejääki sekundis (Joiret *et al.*, 2022).

#### **1.4 rRNA modifikatsioonid PTC-s**

Pagaripärmi ribosoomi PTC-s eksisteerivad kolme tüüpi modifikatsioonid: riboosi 2'-O-metülatsioonid, uridiini isomeriseerimise teel tekkinud pseudouridiinid ( $\Psi$ ) ja nukleiinhappe lämmastikaluse metülatsioonid (Joonis 3) (Sharma ja Entian, 2022). On näidatud, et sellised modifikatsioonid stabiliseerivad kõrgema astmelisi rRNA struktuure, optimeerivad ribosoomi täpsust ja kiirust ning aitavad stressi vastusega (Decatur ja Fournier, 2002).

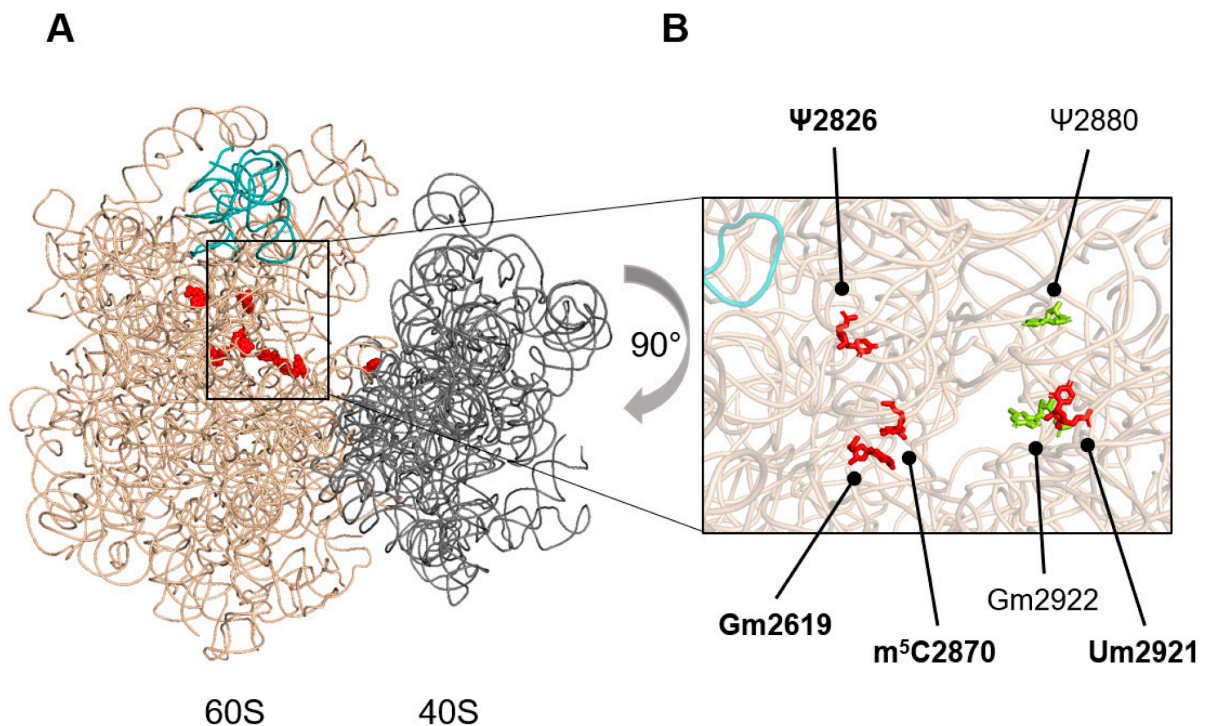


**Joonis 3. Näited rRNA modifikatsioonidest.** Paneelil A on näha uridiini isomeriseerimist pseudouridiiniiks. Paneelil B on näha riboosi 2'-O-metüleerimist adenosiini näitel. Paneelil C on näha lämmasikaluse 5'-C metüleerimist tsütosiini näitel ([rcsb.org](https://www.rcsb.org)).

Eukarüootides esineb rRNA-de modifitseerimiseks kaks erinevat mehhanismi. Esimene mehhanism, mis eksisteerib ka bakteritel, kasutab modifikatsioonide teostamiseks ensüüme, mis tunnevad ise modifitseeritava nukleotiidi ära ja seejärel teostavad modifikatsiooni (Ontiveros *et al.*, 2019). Teine mehhanism põhineb snoRNA-del, kus snoRNA sisaldab komplementaarset järjestust modifitseeritava rRNA-ga ja snoRNA-ga kompleksis olev valk teostab modifikatsiooni (Decatur ja Fournier, 2002). snoRNA juhitud modifikatsioonid esinevad ainult eukarüootides ja arhedes (Decatur ja Fournier, 2002).

*S. cerevisiae* ribosoomides on leitud üle 100 modifitseeritud nukleotiidi, millest väike osa on evolutsiooniliselt konserveerunud (Decatur ja Fournier, 2002). 60% modifitseeritud nukleotiididest asuvad ribosoomi funktsionaalsetes piirkondades nagu näiteks PTC, PET, ribosoomide vahelisel alal ja dekodeerimiskeskuses (Decatur ja Fournier, 2002). Siiani leitud üheksast konserveerunud modifikatsioonist neli asuvad pagaripärmi ribosoomi PTC-s

(Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Nendest neljast modifikatsioonist kolm on snoRNA-st sõltuvad ja üks on snoRNA-st sõltumatu. snR34 juhib positsiooni  $\Psi$ 2826 isomeriseerimist, snR52 juhib positsiooni Um2921 metüleerimist, snR67 juhib positsiooni Gm2619 metüleerimist ning metüültransferaas Nop2 (*nucleolar protein 2*) metüleerib positsiooni m<sup>5</sup>C2870 (Joonis 4) (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Lisaks nendele konserveerunud PTC modifikatsioonidele vastutavad snR34, snR52 ja snR67 vastavalt positsioonide  $\Psi$ 2880 isomeriseerimise, Am420 metüleerimise ja Um2724 metüleerimise eest (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Lisaks metüleerib metüültransferaas Spb1 (*suppressor of PaB1 mutant*) positsiooni Gm2922 (Bonnerot *et al.*, 2003). Juhul kui snR52 on deleteeritud metüleerib Spb1 ka positsiooni Um2921 (Bonnerot *et al.*, 2003).



**Joonis 4. Pagaripärmi 80S ribosoomi PTC-s paiknevad konserveerunud modifikatsioonid.** Paneelil A on näha 80S ribosoomi 60S ja 40S subühikute rRNA-sid, mis on vastavalt kujutatud beeži ja hallina. Paneelil B on näha modifitseeritavate nukleotiidide paigutust ribosoomi PTC-s. Joonisel on punaselt märgitud evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonid, roheliselt on märgitud mittekonserveerunud modifikatsioonid ning siniselt on märgitud 5S rRNA (Leppik *et al.*, 2024).

Nimetatud üksikute snoRNA-de deleteerimine ei mõjuta raku kasvu märkimisväärselt, kuid mitme snoRNA deleteerimine avaldab kumulatiivselt negatiivset mõju raku kasvule (Leppik *et al.*, 2024). On teada, et katalüüsi teostavate snoRNP ensüümide Cbf5 ja Nop1 deletsioon mõjub rakule letaalselt (Schimmang *et al.*, 1989). Lisaks on näidatud, et iseseisvalt metüleerivate ensüümide Nop2 ja Spb1 deleteerimine on rakule letaalne, mis viitab sellele, et modifikatsioonid on raku konkurentsivõime jaoks olulised või ensüümid Nop2 ja Spb1 täidavad lisaks modifitseerimisele veel mingit rolli (Kressler *et al.*, 1999; de Beus *et al.*, 1994). Katalüütiliselt inaktiivsed versioonid Nop2-st (C424A/C478A) ja Spb1-st (D52A/E679K) on elujõulised (Kressler *et al.*, 1999; de Beus *et al.*, 1994). Varasemalt on näidatud, et snR34, snR52 ja snR67 deleteerimine ning ensüümide Nop2 ja Spb1 katalüütiliselt inaktiivseks muutmine vähendab tüve TYSC906 konkurentsivõimet (Leppik *et al.*, 2024) *3ΔsnR*, *nop2\** (C424A/C478A), *spb1\** (D52A/E679K) pagaripärmi tüve generatsiooniaeg on kolm korda pikem kui metsiktüüpi pärmil, suurenedes 91 minuti pealt 272 minutini (Leppik *et al.*, 2024). Lisaks leiti, et TYSC906 tüvel on vähem transleerivaid ribosome ja polüosome ning seetõttu on globaalne translatsioon vähenenud 2,6 korda võrreldes metsiktüüpi pärmiga (Leppik *et al.*, 2024). TYSC906 tüvel esines ka suurem külmatundlikkus temperatuuridel 20°C ja 15°C (Leppik *et al.*, 2024).

## 1.5 snoRNA-d

Väikesed tuuma RNA-d (*small nuclear RNA*, snRNA) on grupp mittekodeerivaid RNA-sid, mis asuvad karüoplasmas ja peamiselt osalevad rRNA molekulide modifitseerimise protsessis (Matera *et al.*, 2007). Üks nende alamrühm on väikesed tuumakese RNA-d (*small nucleolar RNA*, snoRNA), mis asuvad ainult tuumakeses ja peamiselt osalevad rRNA-sid modifitseerivas protsessis (Matera *et al.*, 2007). snoRNA-sid on kahte liiki *C/D box* ja *H/ACA box* snoRNA-d, mõlemad snoRNA-d moodustavad komplekse valkudega moodustades funktsionaalse ribonukleoproteiini (RNP) (Matera *et al.*, 2007). snoRNP-d moodustavatel valkudel on lisaks struktuursele ja katalüütilisele funktsioonile, omadus kaitsta snoRNA-d eksonukleaaside eest (Bratkovič *et al.*, 2020).

On näidatud, et lisaks oma funktsioonile suunata modifikatsioone, aitavad mõlemat tüüpi snoRNA-d pre-rRNA-l oma lõpliku struktuuri saavutada käitudes nagu pre-rRNA tšaperonid (Lykke-Andersen *et al.*, 2018). Selleks paarduvad snoRNA-d pre-rRNA-ga ning muudavad

pre-rRNA struktuuri, avades pre-rRNA-s olevaid järjestusi nukleaasidele (Bachellerie *et al.*, 2002). Selline paardumine võimaldab ka ribosomaalsetel valkudel ja pre-rRNA-l korrektseid komplekse moodustada, mistõttu on snoRNA-del kriitiline roll ribosoomi biogeneesis (Bachellerie *et al.*, 2002).

C/D *box* snoRNP-d suunavad pre-rRNA kohtspetsiifilist riboosi 2'-O-metüleerimist (Lykke-Andersen *et al.*, 2018). C/D snoRNA-d sisaldavad kahes korduses konserveerunud 5'-RUGAUGA-3' (R on puriin) järjestust, mida kutsutakse vastavalt C ja C' ning kahes korduses konserveerunud 5'-CUGA-3' järjestust, nimetatud vastavalt D ja D', moodustades juuksenõelastruktuuri (Joonis 5A) (Maden ja Hughes, 1997; Lykke-Andersen *et al.*, 2018). D ja D' järjestuste lähedal asuvad antisenss elemendid (ASE), mis on modifitseeritava rRNA-ga komplementaarsed, see võimaldab suunata modifikatsiooni kohtspetsiifiliselt (Bratkovič *et al.*, 2020). C/D RNP kompleks pärmsis koosneb C/D *box* snoRNA-st, mis on seotud Nop1 (*nucleolar protein 1*), Nop56 (*nucleolar protein 56*), Nop58 (*nucleolar protein 58*) ja Snu13 (*small nuclear ribonucleoprotein associated 13*) valkudega (Joonis 5C) (Huang *et al.*, 2022). Nop1 käitub metüültransferaasina, katalüüsides metüülrühma ülekannet S-adenosüül-L-metioniini ja sihtmärk rRNA 2'-hüdrosüül rühma vahel, teostades nii kohtspetsiifilise metüleerimise (Bratkovič *et al.*, 2020).

H/ACA *box* snoRNA-d suunavad uridiinide isomeriseerimist pseudouridiinideks ( $\psi$ ). H/ACA snoRNA-d koosnevad kahest juuksenõelastruktuurist, mille vahel on 5'-ANANNA-3' (N on mis tahes nukleotiid) ehk H motiiv ja enne snoRNA 3' otsa paikneb 5'-ANANNN-3' ehk ACA järjestus (Joonis 5B) (Bratkovič *et al.*, 2020). H/ACA RNP kompleks koosneb H/ACA *box* snoRNA-st, Cbf5 (*centromere binding factor-5*), Nop10 (*nucleolar protein 10*), Gar1 (*H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1*) ning Nhp2 (*non-histone protein 2*) valkudest (Joonis 5D) (Huang *et al.*, 2022). Cbf5 töötab isomeraasina, muutes sihtmärk uridiini pseudouridiiniks (Bratkovič *et al.*, 2020). H/ACA *box* snoRNA-de ASE järjestused asuvad nii 5' kui ka 3' juuksenõela struktuurides, selline paardumine on vajalik kohtspetsiifiliseks isomerisatsiooniks (Joonis 5) (Bratkovič *et al.*, 2020).



## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Varasemalt on näidatud, et snR34, snR52 ja snR67 deleteerimine ning seetõttu ka nende kolme snoRNA poolt juhitud modifikatsioonide puudumine pärmis ribosoomi PTC-s avaldab tugevalt negatiivset mõju pagaripärmi fenotübile. Kuid enamus snoRNA-de deleteerimisega kaovad kaks modifikatsiooni. Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida katsesüsteem, mis võimaldaks täpsemalt keskenduda kindlate modifikatsioonide olulisuse väljaselgitamiseks rRNA-s.

Magistritöö eesmärkideks oli:

1. Konstrueerida pagaripärmi tüvi, kus kolm snoRNA-d (snR34, snR52, snR67) kaotavad oma võime suunata evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioone (Ψ2826, Um2921, Gm2619) ribosoomi PTC-s.
2. Hinnata konstrueeritud tüve külmatundlikkust.

### 2.2 Metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud plasmiidid, praimerid, söötmed ja tüved

Kõik snR geene kodeerivad järjestused viidi pRS413 plasmidi. pRS413 valiti, sest see plasmiid sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni (ampR) ja *HIS3* markergeeni, mis võimaldavad rakke selektiivsetel söötmetel kasvatada (Sikorski ja Hieter, 1989). Plasmidi paljundamiseks kasutati *E.coli* DH5α tüve (Tabel 3). Kasutatud praimerid ja nende järjestused on välja toodud Tabelis 1. Söötmete nimekiri ja koostised on välja toodud Tabelis 2. Kasutatud tüved, nende genotüübid ja puuduvad modifikatsioonid on välja toodud Tabelis 3. Kõik kasutatud praimerid on tellitud firmalt *Microsynth*.

**Tabel 1. Kloneerimisel ja suunatud mutageneesil kasutatud praimerid ja nende järjestused.**

<b>Praimer</b>	<b>Järjestus</b>	<b>Kasutusala</b>
snR34_5_XhoI	5'-CGT CAA CTC GAG GTA CGA GAT ATG C-3'	Kloneerimine
snR34_3_EcoRV	5'-CAC GGA TAT CGG TTG TGT TGC ACG ACA ACG TAC GTA C-3'	Kloneerimine
snR52_5_SpeI	5'-CAC AAC TAG TCT CTT CAT CTT TGA AAA GAT AAT GTA TGA TTA TGC-3'	Kloneerimine
snR52_3_SacI	5'-CTT CGA GCT CGA AGT TTG CGT TCC ATA CTG TCA GAG GT-3'	Kloneerimine
snR67_5_EcoRI	5'-CAA CGA ATT CGC GCT TCA ACC TGT ACG TGG ATG GTA AC-3'	Kloneerimine
snR67_3_BamHI	5'-CAA AGG ATC CGG TTC GAT TCC GGG CTT GCG CAG C-3'	Kloneerimine
snR34_Psi2826_mut_DIR	5'-CAA AAA TTT ATT TTT TAC ACG GAA ACG AAC GGT GTG TTG ACT GAA CCT-3'	Suunatud mutagenees
snR34_Psi2826_mut_REV	5'-CAG GTT CAG TCA ACA CAC CGT TCG TTT CCG TGT AAA AAA TAA ATT TTT G-3'	Suunatud mutagenees
snR67_Gm2619_mut_DIR	5'-CAT GAT GAC TAA GTT GTG CGG GGT AGC GGA TCT TTG AAA TG-3'	Suunatud mutagenees
snR67_Gm2619_mut_REV	5'-CAT TTC AAA GAT CCG CTA CCC CGC ACA ACT TAG TCA TCA TG-3'	Suunatud mutagenees
snR52_Um2921_mut_DIR	5'-GAT GAA TGA CAT TAG CCA CTT GTT AGT CTG ATA CAA AAT CGA AAG-3'	Suunatud mutagenees

snR52_Um2921_mut_REV	5'-CTT TCG ATT TTG TAT CAG ACT AAC AAG TGG CTA ATG TCA TTC ATC-3'	Suunatud mutagenees
pUC_DIR	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Koloonia kontroll
pUC_REV	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	Koloonia kontroll
Sc18S470	5'-TGT CAC TAC CTC CCT GAA TTA GG-3'	Praimer ekstensioon
Sc18S845	5'-CTA GAA ACC AAC AAA ATA GAA CC-3'	Praimer ekstensioon
Sc25S2964	FAM 5'-CGA CGG TCT AAA CCC AGC TCA C-3'	Praimer ekstensioon
Sc25S2774	FAM 5'-GGG ACT AAA GGA TCG ATA GGC C-3'	Praimer ekstensioon
Sc25S2654	FAM 5'-GGA CAT CTG CGT TAT CGT TTA ACA GAT GTG-3'	Praimer ekstensioon
Sc25S2930	FAM 5'-TGG GTG AAC AAT CCA ACG CTT ACC-3'	Praimer ekstensioon
Sc25S2863	FAM 5'-CAA AAA GCA ATG TCG CTA TGA ACG CTT GAC-3'	Praimer ekstensioon

**Tabel 2. Kasutatud söötmed ja nende koostised.**

Sööde	Koostis
YPD ( <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> ) vedelsööde	1% <i>Bacto</i> <sup>TM</sup> pärmiekstrakt, 2% <i>Bacto</i> <sup>TM</sup> peptoon, 2% glükoos
YPD agarsööde	1% <i>Bacto</i> <sup>TM</sup> pärmiekstrakt, 2% <i>Bacto</i> <sup>TM</sup> peptoon, 2% glükoos, 2% agar
SC ( <i>Synthetic Complete</i> ) -HIS vedelsööde	2% Glükoos, 0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudub histidiin

SC -HIS agarsööde	2% Glükoos, 0,67% pärimi lämmastikaluste segu, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudub histidiin, 2% agar
LB ( <i>lysogeny broth</i> ) vedelsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl
LB ( <i>lysogeny broth</i> ) agarsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar

**Tabel 3. Kasutatud tüved, nende genotüüp, puuduvad modifikatsioonid ja valmistaja.**

Tüvi	Genotüüp	Puuduvad modifikatsioonid	Valmistaja
DH5α ( <i>E. coli</i> )	<i>recA1 endA1 lacZΔM15</i>	-	Douglas Hanahan
TYSC309 (WT) ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 arg4 lys1</i>	-	Labori kolleksioon
TYSC898	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 arg4 lys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1::hphMX6 [pRS314-spb1(D52A, E679K)]</i>	Gm2619, Um2724, Ψ2826, Ψ2880, Um2921, Gm2922, Am420	Labori kolleksioon
TYSC903	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 arg4 lys1 Δnop2::natMX6 Δspb1::hphMX6 [pRS314-spb1(D52A, E679K)] [pRS315-nop2(C424A, C478A)]</i>	Gm2922, m <sup>5</sup> C2870	Labori kolleksioon
TYSC906	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 arg4 lys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67</i>	Gm2619, Um2724, Ψ2826, Ψ2880, Um2921, Gm2922, Am420, m <sup>5</sup> C2870	Labori kolleksioon

	$\Delta nop2::natMX6$ $\Delta spb1::hphMX6$ <p>[pRS314-spb1(D52A, E679K)]</p> <p>[pRS315-nop2(C424A, C478A)]</p>		
--	--	--	--

### 2.2.2 Genoomse DNA eraldamine liitumatasetaadi meetodil

Pagaripärmi rakud suspendeeriti 100 µl lüüsi puhvril (200 mM LiOAc, 1% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)) ja rakud lüüsi inkubeerides 10 minutit termoblokis temperatuuril 70°C (*Labnet AccuBlock<sup>TM</sup>*). Järgmisena lisati 300 µl 96% etanooli ja lahust segati vorteksil (*Biosan Combi-Spin<sup>TM</sup>*). Rakusade koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel (*Heraeus fresco*) 15000 g, 2 minutit ning supernatant eemaldati. Rakusadet pesti 0,5 ml 70% etanooliga ja rakusade koguti uuesti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel 15000 g, 2 minutit. Etanool eemaldati ning rakusadet kuivatati termoblokis 4 minutit temperatuuril 37°C. Rakusade resuspendeeriti 100 µl-s MQ vees ning rakusade eraldati genoomsest DNA-st toatemperatuuril tsentrifuugimise teel 1 minut, 15000 g. (Lõoke *et al.*, 2011)

### 2.2.3 snR geenide amplifitseerimine genoomselt DNA-lt PCR meetodil

Reaktsioon viidi läbi lõppruumalal 50 µl, mis sisaldas 0,5 µM *forward* ja *reverse* praimereid (Tabel 1), 25 µl 2x *Phusion<sup>TM</sup> Plus Green PCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*) puhvri, 10 ng DNA-d ja MQ vett.

DNA amplifitseerimiseks kasutatud PCR programm:

1. Eeldenaturatsioon: 98°C, 30 s
2. Denaturatsioon: 98°C, 10 s
3. Praimerite seondumine: 57°C, 20 s
4. Süntees: 72°C, 30 s
5. Järelsüntees 72°C, 5 min

Tsükleid 2-4 korrati kokku 30 korda. PCR reaktsioonil sünteesitud DNA fragmentide suuruse kontrollimiseks ja lahutamiseks kasutati 1% agarosgeelelektroforeesi 1x TBE (90 mM tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA, pH 8,3) puhvris. DNA fragmendid visualiseeriti Et-Br ja UV valgusega ning suurus markerina kasutati 1 kb *Thermo Fisher Scientific GeneRuler DNA ladder* markerit. Õiges suuruses DNA fragmendid lõigati agarosgeelist välja ja puhastati agarosgeelist DNA *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit*-ga.

#### **2.2.4 DNA puhastamine *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit*-ga**

Agarosgeelist välja lõigatud õige suurusega tükile lisati 500 µl FADF (*Favorgen*) puhvrit, proove segati ning inkubeeriti termoblokil (*Labnet AccuBlock™*) temperatuuril 55°C, kuni geel oli lahustunud. Seejärel lisati 100 µl  $\geq 99,5\%$  isopropanooli ja proovid pipeteeriti FADF kolonnile. DNA seondumine FADF (*Favorgen*) kolonniga toimus toatemperatuuril tsentrifuugides lauatsentrifuugis (*Heraeus fresco*) 30 sekundit, 11000 g ning läbijooks eemaldati. Kolonni pesti 750 µl *Wash (Favorgen)* puhvriga ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 sekundit, 11000 g, seejärel läbijooks eemaldati. Kolonni kuivatamiseks tsentrifuugiti kolonni toatemperatuuril 3 minutit, 18000 g. Kolonn tõsteti uude puhtasse 1,5 ml katsutisse (*Eppendorf*) ning *Wash* puhvri jääkide eemaldamiseks kuivatati kolonni lahtise korgiga termoblokil 5 minutit temperatuuril 37°C. DNA elueerimiseks lisati kolonnile 40 µl elueerimis puhvrit (*Favorgen*) ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 1 minut, 18000 g. Elueeritud DNA kontsentratsioon määrati  $A_{260}$  neeldumise järgi *NanoDrop*-iga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific*).

#### **2.2.5 Restriktaasi töötlus**

DNA lõigu viimiseks plasmidi töödeldi nii plasmidi kui ka DNA fragmenti restriktaasidega. Restriktaasi töötluse jaoks võeti 1 µg plasmidi ja 3 µg PCR amplifitseeritud DNA fragmenti. Restriktaasi lõikus toimus lõppruumalas 50 µl. Kasutatud restriktaasid ja puhvrid pärinevad firmalt *Thermo Fisher Scientific* ning reaktsioonide jaoks vajalikud puhvrid ja tingimused leiti *Thermo Fisher Scientific Double Digest Calculator*-it kasutades (Tabel 4).

**Tabel 4. snR geeni järjestuste restriktiooni reaktsioonil kasutatud ensüümid ja puhvrid ning nende kontsentratsioonid.**

DNA	Ensüüm 1	Ensüüm 2	Puhver
snR34 ja pRS413	10 U XhoI	10 U EcoRV	1x R
snR52 ja pRS413	10 U SpeI (BcuI)	10 U SacI	1x Tango
snR67 ja pRS413	10 U EcoRI	20 U BamHI	2x Tango

Reaktsioonide toimumiseks inkubeeriti proove 1,5 tundi termoblokil (*Labnet AccuBlock<sup>TM</sup>*) temperatuuril 37°C. Seejärel lisati avatava plasmidi reaktsioonile 1 U aluselist fosfataasi (*Thermo Fisher Scientific, FastAP*) ning proove inkubeeriti 30 minuti temperatuuril 37°C. Restriktaasidega töödeldud DNA lahutamiseks kasutati 0,8% agarosgeelelektroforeesi 1xTBE (90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA pH 8,3) puhvris. DNA fragmendid visualiseeriti Et-Br ja UV valgusega ning suurus markerina kasutati 1 kb *Thermo Fisher Scientific GeneRuler DNA ladder* markerit.

### 2.2.6 Ligeerimine

Selleks, et snoRNA fragmenti viia restriktasidega avatud pRS413 plasmidi, kasutati ligeerimist. Reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl ning sisaldas 50 ng pRS413 plasmidi, 25 ng DNA fragmenti, 1 µl 25 mM HCC (heksakoobaltkloriid), 2 µl 10x T4 ligaasi puhvrit (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 100 mM DTT) (*Thermo Fisher Scientific*) ja 5 U T4 ligaasi (*Thermo Fisher Scientific*). Reaktsiooni toimumiseks inkubeeriti ligatsioonisegu 1 tund toatemperatuuril.

### 2.2.7 *E.coli* transformeerimine

Jää peal sulatatud RbCl-ga keemiliselt kompetentseks muudetud DH5α *E. coli* rakkudele lisati pool (10 µl) ligatsioonisegu ning rakke hoiti 30 minutit jääl. Seejärel tehti termoblokis (*Labnet AccuBlock<sup>TM</sup>*) *heat shock* 1 minut temperatuuril 42°C. Rakkudele lisati 1 ml LB

(*lysogeny broth*) söödet (Tabel 2) ja rakke kasvatati 1 tund termoblokis temperatuuril 37°C. Seejärel rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise (*Heraeus fresco*) teel 5000 rpm, 4 minutit. Seejärel eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti 100 µl-s LB söötmes ning külvati LB söötmega Petri tassile, mis sisaldas 200 µg/ml ampitsilliini. Rakke kasvatati üleöö temperatuuril 37°C.

### 2.2.8 Plasmidi kontrollimine koloonia PCR meetodil

Selektiivsöötmele üleöö inkubeeritud Petri tassilt võeti üksikud kolooniad ning suspendeeriti 10 µl MQ vees. Rakke kuumutati termoblokil (*Labnet AccuBlock™*) 5 minutit temperatuuril 95°C. Kuumutatud proovile lisati PCR segu, mis sisaldas 2,5 µl 10x PCR puhvrit (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% triton X 100, 5% ficoll 400, 10 mM tartrasiin), 2 µl 25 mM MgCl, 0,5 µl 10x nukleotiide, 0,5 µM *direct* ja *reverse* praimereid (Tabel 1), 2,5 U Taq (*Thermus Aquaticus*) polümeraasi ning MQ vett. PCR segu pipeteeriti kuumutatud proovidele. Reaktsiooni lõpp-maht oli 25 µl.

DNA amplifitseerimiseks kasutatud PCR programm:

1. Eeldenaturatsioon: 95°C, 30 s
2. Denaturatsioon: 95°C, 10 s
3. Praimerite seondumine: 58°C, 10 s
4. Süntees: 72°C, 1 min
5. Järelsüntees: 72°C, 5 min

Tsükleid 2-4 korrati kokku 25 korda. PCR reaktsioonil sünteesitud DNA fragmentide suuruse kontrollimiseks ja lahutamiseks kasutati 1% agarosgeelelektroforeesi 1x TBE (90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA pH 8,3) puhvris. DNA fragmendid visualiseeriti Et-Br ja UV valgusega ning suurus markerina kasutati 1 kb *Thermo Fisher Scientific GeneRuler DNA ladder* markerit.

### **2.2.9 FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit**

Koloonia PCR kontrollis positiivseks osutunud koloonia inokuleeriti 2 ml LB (Tabel 2) söötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin kontsentratsioonis 100 µg/ml ning kasvatati inkubaator loksutis (*Infors HT Multitron*) 180 rpm, temperatuuril 37°C üleöö. Kultuur pipeteeriti 2 ml katsutisse (*Eppendorf*) ning rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise (*Heraeus fresco*) teel 11000 g, 1 minut. Rakkudelt eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti 250 µl FAPD1 (*Favorgen*) puhvris. Seejärel lisati rakkude lüüsimiseks 250 µl FAPD2 (*Favorgen*) lüüsi puhvrit. Rakke segati õrnalt üle korgi keerates, proove inkubeeriti 2-5 minutit toatemperatuuril. Neutraliseerimiseks lisati 350 µl FAPD3 (*Favorgen*) puhvrit ning proove segati õrnalt üle korgi keerates. Proove tsentrifuugiti 5 minutit temperatuuril 4°C, 18000 g. Supernatant pipeteeriti FAPD kolonnile (*Favorgen*) ning plasmiidse DNA sidumiseks kolonniga tsentrifuugiti 30 sekundit temperatuuril 4°C, 11000 g. Läbijooks eemaldati ning kolonni pesti 400 µl WF puhvriga (*Favorgen*). Korrati tsentrifuugimist temperatuuril 4°C, 11000 g, 30 sekundit. Läbijooks eemaldati ning kolonni pesti 700 µl *Wash* puhvriga (*Favorgen*), korrati tsentrifuugimist temperatuuril 4°C, 11000 g, 30 sekundit ja läbijooks eemaldati. Seejärel kolonni kuivatati tsentrifuugides 3 minutit, temperatuuril 4°C, 18000 g. Kolonn tõsteti uude puhtasse 1,5 ml katsutisse (*Eppendorf*) ning kuivatati lahtise korgiga 5 minutit temperatuuril 37°C. DNA elueeriti kolonnilt 50 µl elueerimispuhvriga (*Favorgen*) toatemperatuuril tsentrifuugimise teel 18000 g, 1 minut. DNA kontsentratsioonid määrati *NanoDrop*-iga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific*) neeldumise järgi lainepikkusel 260 nm.

### **2.2.10 Pagaripärmi transformeerimine liitiumatsetaadi meetodil**

YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) söötmega Petri tassilt inokuleeriti üks koloonia 20 ml-sse YPD (Tabel 2) söötmesse ning kasvatati üleöö loksutis (*Infors HT Multitron*) 180 rpm, temperatuuril 30°C. Järgmisel päeval mõõdeti spektrofotomeetriga (*Ultrospec 2000*) rakkude optiline tihedus lainepikkusel 600 nm ( $OD_{600}$ ). Rakud lahjendati 50 ml-sse YPD söötmesse, et optiline tihedus oleks 0,3. Pärmirakke kasvatati loksutis 180 rpm, temperatuuril 30°C kuni optilise tiheduseni 0,6-0,8, misjärel rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise (*Hettich Rotina 420R*) teel 3200 rpm, 2 minutit. Sööde eemaldati ning rakke pesti 25 ml-i steriilse MQ veega. Järgmisena koguti rakud uuesti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel 3200 rpm, 2

minutit. Supernatant eemaldati ning rakke pesti 25 ml 1x LiOAc-TE (0,1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) puhvriga. Rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel 2 minutit, 3200 rpm. Supernatant eemaldati ning korrati toatemperatuuril tsentrifuugimist 3200 rpm, 1 minut. Eemaldati supernatandi jääk. Rakud resuspendeeriti 300 µl 1x LiOAc-TE (100 mM LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) puhvril. Järgmisena denatureeriti *carrier* DNA (heeringa spermi DNA, *Amresco*) temperatuuril 95°C, 5 minutit ning jahutati jääl. Seejärel pipeteeriti 2 µl plasmiidset DNA-d 1,5 ml katsutisse (*Eppendorf*) ning sellele lisati 50 µl 10 mg/ml denatureeritud *carrier* DNA-d ja 50 µl kompetentseid pärmi rakke. Segu inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Järgmisena lisati segule 300 µl PEG-LiOAc-TE (40% PEG 4000, 1x LiOAc-TE) lahust ja inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit. Segule lisati 30 µl DMSO-d (dimetüülsulfoksiid), rakke segati ning tehti kuumašokk 10 minutit temperatuuril 42°C. Rakud koguti tsentrifuugides (*Heraeus fresco*) 3000 rpm, 3 minutit. Supernatant eemaldati ja rakuosade suspenderiti 100 µl MQ veega. Rakud külvati SC-HIS (Tabel 2) selektiiv söötmele ning rakke kasvatati temperatuuril 30°C 3-5 päeva.

### 2.2.11 Pärmi 80S ribosoomide puhastamine

Üks koloonia inokuleeriti 20 ml SC-HIS (Tabel 2) söötmesse ning kasvatati üleöö loksutis (*Infors HT Multitron*) 180 rpm, temperatuuril 30°C. Järgmisel päeval mõõdeti rakkude optiline tihedus lainepikkusel 600 nm ( $OD_{600}$ ) (*Ultrospec 2000*) ning rakud lahjendati 500 ml SC-HIS söötmesse optilisele tihedusele 0,3. Rakke kasvatati loksutis 180 rpm, temperatuuril 30°C kuni rakkude optiline tihedus jõudis vahemikku  $OD_{600}=0,8-1$ . Rakud koguti tsentrifuugimise (*Hettich Rotina 420R*) teel temperatuuril 4°C, 3200 rpm, 10 minutit. Rakusademelt eemaldati sööde ja rakkusadet pesti 25 ml puhver A-ga (30 mM Hepes-KOH pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 50 µl 1 M DTT (ditiotreitol), 125 µl 100 mM PMSF (fenüülmetüülsulfonüül fluoriid)). Rakud koguti tsentrifuugides 5 minutit temperatuuril 4°C, 3200 rpm ning supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti 8 ml puhver A-ga. Pärmirakud kanti 2 ml homogeniseerimis tuubidesse (*VWR Micro Centrifuge Tube*), mis sisaldasid 0,5 ml klaas kuule (Ø 0,25-0,5 mm, *Carl Roth*). Tuube homogeniseeriti *Precellys 24 homogenizer* homogenisaatoris programmiga: 3 x 60 sekundit 6000 rpm, iga tsükli järel 60 sekundit pausi, temperatuuril 4°C. Homogeniseeritud proovide lüsaati klaariti tsentrifuugides (*Heraeus fresco*) 5 minutit 13000 rpm, 4°C. Supernatant tõsteti uude 2 ml

katsutisse (*Eppendorf*) ning tsentrifugimist ja supernatandi eraldamist korrati üks kord 5 minutit tsentrifugides ja üks kord 10 minutit tsentrifugides. Lüsaadis nukleiinhappe sisaldust hinnati *NanoDrop*-iga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific*) lainepikkusel 260 nm. Gradiendisegajat kasutades formeeriti 10-30% sahharoos/1x puhver A gradient ning lüsaat kanti gradientidele. Lüsaadis olevast materjalist lahutati ribosomaalsed partiklid ultratsentrifugides (*Beckman Coulter L90K, SW28* rootoriga) temperatuuril 4°C,  $\omega^2t=2,4 \times 10^{11}$ . Gradientidelt eraldati 80S ribosoomid. Selleks pumbati peristaltilise pumbaga gradiendid läbi spektrofotomeetri, mis mõõtis neelduvust lainepikkusel  $A_{260}$ . *NanoDrop*-iga määrati kogutud fraktsioonide kontsentratsioon lainepikkusel 260 nm. 80S ribosoomidele lisati 2,5 mahtu 96% etanooli ning sadestati temperatuuril -20°C üleöö. 80S ribosoomide kogumiseks tsentrifugiti (*Hettich Rotina 420R*) ribosoomide 40 minutit temperatuuril 4°C, 4000 rpm. Sadestatud ribosoomid resuspendeeriti TEN (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) puhvris ning kontsentratsioon määrati *NanoDrop*-iga lainepikkusel 260 nm.

### **2.2.12 Ribosoomidest rRNA puhastamine fenool/kloroform meetodil**

Lainepikkusel  $A_{260}$  mõõdetud 55 ühikule 80S ribosoomidele lisati TEN puhvrit (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) lõppruumalani 400 µl ja 400 µl fenooli pH 5,0 (*Amresco*). Proove segati 3 minutit vorteksides (*Eppendorf MixMate*) 2000 rpm ja faaside lahutamiseks tsentrifugiti (*Heraeus fresco*) toatemperatuuril 3 minutit 13000 rpm. Fenooli peale tekkinud vesifaas pipeteeriti uude katsutisse (*Eppendorf*), fenoolile lisati 100 µl MQ vett ning vorteksil segamist, tsentrifugimist ja vesifaasi eraldamist korrati samadel tingimustel. Eraldatud vesifaasile lisati 400 µl fenooli ja tervet protsessi korrati veel kaks korda. Proovi puhastamiseks fenooli jääkidest lisati rRNA-le 400 µl kloroformi ning segati vorteksil 3 minutit 2000 rpm, tsentrifugiti toatemperatuuril 3 minutit 13000 rpm ja vesifaas pipeteeriti uude katsutisse. rRNA sadestamiseks lisati 2,5 mahtu 96% etanooli ning rRNA-d sadestati 30 minutit temperatuuril -20°C. Seejärel rRNA koguti tsentrifugides 40 minutit temperatuuril 4°C, 4000 rpm. Supernatant eemaldati, rRNA sadet kuivatati termoblokis (*Labnet AccuBlock™*) 5 minutit temperatuuril 37°C ja rRNA resuspendeeriti 50 µl-is MQ vees. Kontsentratsioon määrati *NanoDrop*-iga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*,

*Thermo Fisher Scientific*) lainepikkusel 260 nm ning puhtust hinnati lainepikkuste 260/280 suhte järgi.

### 2.2.13 CMCT-ga modifitseerimine $\Psi$ määramiseks

rRNA-s pseudouridiinide märgistamiseks teostati CMCT-alus töötlus. Positiivsele reaktsioonile lisati 15  $\mu\text{g}$  rRNA-d, 80  $\mu\text{l}$  BEU (50 mM bitsiin, 4 mM EDTA, 7 M urea) puhvrit, 20  $\mu\text{l}$  1 M CMCT (1-tsükloheksüül-3-(2-(4-morfolinüül)etüül)karbodiimiid)/BEU puhvrit. Negatiivsele reaktsioonile lisati 15  $\mu\text{g}$  rRNA-d ja 100  $\mu\text{l}$  BEU puhvrit. Selleks, et U, G ja  $\Psi$  nukleotiididele lisada CMC grupp inkubeeriti proove 10 minutit termoblokis (*Labnet AccuBlock<sup>TM</sup>*) temperatuuril 37°C. Reaktsiooni peatamiseks lisati 2  $\mu\text{l}$  dekstraani ja 38  $\mu\text{l}$  NaOAc pH 5,5. rRNA sadestamiseks lisati 600  $\mu\text{l}$  külma 96% etanooli ning reaktsiooni hoiti 10 minutit temperatuuril -20°C. Seejärel rRNA koguti tsentrifuugides (*Heraeus fresco*) 10 minutit temperatuuril 4°C, 13000 rpm. rRNA sadet pesti 1 ml külma 70% etanooliga, proove tsentrifuugiti 5 minutit temperatuuril 4°C, 13000 rpm ning supernatant eemaldati. rRNA pesu korrati samadel tingimustel ning rRNA sadet kuivatati 10 minutit temperatuuril 37°C. Selleks, et CMCT eemaldada U ja G nukleotiidide küljest lahustati rRNA sade 50  $\mu\text{l}$  50 mM NKP pH 10,4 (20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA) puhvris ja reaktsiooni hoiti 4 tundi temperatuuril 37°C. Reaktsiooni peatamiseks lisati 2  $\mu\text{l}$  dekstraani, 6  $\mu\text{l}$  4 M NaOAc pH 5,5 ja 110  $\mu\text{l}$  külma 96% etanooli. Seejärel rRNA sadestati ja pesti samadel eelnevalt nimetatud tingimustel. Modifitseeritud rRNA-d kuivatati 5 minutit temperatuuril 37°C ning rRNA lahustati 20  $\mu\text{l}$  MQ vees ning rRNA kontsentratsioon määrati *NanoDrop*-iga (*NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific*) lainepikkusel A<sub>260</sub>.

### 2.2.14 Praimer ekstensioon

Praimer ekstensiooni jaoks võeti 2 pmol rRNA-d, millele lisati 2  $\mu\text{l}$  5x hübridisatsiooni puhvrit (225 mM K-HEPES pH 7,0, 450 mM KCl) ja 2 pmol fluorestseeruva märgisega praimerit (Tabel 1). Reaktsiooni lõppruumala viidi MQ veega 9  $\mu\text{l}$ -ni. rRNA-d denatureeriti termoblokis (*Labnet AccuBlock<sup>TM</sup>*) temperatuuril 95°C ning reaktsioonil lasti aeglaselt jahtuda temperatuurini 47°C, mille käigus seondub praimer rRNA-ga. Reaktsioonisegule lisati 1,2  $\mu\text{l}$  10x revertaasi puhvrit (500 mM TrisOAc, 750 mM KOAc, 80 mM MgOAc, 100

mM DTT, pH 8,3) ja 0,2 µl 10 U/µl AMV pöördtranskriptaasi (*Promega*). Riboosi metülatiooni tuvastamiseks lisati ühele reaktsioonile 1,2 µl 10 mM dNTP-d (desoksüribonukleotiidtrifosfaat) ja teisele reaktsioonile lisati 0,48 µl 0,1 mM dNTP-d. CMCT-ga töödeldud ja töötlemata proovidele lisati 1,2 µl 10 mM dNTP-d. Ekstensiooni toimumiseks inkubeeriti proove termoblokis 15 minutit temperatuuril 42°C. Reaktsiooni lõpetamiseks lisati proovidele 120 µl 0,3 M NaOAc, 3 osa 96% EtOH lahust. rRNA sadestati 30 minutit temperatuuril -20°C ning koguti tsentrifuugides (*Heraeus fresco*) 15 minutit temperatuuril 4°C, 13000 rpm. rRNA sademelt eemaldati supernatant ning sadet kuivatati 5 minutit temperatuuril 37°C. rRNA sade lahustati 10 µl-is formamiid/NaOAc/EtOH lahuses. cDNA polünukleotiidid lahutati 7% polüakrüülamiid geelil, mille valmistas Margus Leppik. FAM (*fluorescein*) märgis visualiseeriti *Amersham Typhoon* masinat kasutades, fluorestsentsi programmiga lainepikkusel 488 nm (Cy2).

#### **2.2.15 Tilk-külv analüüs**

Erinevate transformeeritud tüvede kasvuerinevuse ja temperatuuri tundlikkuse võrdlemiseks inokuleeriti üks koloonia 3 ml SC-HIS vedelsöötmesse (Tabel 2) ning kasvatati üleöö loksutis (*Infors HT Multitron*) 180 rpm temperatuuril 30°C. Mõõdeti tüvede optiline tihedus lainepikkusel 600 nm ( $OD_{600}$ ) (*Ultrospec 2000*) ning rakud lahjendati vahemikku  $OD_{600}=0,4-0,7$ . Rakukultuurist tehti lahjendused, kus 5 µl kultuuri sisaldaks 5000, 2500, 1000, 200 ja 20 rakku. Igast lahjendusest külvati 5 µl rakukultuuri tilgana söötmetassidele. Rakke kasvatati 2-10 päeva YPD ja SC-HIS agarsöötmetel (Tabel 2). Tüvede temperatuuritundlikkuse võrdlemiseks valiti neli temperatuuri – 35°C, 30°C, 20°C ja 15°C.

## 2.3 TULEMUSED JA ARUTELU

### 2.3.1 Tüvede konstrueerimine

Varasemalt on töögrupis valminud pagaripärmi tüvi TYSC906 (*3ΔsnR*, *nop2\** (C424A/C478A), *spb1\** (D52A/E679K)) (Tabel 3). Selles tüves on puudu seitse 25S rRNA modifikatsiooni: m<sup>5</sup>C2870, Um2921, Gm2922, Um2724, Gm2619, Ψ2880 ja Ψ2826 ning üks 18S rRNA modifikatsioon – Am420 (Tabel 3) (Leppik *et al.*, 2024). TYSC906 konstrueerimise eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas eelnevalt nimetatud kaheksa rRNA modifikatsiooni ribosoomi funktsionaalsust mõjutavad (Leppik *et al.*, 2024). Selleks deleteeriti pärmi genoomist snoRNA-de snR34, snR52 ja snR67 kodeerivad järjestused (Leppik *et al.*, 2024). Metüültransferaasid *NOP2* ja *SPB1* deleteeriti genoomist ning asendati plasmiidilt kodeeritavate katalüütiliselt inaktiivsete versioonidega (Leppik *et al.*, 2024). Need kolm snoRNA-d valiti, sest snR67, snR52 ja snR34 juhivad konserveerunud modifikatsioonide Gm2619, Um2921 ja Ψ2826 toimumist (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Kuid ühe snoRNA deleteerimisel kaovad kaks modifikatsiooni (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Selle probleemi lahendamiseks on üheks võimaluseks plasmiidilt ekspresseerida mutantseid snoRNA-sid, mis kaotaksid võime osaleda konserveerunud modifikatsioonide teostamisel.

Seega oleks vaja konstrueerida plasmiid, mis sisaldaks muteeritud snR34, snR52 ja snR67 järjestusi. Selline plasmiid taastaks ainult mittekonserveerunud modifikatsioonid: Ψ2880, Am420 ja Um2724.

Töö esimeseks etapiks oli koostada kontroll plasmiid, mis sisaldab metsiktüüpi snR34, snR52 ja snR67 geenijärjestusi. Selline plasmiid taastaks kaheksast modifikatsioonist kuus: Gm2619, Um2724, Um2921, Am420, Ψ2880 ja Ψ2826. Metsiktüüpi pagaripärmi genoomse DNA järjestuselt amplifitseeriti spetsiaalsete praimeritega snR34, snR52 ja snR67 järjestused (Tabel 1). Pärmi genoomis snR67 lähedal asub snR53, mis vastutab positsiooni Am796 (18S rRNA-s) metüleerimise eest. Seetõttu on võimalus, et Leppik *et al.*, 2024 koostatud tüves on snR67 ja snR53 koos deleteeritud. Mistõttu otsustati snR67 kloonimise puhul paljundada genoomist järjestus, mis sisaldas lisaks snR67 järjestusele ka snR53 kodeerivat järjestust. Primerid sisaldasid restriктаaside poolt ära tuntavaid järjestusi, mis PCR-i käigus lisati snoRNA-sid kodeerivate DNA järjestuste otstesse. Selliste praimeritega PCR amplifitseerimine võimaldas DNA järjestuste spetsiifilist ligeerimist plasmidi pRS413 multikloonimis saiti (MCS). Restriктаasidega töödeldud DNA fragmendid ligeeriti pRS413

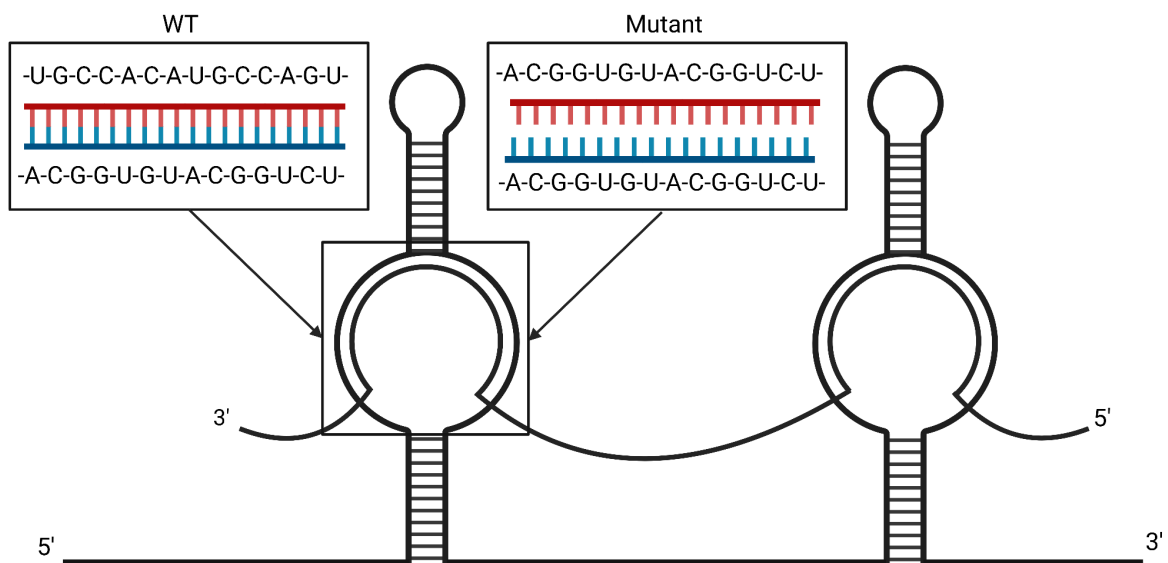
plasmidi ning plasmidi paljundamiseks transformeeriti see *E. coli* DH5 $\alpha$  tüvesse (Tabel 3). Transformeeritud rakud külvati LB tardsöötmele (Tabel 2). Koloonia PCR kontrollis positiivseteks osunud kolooniatest eraldati plasmidid ja sisestatud järjestuste õigsust kontrolliti sekveneerimise teel.

Selleks, et kontrollida, kas konstrueeritud plasmidid töötab *in vivo*, transformeeriti plasmid TYSC898 (*3 $\Delta$ snR*, *spb1\**) tüvesse (Tabel 3). TYSC898 valiti, sest tüvest puuduvad snR34, snR52 ja snR67 ning tüvi ekspresseerib katalüütiliselt inaktiivset Spb1 (Tabel 3). See võimaldab selgitada, kas modifikatsioonimuster taastub. On oluline, et valitud tüves oleks Spb1 katalüütiliselt inaktiivne, sest lisaks Gm2922 modifikatsioonile metüleerib Spb1  $\Delta$ snR52 puhul ka konserveerunud positsiooni Um2921 (Bonnerot *et al.*, 2003). Lisaks on TYSC898 tüve generatsiooniaeg lühem kui TYSC906 (*3 $\Delta$ snR*, *nop2\**, *spb1\**) tüvel (Leppik *et al.*, 2024). Konstrueeritud TYSC898\_snR tüvest eraldati ribosoomid, puhastati fenool/kloroform meetodil rRNA ning kasutades praimer ekstensiooni, analüüsiti rRNA modifikatsioonimustrit. Praimer ekstensiooni tulemused kinnitasid, et konstrueeritud plasmidid taastab puuduvad kuus modifikatsiooni: Um2921, Um2724, Gm2619, Am420,  $\Psi$ 2880 ja  $\Psi$ 2826 (Joonised 7, 8, 9, 10). Tulemustest sõltuvalt järelitati, et selline meetod töötab. Kontrolli käigus veenduti, et kõik plasmidi pRS413\_snR kloneeritud snoRNA geenid on funktsionaalsed ja taastavad metsiktüüpi modifikatsioonimustrit.

Töö järgmiseks etapiks oli konstrueerida plasmidid, mis taastab ainult modifikatsioonid rRNA kohtades, mis ei ole evolutsiooniliselt konserveerunud: Um2724, Am420 ja  $\Psi$ 2880. Sellise plasmidi konstrueerimiseks kasutati suunatud mutageneesi, mille käigus snoRNA-de ASE järjestused asendati sihtmärk rRNA järjestustega (Joonis 6). Sellised muteeritud järjestustega snoRNA-d ei ole võimelised kohtspetsiifiliselt rRNA-ga paarduma ja kaotavad võime suunata evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonide tekkimist ribosomaalsesse RNA-sse. Sellise plasmid viimine rakkudesse, kus puuduvad metsiktüüpi snoRNA-d, võimaldab taastada vaid ühe metsiktüüpi snoRNA poolt suunatud modifikatsiooni. Muteeritud snoRNA-sid sisaldav plasmid võimaldab rakkudes sünteesida ribosoomid, millest on puudu vaid evolutsiooniliselt konserveerunud ribosoomid, et hinnata nende mõju rakule.

Mutantse plasmidi konstrueerimiseks amplifitseeriti pRS413\_snR plasmidilt spetsiaalsete oligotega mutantsed snR34, snR52 ja snR67 järjestused (Tabel 1). Amplifitseeritud DNA fragmente ja plasmidi töödeldi restriktasididega ning liigeeriti üksikshaaval plasmidi, vahetades

plasmiidist välja metsiktüüpi snR järjestused muteeritud snR järjestuste vastu. Mutantset plasmidi kontrolliti koloonia PCR meetodil ja plasmidi viidud järjestused kontrolliti sekveneerimise teel. Konstrueeritud pRS413\_mut plasmiid transformeeriti TYSC898 (*3ΔsnR*, *spb1\**) pagaripärmi tüvesse (Tabel 3). Transformeeritud rakkudest eraldati ribosoomid, millest puhastati fenool/kloroformi meetodil rRNA ning kasutades praimer ekstensiooni analüüsi rRNA modifikatsioonimustrit. Praimer ekstensiooni tulemused kinnitasid, et konstrueeritud muteeritud snoRNA-sid sisaldav plasmiid taastab puudu olevatest kuuest modifikatsioonist kolm: Um2724, Am420 ja Ψ2880.



**Joonis 6. Metsiktüüpi snR34 ja mutantse snR34 ASE järjestuste illustratiivne võrdlus.** Joonisel on näha H/ACA snoRNA snR34 illustratiivne struktuur. Võrreldud on metsiktüüpi (WT) snR34 ja mutantse snR34 ASE järjestusi. Metsiktüüpi järjestus on võimeline paarduma sihtmärk rRNA-ga tänu komplementaarsele järjestusele, aga mutantne järjestus on identne sihtmärk rRNA-ga, mistõttu paarumist ei toimu ja positsiooni ei modifitseerita ([Biorender.com](http://Biorender.com)).

### 2.3.2 Konstrueeritud plasmidi sisaldavatest tüvedest puuduvad vaid evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonid

Konstrueeritud plasmiidid pRS413\_mut ja pRS413\_snR transformeeriti TYSC906 pagaripärmi tüvesse (Tabel 3). TYSC906 valiti, sest tüvest puuduvad konserveerunud modifikatsioonid: Ψ2826 (snR34), Um2921 (snR52), Gm2619 (snR67), m<sup>5</sup>C2870 (Nop2) ja mittekonserveerunud modifikatsioonid: Ψ2880 (snR34), Am420 (snR52), Um2724 (snR67),

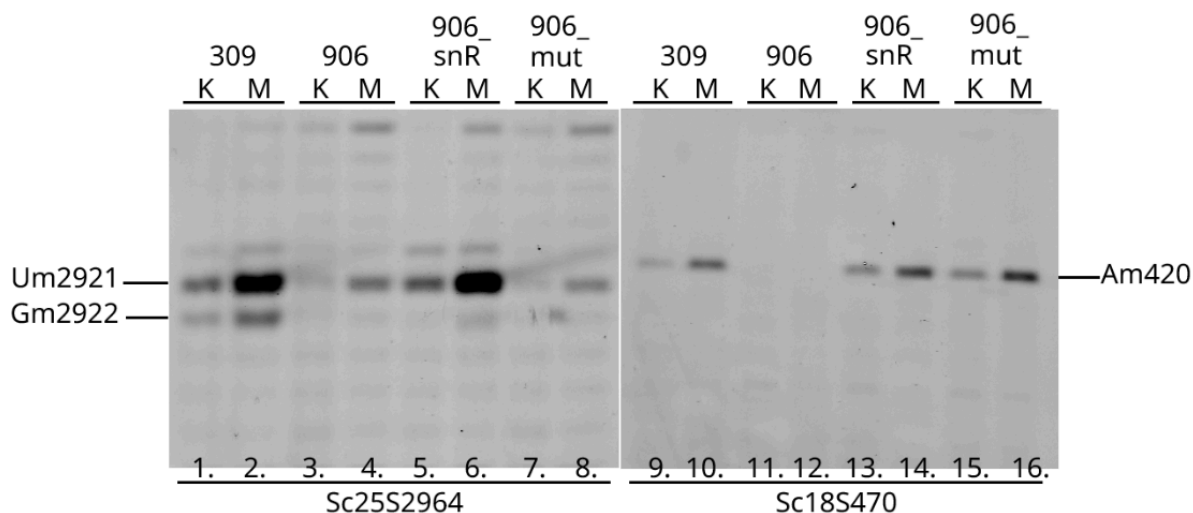
Gm2922 (Spb1) (Leppik *et al.*, 2024). Konstrueeritud TYSC906\_mut ja TYSC906\_snR tüvedest eraldati 80S ribosoomid ultratsentrifuugimise meetodil. Nendest 80S ribosoomidest puhastati fenool/kloroformi meetodil rRNA. Puhastatud rRNA-le tehti praimer ekstensioon. Lisaks tehti ühele osale puhastatud rRNA-le CMCT töötlus, et visualiseerida pseudouridiine.

snR52 juhib evolutsiooniliselt konserveerunud metülatsioon positsioon Um2921 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). TYSC906\_mut tüve signaali positiivse kontroll TYSC309 tüve signaaliga võrreldes on näha, et TYSC906\_mut tüves ei ole positsioon metüleeritud, aga TYSC309 tüves on metüleeritud (Joonis 7, rajad 2, 8). TYSC906\_mut tüve signaal on identne negatiivse kontroll TYSC906 tüve signaaliga, mis tähendab, et positsioon ei ole metüleeritud (Joonis 7, rajad 4, 8). TYSC906\_snR tüves on signaal identne TYSC309 tüve signaaliga ehk mõlemas tüves on positsioon Um2921 metüleeritud (Joonis 7, rajad 2, 6).

Teine modifikatsioon, mida snR52 juhib on metülatsioon positsioonis Am420 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Am420 on metüleeritud TYSC906\_mut tüves ja metsiktüüpi snoRNA-sid ekspresseerivas TYSC906\_snR tüves (Joonis 7, rajad 14, 16). TYSC906\_mut tüves on positsioon metüleeritud, sest tegemist on mittekonserveerunud PTC modifikatsiooniga ja selles tüves on muteeritud ainult positsiooni Gm2921 ära tundev ASE järjestus (Joonis 7, 16. rada). Metülatsiooni signaal puudus tüves TYSC906, kus snR52 on deleteeritud ja seetõttu positsiooni ei metüleerita (Joonis 7, 12. rada).

Metsiktüüpi pärmis (TYSC309) on positsiooni Gm2922 iseseisvalt metüleeritud ensüümi Spb1 poolt (Joonis 7, 2. rada) (Bonnerot *et al.*, 2003). TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut tüvedes ekspresseerub plasmiidilt katalüütiliselt inaktiivne Spb1, mistõttu ei ole positsioon Gm2922 metüleeritud (Joonis 7, rajad 4, 6, 8). Spb1 on omadus metüleerida ka positsiooni Um2921 juhul, kui snR52 on deleteeritud (Bonnerot *et al.*, 2003). Kuna TYSC906 tüves on snR52 deleteeritud ja Spb1 on katalüütiliselt inaktiivne, siis ei saa Gm2922 ega Um2921 olla metüleeritud (Joonis 7, 4. rada).

pRS413\_snR plasmiidis olev metsiktüüpi snR52 töötab ootuspäraselt taastades mõlemad metüleerimised positsioonides Um2921 ja Am420. pRS413\_mut plasmiidis olev muteeritud snR52 töötab oodatult ja taastab ainult mittekonserveerunud modifikatsiooni Am420. Muteeritud snoRNA-sid sisaldavas TYSC906\_mut tüves ei esine metülatsiooni positsioonis Um2921, sest selle positsiooniga paarduv snR52 ASE järjestus on identne sihtmärk rRNA-ga.

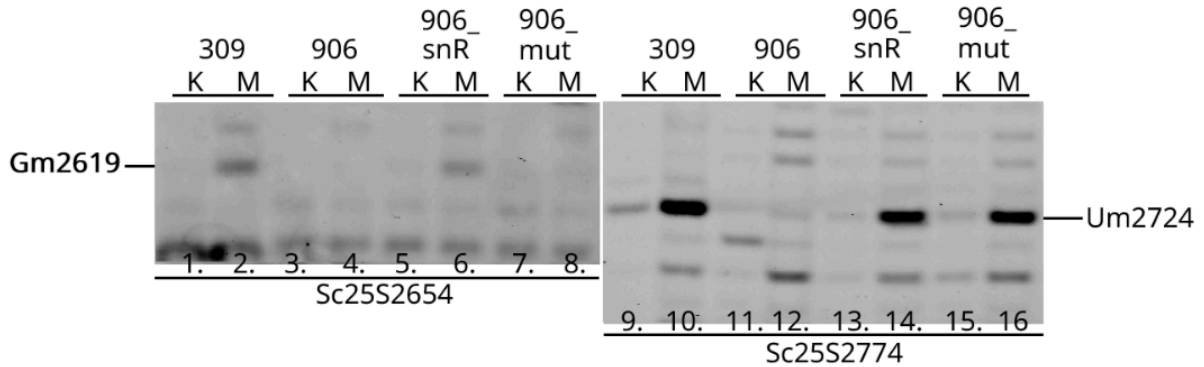


**Joonis 7. snR52 juhitud modifikatsioonide analüüs.** Joonisel on tüvede TYSC309, TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut praimer ektensiooni tulemused positsioonidel Um2921, Gm2922 ja Am420. Nukleotiidid on üksteisest lahutatud 7% polüakrüülamiid geelil ning visualiseeritud FAM märgise laseriga ergastumisel (Lisa 1). Radade üleval on kõrged ja madalad dNTP kontsentratsioonid tähistatud vastavalt K-kõrge dNTP kontsentratsioon (10 mM) ja M-madal dNTP kontsentratsioon (0,1 mM). Modifikatsioonide visualiseerimiseks kasutatud praimerid on Sc25S2964 ja Sc18S470 (Tabel 1).

snR67 juhib evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsiooni positsioonis Gm2619 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). TYSC906\_mut tüve ja TYSC309 tüve signaale võrreldes on näha, et TYSC309 tüves on positsioon Gm2619 metüleeritud ning TYSC906\_mut tüves ei ole Gm2619 metüleeritud (Joonis 8, rajad 2, 8). Negatiivses kontroll TYSC906 tüves ei ole positsioon metüleeritud ja signaal on identne TYSC906\_mut tüve signaaliga (Joonis 8, rajad 4, 8). Metsiktüüpi snR67 ekspresseerivas TYSC906\_snR tüve signaal sarnaneb positiivse kontroll TYSC309 tüve signaaliga, mis tähendab, et Gm2619 on TYSC906\_snR tüves metüleeritud (Joonis 8, rajad 2, 6).

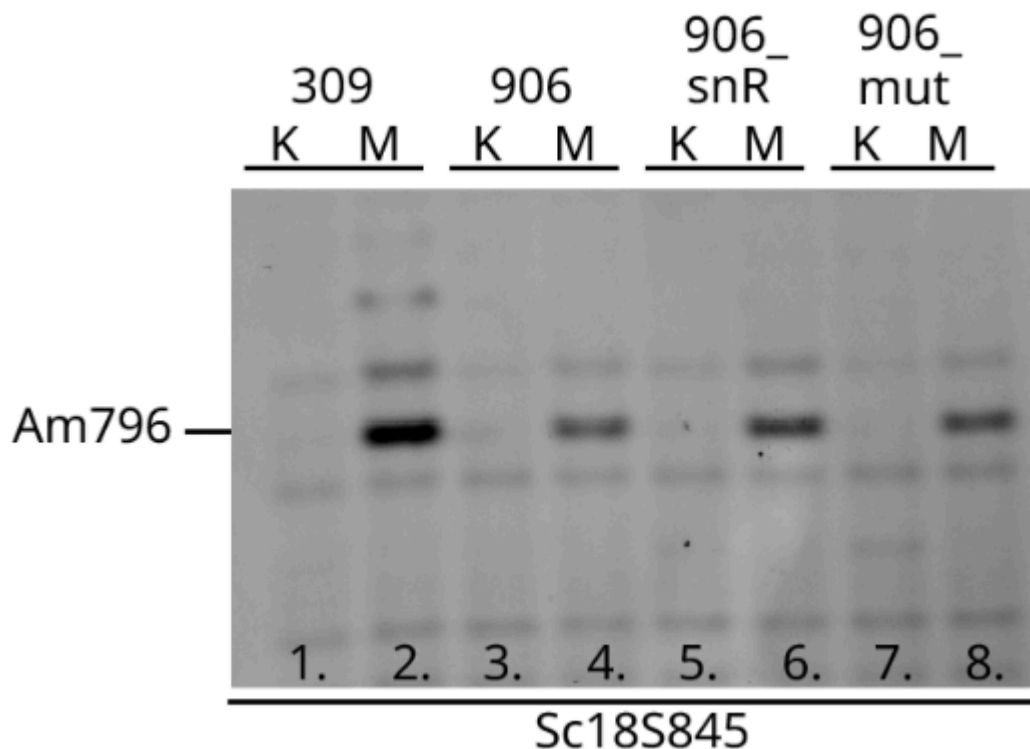
Teine snR67 poolt juhitud metülatsioon toimub positsioonis Um2724 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). TYSC906\_mut tüve signaal on TYSC906\_snR ja TYSC309 tüvede signaalidega identne (Joonis 8, rajad 10, 14, 16). TYSC906\_snR tüves on metülatsiooni signaali näha, sest pRS413\_3snR plasmiid taastab modifikatsiooni (Joonis 8, 14. rada). TYSC906\_mut tüves on positsioon Um2724 metüleeritud, sest tegemist on mittekonserveerunud modifikatsiooniga, mida pRS413\_3snR\_mut plasmiid ekspresseerib (Joonis 8, 16. rada).

pRS413\_mut plasmiid töötab ootuspäraselt ning taastab ainult ühe snR67 poolt juhitud modifikatsiooni – Um2724. pRS413\_snR plasmiidilt ekspresseeriv metsiktüüpi snR67 taastab kaks modifikatsiooni – Gm2619 ja Um2724.



**Joonis 8. snR67 juhitud modifikatsioonide analüüs.** Joonisel on tüvede TYSC309, TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut praimer ekstensiooni tulemused positsioonidel Gm2619 ja Um2724. Nukleotiidid on üksteisest lahutatud 7% polüakrüülamiid geelil ning visualiseeritud FAM märgise laseriga ergastumisel (Lisa 1). Radade üleval on kõrged ja madalad dNTP kontsentratsioonid tähistatud vastavalt K-kõrge dNTP kontsentratsioon (10 mM) ja M-madal dNTP kontsentratsioon (0,1 mM). Modifikatsioonide visualiseerimiseks kasutatud praimerid on Sc25S2654 ja Sc25S2774 (Tabel 1).

Käesolevas töös kloneeriti snR67 kodeeriv järjestus nii, et see sisaldas ka snR53 järjestust. snR53 suunab metüleerimist positsioonis Am796 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Tulemused näitavad, et Am796 on igas tüves metüleeritud ja seetõttu snR53 eksisteeris kõikides võrreldud tüvedes (Joonis 9, rajad 2, 4, 6, 8). See tulemus viitab sellele, et snR53 funktsioon ei ole kadunud algses TYSC906 tüves. TYSC906 tüves positsioonis Am796 metüleerimine tähendab, et ei ole otsest vajadust, et konstrueeritud pRS413\_snR ja pRS413\_mut plasmiidid ekspresseeriks snR53 (Joonis 10, 4. rada). Kuid samas ei ole põhjust arvata, et konstrueeritud plasmiididelt snR53 ekspresseerimine muudaks käesoleva töö tulemusi.



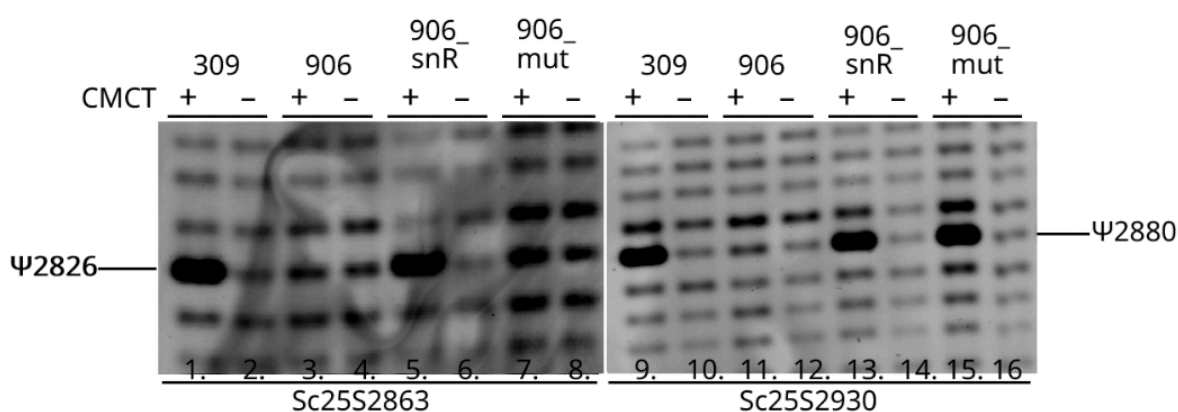
**Joonis 9. snR53 juhitud modifikatsiooni analüüs.** Joonisel on tüvede TYSC309, TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut praimer ekstensiooni tulemused positsioonil Am796. Nukleotiidid on üksteisest lahutatud 7% poliüakrüülamiid geelil ning visualiseeritud FAM märgise laseriga ergastumisel (Lisa 2). Radade üleval on kõrge ja madalad dNTP kontsentratsioonid tähistatud vastavalt K-kõrge dNTP kontsentratsioon (10 mM) ja M-madal dNTP kontsentratsioon (0,1 mM). Modifikatsiooni visualiseerimiseks kasutatud praimer on Sc18S845 (Tabel 1).

snR34 juhhib evolutsiooniliselt konserveerunud uridiini isomeriseerumist pseudouridiiniks positsioonis  $\Psi$ 2826 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021).  $\Psi$ 2826 signaali ei ole näha TYSC906\_mut tüves, lisaks ei ole signaali ka negatiivses kontroll tüves TYSC906 (Joonis 10, rajad 7, 3). Pseudouridiini signaali on näha positiivses kontroll tüves TYSC309 ja plasmiidilt metsiktüüpi snR34 ekspresseerivas TYSC906\_snR tüves (Joonis 10, rajad 1, 5). TYSC906\_mut tüve ja TYSC309 tüve signaali võrreldes on näha erinevust  $\Psi$ 2826 modifikatsiooni ekspresseerimisel (Joonis 10, rajad 7, 1).

snR34 juhhib ja modifikatsiooni positsioonis  $\Psi$ 2880 (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Pseudouridiini signaali positsioonis  $\Psi$ 2880 on näha TYSC309, TYSC906\_snR ja

TYSC906\_mut tüvedes (Joonis 10, rajad 9, 13, 15).  $\Psi$ 2880 signaali ei ole snR34 deletsiooniga TYSC906 tüves näha (Joonis 10, 11. rada).

Kuna  $\Psi$ 2880 puhul on tegemist on mittekonserveerunud modifikatsiooniga, siis plasmiidid pRS413\_snR ja pRS413\_mut mõlemad taastavad TYSC906 tüves modifikatsiooni (Joonis 10, rajad 13, 15).  $\Psi$ 2826 on konserveerunud modifikatsioon, mille taastab ainult pRS413\_snR plasmidi pealt ekspresseeruv metsiktüüpi snR34. pRS413\_mut plasmiidilt ekspresseeruv muteeritud snR34 ei paardu sihtmärk rRNA-ga ja seetõttu modifikatsiooni positsioonis  $\Psi$ 2826 ei toimu.



**Joonis 10. snR34 juhitud modifikatsioonide analüüs.** Joonisel on tüvede TYSC309, TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut praimer ekstensiooni tulemused positsioonidel  $\Psi$ 2826 ja  $\Psi$ 2880. Nukleotiidid on üksteisest lahutatud 7% polüakrüülamiid geelil ning visualiseeritud FAM märgise laseriga ergastumisel (Lisa 2). Radadel CMCT + ja – tähistavad proove, mis on töödeldud CMCT-ga ja proove, mis ei ole töödeldud CMCT-ga. Modifikatsioonide visualiseerimiseks kasutatud praimerid on Sc25S2863 ja Sc25S2930 (Tabel 1).

Praimer ekstensiooni tulemused kinnitavad, et mõlemad konstrueeritud plasmiidid töötavad korrektselt tüves TYSC906, taastades oodatavad modifikatsioonid. pRS413\_snR plasmiid taastab kõik snR34, snR52 ja snR67 juhitud modifikatsioonid: Um2921, Um2724, Gm2619, Am420,  $\Psi$ 2880 ja  $\Psi$ 2826 (Tabel 5). pRS413\_3snR\_mut plasmiidilt ekspresseeritud mutantsed snoRNA-d taastavad ainult mittekonserveerunud modifikatsioonid positsioonides: Um2724, Am420 ja  $\Psi$ 2880 (Tabel 5). pRS413\_3snR\_mut plasmiidilt ekspresseeruvad snoRNA-d ei taasta konserveerunud modifikatsioone ning seetõttu on võimalus võrrelda

konstrueeritud tüvede fenotüüpe ning hinnata konserveerunud ja mittekonserveerunud PTC modifikatsioonide olulisust külmatundliku fenotüübi kujunemisel.

**Tabel 5. Kokkuvõtte erinevatest tüvedest määratud modifikatsioonidest.** Tabelis on modifikatsioonide olemasolu märgitud vastavalt + või -. Konserveerunud modifikatsioonid on märgitud *boldis*, lisaks on märgitud, millises rRNA-s modifikatsioon paikneb ja milline snoRNA või valk modifikatsiooni toimumist juhib.

	25S						18S		
	Nop2	Spb1	snR34		snR67		snR52	snR53	
	<b>m<sup>5</sup>C2870</b>	Gm2922	<b>Ψ2826</b>	Ψ2880	<b>Gm2619</b>	Um2724	<b>Um2921</b>	Am420	Am796
TYSC309	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TYSC906	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TYSC906_snR	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TYSC906_mut	-	-	-	+	-	+	-	+	+

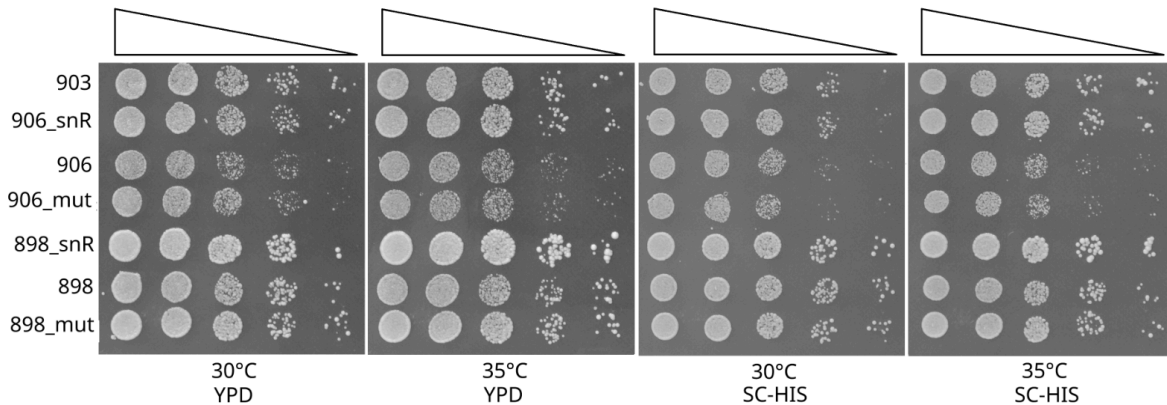
### 2.3.3 Konserveerunud modifikatsioonid mõjutavad külmatundlikkust

*S. cerevisiae* optimaalse kasvu temperatuur on 30°C (Salvadó *et al.*, 2011). Kõrgematel ja madalamatel temperatuuridel kasvatamine tekitab pärmis stressi ja metaboolseid ümberkorraldusi, mis on seotud ka translatsiooniga (Salvadó *et al.*, 2011). Selleks, et võrrelda konstrueeritud tüvede kasvu ja temperatuuritundlikkust kasvatati tüvesid neljal erineval temperatuuril: 30°C, 35°C, 20°C ja 15°C ja kahel erineval söötmel: YPD ja SC-HIS (Tabel 2).

Kontroll tüvedeks valiti TYSC906 (*3ΔsnR*, *nop2\**, *spb1\**), TYSC898 (*3ΔsnR*, *spb1\**) ja TYSC903 (*nop2\**, *spb1\**) (Tabel 3). TYSC903 valiti, sest tegemist on tüvega, kus genoomsed *SPB1* ja *NOP2* on deleteeritud ja asendatud plasmidi pealt ekspresseerivate katalüütiliselt inaktiivsete versioonidega (Leppik *et al.*, 2024). TYSC906 valiti, sest sellest tüvest on puudu kõik snR34, snR52, snR67, Spb1 ja Nop2 poolt juhitud modifikatsioonid (Leppik *et al.*, 2024). TYSC898 valiti, sest sellest tüvest on puudu kõik snR34, snR52, snR67 ja Spb1 poolt juhitud modifikatsioonid (Leppik *et al.*, 2024). TYSC906, TYSC898 ja TYSC903 tüvedesse transformeeriti pRS413 plasmid, mis ei sisaldanud snR järjestusi. Selleks, et tagada plasmidi olemasolu, kasvatati rakke SC-HIS selektiivsöötmel (Tabel 2). Konstrueeritud plasmiidid sisaldavad *HIS3* markergeeni ja ilma selleta ei suuda rakud histidiini mittesisaldaval SC-HIS

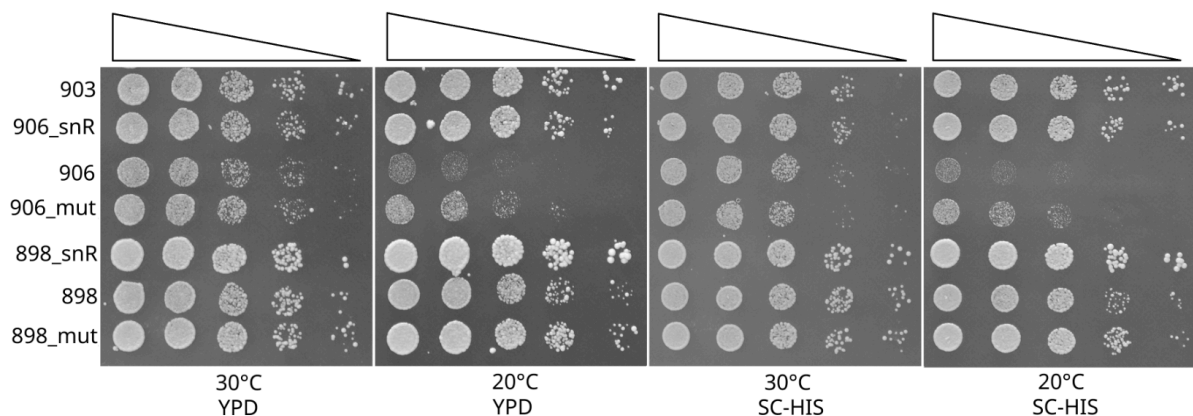
söötmel kasvada. TYSC906\_snR, TYSC906\_mut, TYSC898\_snR ja TYSC898\_mut tüvedes pole põhjust arvata, et plasmiid on kaduma läinud, sest plasmiidilt ekspresseeruvad snoRNA-d avaldavad rakule positiivset mõju (Joonis 11).

Temperatuuridel 30°C ja 35°C kasvab TYSC906\_snR identselt TYSC903 tüvega (Joonis 11). TYSC903 on tüvi, kus Spb1 ja Nop2 on katalüütiliselt inaktiivsed ja snR34, snR52 ja snR67 ei ole deleteeritud (Tabel 3). Kuna TYSC906\_snr sisaldab plasmidi, mis ekspresseerib puuduvaid snoRNA-sid, siis mõlemast tüvest puuduvad ainult Gm2922 ja m<sup>5</sup>C2870 modifikatsioonid. snoRNA-de poolt juhitud modifikatsioonide taastamine töötab ja seetõttu on tüvede fenotüübid temperatuuridel 30°C ja 35°C kasvult sarnased. TYSC906\_snR tüve kolooniad on suuremad kui TYSC906\_mut tüve kolooniad (Joonis 11). See näitab, et metsiktüüpi snoRNA-de ja seetõttu konserveerunud modifikatsioonide taastamine mõjub tüve kasvule positiivselt. TYSC906 ja TYSC906\_mut tüvede kasv on sarnane (Joonis 11). Sellest võib järeldada, et temperatuuridel 30°C ja 35°C mittekonserveerunud modifikatsioonide taastamine ei avalda mõju rakkude kasvule tardsöötmel. TYSC906 ja TYSC906\_mut tüved on mõlemad aeglasema kasvuga, kui neid võrrelda TYSC906\_snR tüvega (Joonis 11). Sellest saab järeldada, et konserveerunud modifikatsioonide taastamine avaldab positiivset mõju fenotüübile. Kõigis TYSC906 baasil konstrueeritud tüvedes on puudu modifikatsioonid Gm2922 ja m<sup>5</sup>C2870, sest tegemist on katalüütiliselt inaktiivseid Nop2 ja Spb1 ekspresseerivate tüvedega (Tabel 3). Kõigis TYSC898 baasil tehtud tüvedes on puudu metülatsioon positsioonis Gm2922, sest tegemist on katalüütiliselt inaktiivset Spb1 ekspresseerivate tüvedega. Kõigis kolmes võrreldud TYSC906 baasil konstrueeritud tüvedes ja TYSC903 tüves on näha väiksemaid ja aeglasemalt kasvavaid kolooniaid võrreldes kolme TYSC898 baasil konstrueeritud tüve kolooniatega (Joonis 11). See tulemus näitab, et isegi, kui taastada kolme snoRNA poolt juhitud modifikatsioonid ja Spb1 poolt metüleeritud Gm2922 on m<sup>5</sup>C2870 metülatsiooni puudumise mõju märkimisväärne. TYSC898\_snR ja TYSC906\_snR tüvedes olev pRS413\_snR plasmiid parandab fenotüüpi võrreldes TYSC898 ja TYSC906 tüvedega (Joonis 11).



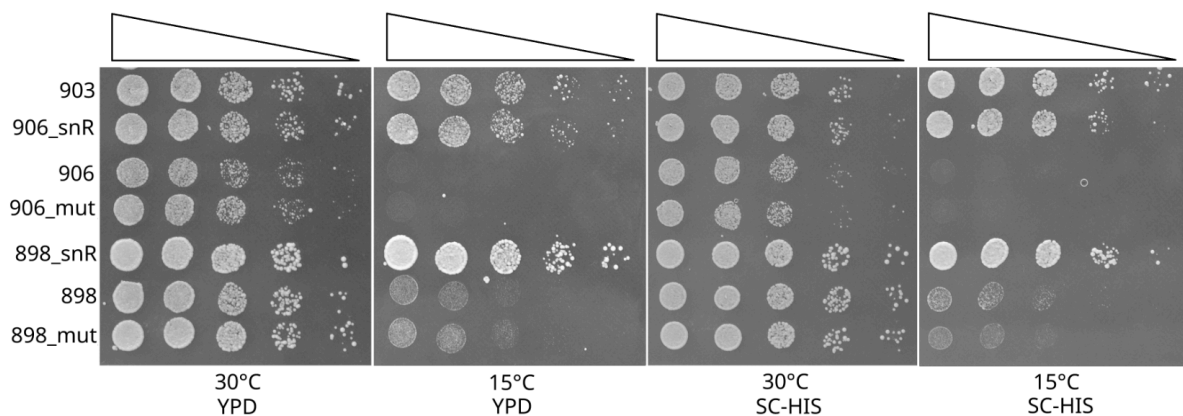
**Joonis 11. Tilk-külv analüüs temperatuuridel 30°C ja 35°C.** Joonisel on näha temperatuuridel 30°C ja 35°C kasvatatud tüved YPD ja SC-HIS söötmetel (Tabel 2). Tilk-külv analüüsi lahjendused liiguvad vasakult paremale kangemast lahjemaks.

Temperatuuril 20°C avaldub TYSC906\_mut tüvel külmatundlik fenotüüp. Suurt kasvu erinevust on näha TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut tüvedes (Joonis 12). Sellest saab järeldada, et konserveerunud modifikatsioonidel on suur mõju raku külmatundlikkuse vähendamisele. Võrreldes TYSC906\_mut tüve ja TYSC906 tüve, on näha väikest kasvu erinevust (Joonis 12). Kuna TYSC906\_mut tüvi sisaldab ainult mittekonserveerunud modifikatsioone, siis sellest saab järeldada, et isegi nende olemasolul on väike positiivne mõju raku külmatundliku fenotüübi parandamisel. pRS413\_snR plasmide sisaldavates TYSC906\_snR ja TYSC898\_snR tüvedes on näha paremat kasvu, võrreldes vähem modifitseeritud TYSC906, TYSC906\_mut, TYSC898 ja TYSC898\_mut tüvedega (Joonis 12). TYSC898 baasil tehtud tüved TYSC898\_snR ja TYSC898\_mut kasvavad sellel temperatuuril paremini, kui TYSC906, TYSC906\_snR ja TYSC906\_mut tüved (Joonis 13). Kuna TYSC898 ja TYSC906 erinevus seisneb ühes modifikatsioonis, siis sellest saab järeldada, et metüleerimine positsioonis m<sup>5</sup>C2870 omab külmataluvusel olulist rolli.



**Joonis 12. Tilk-külv analüüs temperatuuridel 30°C ja 20°C.** Joonisel on näha temperatuuridel 30°C ja 20°C kasvatatud tüved YPD ja SC-HIS söötmetel (Tabel 2). Tilk-külv analüüsi lahjendused liiguvad vasakult paremale kangemast lahjemaks.

Temperatuuril 15°C kasvanud tüvedes on näha külmatundlikkuse fenotüübi võimendumist (Joonis 13). TYSC906\_mut ja TY898\_mut tüvede kasv on väga aeglane võrreldes TYSC906\_snR ja TY898\_snR tüvedega (Joonis 13). See tulemus kinnitab, et konserveerunud modifikatsioonidel on oluline roll külmatundliku fenotüübi tekkimisel. TYSC906 ja TYSC906\_mut tüved ei suuda kasvada temperatuuril 15°C (Joonis 13). Sellest saab järeldada, et mittekonserveerunud modifikatsioonid ei suuda parandada külmatundlikku fenotüüpi temperatuuril 15°C. pRS413\_snR plasmiid päästab tüvede TYSC906\_snR ja TYSC898\_snR kasvu võrreldes TYSC906 ja TYSC898 tüvedega (Joonis 13). pRS413\_snR plasmiid taastab kuus PTC modifikatsiooni, mis aitavad külmast tuleneva stressiga tegeleda. Erinevust on näha tüvede TYSC906\_snR ja TYSC898\_snR tüvede kasvus (Joonis 13). See on tingitud modifikatsioonist m<sup>5</sup>C2870, millel tundub olevat väga oluline roll külmatundliku fenotüübi kujunemisel.



**Joonis 13. Tilk-külv analüüs temperatuuridel 30°C ja 15°C.** Joonisel on näha temperatuuridel 30°C ja 15°C kasvatatud tüved YPD ja SC-HIS söötmetel (Tabel 2). Tilk-külv analüüsi lahjendused liiguvad vasakult paremale kangemast lahjemaks.

Konstrueeritud tüvede kasvu ja külmatundlikkust võrreldi kahel erineval söötmel ja neljal erineval temperatuuril (Joonis 14). TYSC906<sub>mut</sub> ja TYSC898<sub>mut</sub> tüved kasvavad igal temperatuuril nõrgemini kui TYSC906<sub>snR</sub> ja TYSC898<sub>snR</sub> tüved (Joonis 14). Kuna mutantsetes tüvedes pRS413<sub>mut</sub> plasmiid ekspresseerib ainult mittekonserveerunud modifikatsioone: Um2724, Am420 ja Ψ2880, siis sellest saab järeldada, et konserveerunud modifikatsioonid ribosoomi PTC-s on tähtsamad kui mittekonserveerunud modifikatsioonid. Konserveerunud modifikatsioonidel on suurem tähtsus külmatundliku fenotüübi kujunemisel. Konstrueeritud pRS413<sub>snR</sub> plasmiid taastab kuus snoRNA-de poolt juhitud modifikatsiooni: Um2921, Um2724, Gm2619, Am420, Ψ2880 ja Ψ2826. Seetõttu on näha ka TYSC906<sub>snR</sub> ja TYSC898<sub>snR</sub> tüvedes paremat kasvu, kui TYSC906<sub>mut</sub> ja TYSC898<sub>mut</sub> tüvedes (Joonis 14). TYSC898 baasil konstrueeritud tüved kasvasid antud tingimustes paremini, kui TYSC906 baasil konstrueeritud tüved (Joonis 14). Nende kahe pärmii tüve modifikatsioonimustri erinevus seisneb ühes konserveerunud modifikatsioonis – m<sup>5</sup>C2870. Vaadatud modifikatsioonidest tundub m<sup>5</sup>C2870 olevat oluline roll külmatundliku fenotüübi kujunemisel.

## KOKKUVÕTE

Ribosomaalse RNA modifikatsioonidel on suur roll ribosoomi efektiivsuse optimeerimisel. rRNA-d modifitseerivad väikesed tuumakese RNA-d ehk snoRNA-d. Kõige sagedasemad modifikatsioonid on riboosi 2'-O metülatsioonid ja uridiinide isomeriseerimine pseudouridiinideks. Nende modifikatsioonide teostamiseks on vaja, et *C/D box* snoRNA-d ja *H/ACA box* snoRNA-d paarduksid komplementaarselt sihtmärk rRNA järjestusega.

Varasemalt on näidatud, et ribosoomi peptidültransferaasi piirkonna modifikatsioonid on pärmirakkudele tähtsad. Modifikatsioonide: m<sup>5</sup>C2870, Um2921, Gm2922, Um2724, Gm2619, Ψ2880, Ψ2826 ja Am420 deletsioonidega pagaripärmi tüve generatsiooniaeg on kolm korda pikem kui metsiktüüpi pärmil, lisaks esineb ka vähem aktiivselt transleerivaid ribosoomi ning seetõttu on globaalne translatsioon vähenenud võrreldes metsiktüüpi pärmiga. Modifikatsioonideta tüvel esineb ka külmatundlikkus temperatuuridel 20°C ja 15°C. Neid modifikatsioone juhivad snoRNA-d snR34, snR52 ja snR67 ning kaks metültransferaasi Nop2 ja Spb1.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida katsesüsteem, mis võimaldaks täpsemalt keskenduda kindlate modifikatsioonide olulisuse väljaselgitamiseks pagaripärmi rRNA-s. Enamus snoRNA-d juhivad kahte modifikatsiooni, mis muudab deletsioonide kaudu modifikatsiooni mõju väljaselgitamise keeruliseks. Käesoleva töö käigus konstrueeriti pagaripärmi tüvi, millest on puudu ainult evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonid (Ψ2826, Um2921, Gm2619, m<sup>5</sup>C2870), et hinnata vaid nende rRNA modifikatsioonide puudumise mõju rakkude temperatuuritundlikkusele.

Käesoleva töö käigus kinnitati, et konserveerunud modifikatsioonide puudumine tekitab külmatundliku fenotüübi. Eriti oluliseks PTC modifikatsiooniks tundub olevat m<sup>5</sup>C2870, seda positsiooni modifitseerib metültransferaas Nop2. snoRNA-de poolt juhitud konserveerunud modifikatsioonid (Ψ2826, Um2921, Gm2619) leevendavad külmatundlikkust. Mittekonserveerunud modifikatsioonidel (Um2724, Am420 ja Ψ2880) on väike mõju temperatuuritundliku fenotüübi tekkimisel.

# **Temperature sensitivity affected by evolutionarily conserved rRNA modifications in the peptidyl transferase center of budding yeast ribosomes**

Ronald Varik

## **SUMMARY**

All proteins are synthesised by ribosomes. The eukaryotic ribosome consists of two subunits, the small 40S subunit and the large 60S subunit. In budding yeast these subunits are made from 18S, 25S, 5,8S and 5S rRNAs and 79 ribosomal proteins.

Ribosomal RNA is heavily modified. These modifications are orchestrated by small nucleolar RNA or snoRNA. It is thought that modifications in functional regions of the ribosome are crucial for optimising the efficiency of the ribosome. The two main types of snoRNAs are C/D box and H/ACA box snoRNAs. They are responsible for ribose 2'-O methylations and pseudouridylations respectively. These snoRNAs guide chemical modifications in the rRNA by pairing with the target sequence.

Previous studies have shown that modifications in close proximity of the peptidyl transferase center of the 60S ribosomal subunit have dire effects on global translation, generation time and cold sensitivity. The missing modifications responsible for this phenotype are: m<sup>5</sup>C2870, Um2921, Gm2922, Um2724, Gm2619, Ψ2880, Ψ2826 and Am420. Out of these eight modifications four are evolutionarily conserved: Gm2619, Ψ2826, Um2921 and m<sup>5</sup>C2870.

The focus of this study was to observe how non-conserved rRNA modifications affect the cold sensitivity in budding yeast. For that purpose a strain of yeast was created that only had non-conserved rRNA modifications: Um2724, Ψ2826 and Am420.

The growth of the constructed strain was analysed at temperatures of 30°C, 35°C, 20°C and 15°C. The results show that conserved rRNA modifications play a vital role in cold tolerance. Non-conserved modifications do not save the cold sensitive phenotype. Modification m<sup>5</sup>C2870 is carried out by methyltransferase Nop2 and seems to be essential for cold tolerance. The results indicate that these four evolutionarily conserved modifications (Gm2619, Ψ2826, Um2921 and m<sup>5</sup>C2870) are really important and are conserved for a reason.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Margus Leppikut, kes õpetas mind nii laboris, kui ka lõputöö kirjutamisel. Olen väga tänulik, et Margus jaksas minuga ka hilistel õhtutundidel tegeleda. Tänaksin ka oma teist juhendajat Tiina Tamme, kes aitas külmatundlikkuse katsetel tulemusi analüüsida ja kelle näpunäited aitasid lõputöö vormistamisel kaasa. Soovin tänada ka teisi Molekulaarbioloogia õppetooli inimesi, kes tutvustasid mulle laborit ja andsid positiivset julgustust.

Lisaks sooviksin tänada moraalse toe eest oma sõpru ja pere, eriti Kirke Linnot ja Piret Pungi.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., & Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*, 497(7447), 80–85. <https://doi.org/10.1038/nature12104>
- Bachellerie, J. P., Cavallé, J., & Hüttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie*, 84(8), 775–790. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01402-5](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01402-5)
- Baudin-Baillieu, A., & Namy, O. (2021). *Saccharomyces cerevisiae*, a Powerful Model for Studying rRNA Modifications and Their Effects on Translation Fidelity. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7419. <https://doi.org/10.3390/ijms22147419>
- 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 (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6008), 1203–1209. <https://doi.org/10.1126/science.1194294>
- de Beus, E., Brockenbrough, J. S., Hong, B., & Aris, J. P. (1994). Yeast NOP2 encodes an essential nucleolar protein with homology to a human proliferation marker. *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 2), 1799–1813. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1799>
- Bonnerot, C., Pintard, L., & Lutfalla, G. (2003). Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Molecular cell*, 12(5), 1309–1315. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00435-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00435-0)
- Bratkovič, T., Božič, J., & Rogelj, B. (2020). Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic acids research*, 48(4), 1627–1651. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1140>
- Cheng, J., Lau, B., La Venuta, G., Ameismeier, M., Berninghausen, O., Hurt, E., & Beckmann, R. (2020). 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6510), 1470–1476. <https://doi.org/10.1126/science.abb4119>

Cruz, V.E., Weirich, C.S., Peddada, N. *et al.* The DEAD-box ATPase Dbp10/DDX54 initiates peptidyl transferase center formation during 60S ribosome biogenesis. *Nat Commun* 15, 3296 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47616-7>

Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02109-6)

Huang, Zh., Du, Yp., Wen, Jt. *et al.* snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell Death Discov.* 8, 259 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01056-8>

Joiret, M., Kerff, F., Rapino, F., Close, P., & Geris, L. (2022). Ribosome exit tunnel electrostatics. *Physical review. E*, 105(1-1), 014409. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.105.014409>

Justice, M. C., Hsu, M. J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D., & Nielsen, J. (1998). Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), 3148–3151. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3148>

Kiss T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO journal*, 20(14), 3617–3622. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>

Kressler, D., Rojo, M., Linder, P., & Cruz, J. (1999). Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 27(23), 4598–4608. <https://doi.org/10.1093/nar/27.23.4598>

Lafontaine, D., Tollervy, D. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 514–520 (2001). <https://doi.org/10.1038/35080045>

Leppik, M., Pomerants, L., Põldes, A., Mihkelson, P., Remme, J., & Tamm, T. (2024). Loss of Conserved rRNA Modifications in the Peptidyl Transferase Center Leads to Diminished Protein Synthesis and Cell Growth in Budding Yeast. *International journal of molecular sciences*, 25(10), 5194. <https://doi.org/10.3390/ijms25105194>

Lõoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>

- Lykke-Andersen, S., Ardal, B. K., Hollensen, A. K., Damgaard, C. K., & Jensen, T. H. (2018). Box C/D snoRNP Autoregulation by a cis-Acting snoRNA in the NOP56 Pre-mRNA. *Molecular cell*, 72(1), 99–111.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.017>
- Maden, B. E., & Hughes, J. M. (1997). Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma*, 105(7-8), 391–400. <https://doi.org/10.1007/BF02510475>
- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., & Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), 6580–6587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210357200>
- Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(3), 209–220. <https://doi.org/10.1038/nrm2124>
- Mitterer, V., Hamze, H., Kunowska, N., Stelzl, U., Henras, A. K., & Hurt, E. (2024). The RNA helicase Dbp10 coordinates assembly factor association with PTC maturation during ribosome biogenesis. *Nucleic acids research*, 52(4), 1975–1987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1206>
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr, Tarry, M. J., Carter, A. P., & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 897–902. <https://doi.org/10.1126/science.1060612>
- Ontiveros, R. J., Stoute, J., & Liu, K. F. (2019). The chemical diversity of RNA modifications. *The Biochemical journal*, 476(8), 1227–1245. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180445>
- Pelletier, J., Thomas, G. & Volarević, S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* 18, 51–63 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.104>
- Ramakrishnan V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4), 557–572. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00619-0)

- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2292–2302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-10>
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., & Hurt, E. C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *The EMBO journal*, 8(13), 4015–4024. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08584.x>
- Sharma, S., & Entian, K. D. (2022). Chemical Modifications of Ribosomal RNA. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2533, 149–166. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9_9)
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.1.19>
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., & Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*, 107(3), 373–386. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00539-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00539-6)
- Tamm, T., Kisly, I., & Remme, J. (2019). Functional Interactions of Ribosomal Intersubunit Bridges in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 213(4), 1329–1339. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302777>
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of cell science*, 126(Pt 21), 4815–4821. <https://doi.org/10.1242/jcs.111948>
- Wang, J., Shin, B. S., Alvarado, C., Kim, J. R., Bohlen, J., Dever, T. E., & Puglisi, J. D. (2022). Rapid 40S scanning and its regulation by mRNA structure during eukaryotic translation initiation. *Cell*, 185(24), 4474–4487.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.005>

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

*Double Digest Calculator.*  
<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>. Kasutatud 16.10.24.

*Integrated DNA Technologies* <https://eu.idtdna.com/page>. 5' 6-FAM (*Fluorescein*)  
<https://eu.idtdna.com/site/catalog/modifications/product/1108>. Kasutatud 26.05.25.

*Protein Data Bank Chemical Sketch Tool* <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>. Kasutatud 22.04.25.

Thermo Fisher DH5α *E.coli* infoleht.  
<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>. Kasutatud 03.02.25.

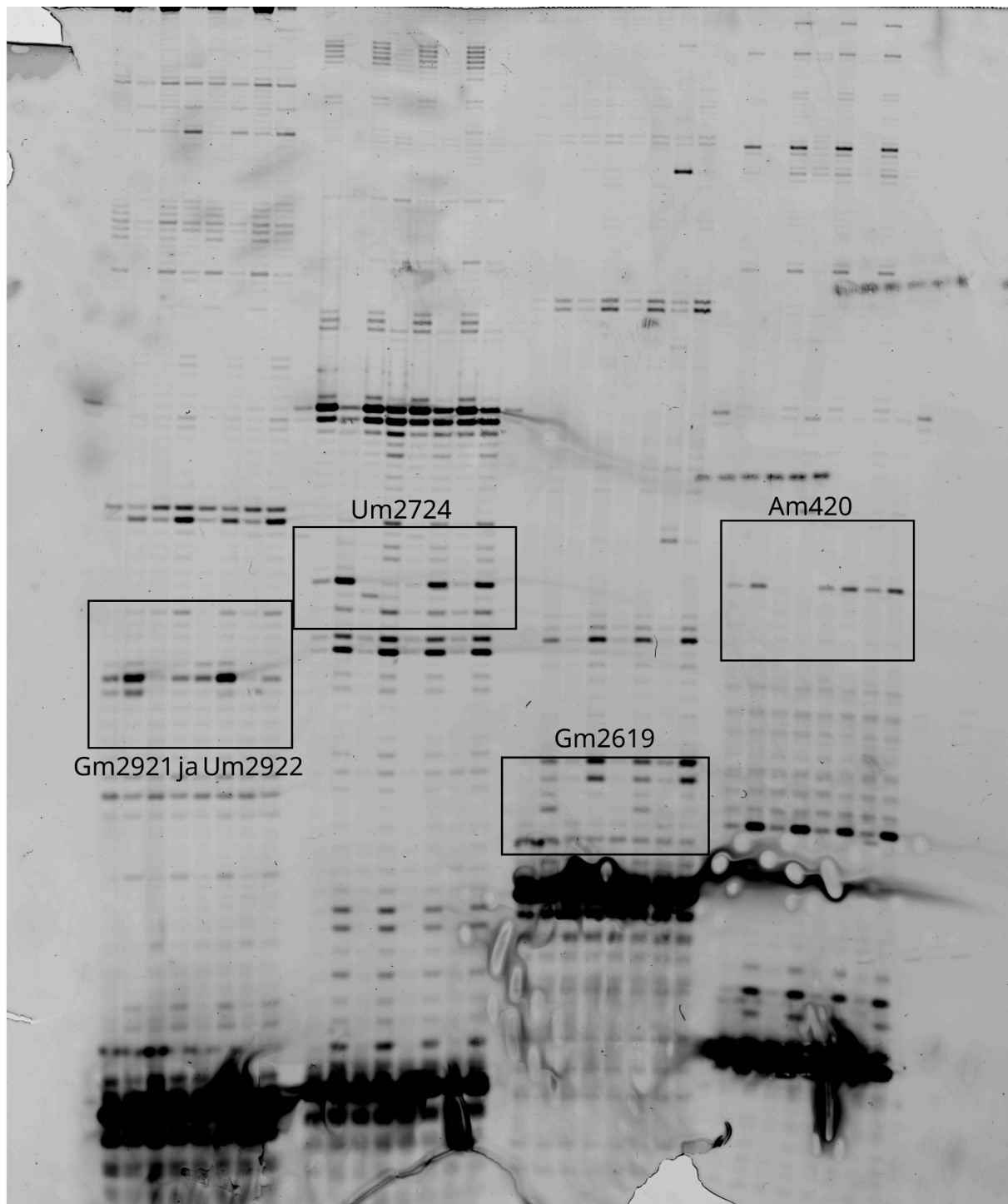
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1974. <https://www.nobelprize.org/>. Nobel Prize Outreach 2025. Sun. 9 Mar 2025.  
<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1974/summary/>. Kasutatud 09.03.25.

The Nobel Prize in Chemistry 2009. <https://www.nobelprize.org/>. Nobel Prize Outreach 2025. Sun. 9 Mar 2025. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2009/summary/>. Kasutatud 09.03.25.

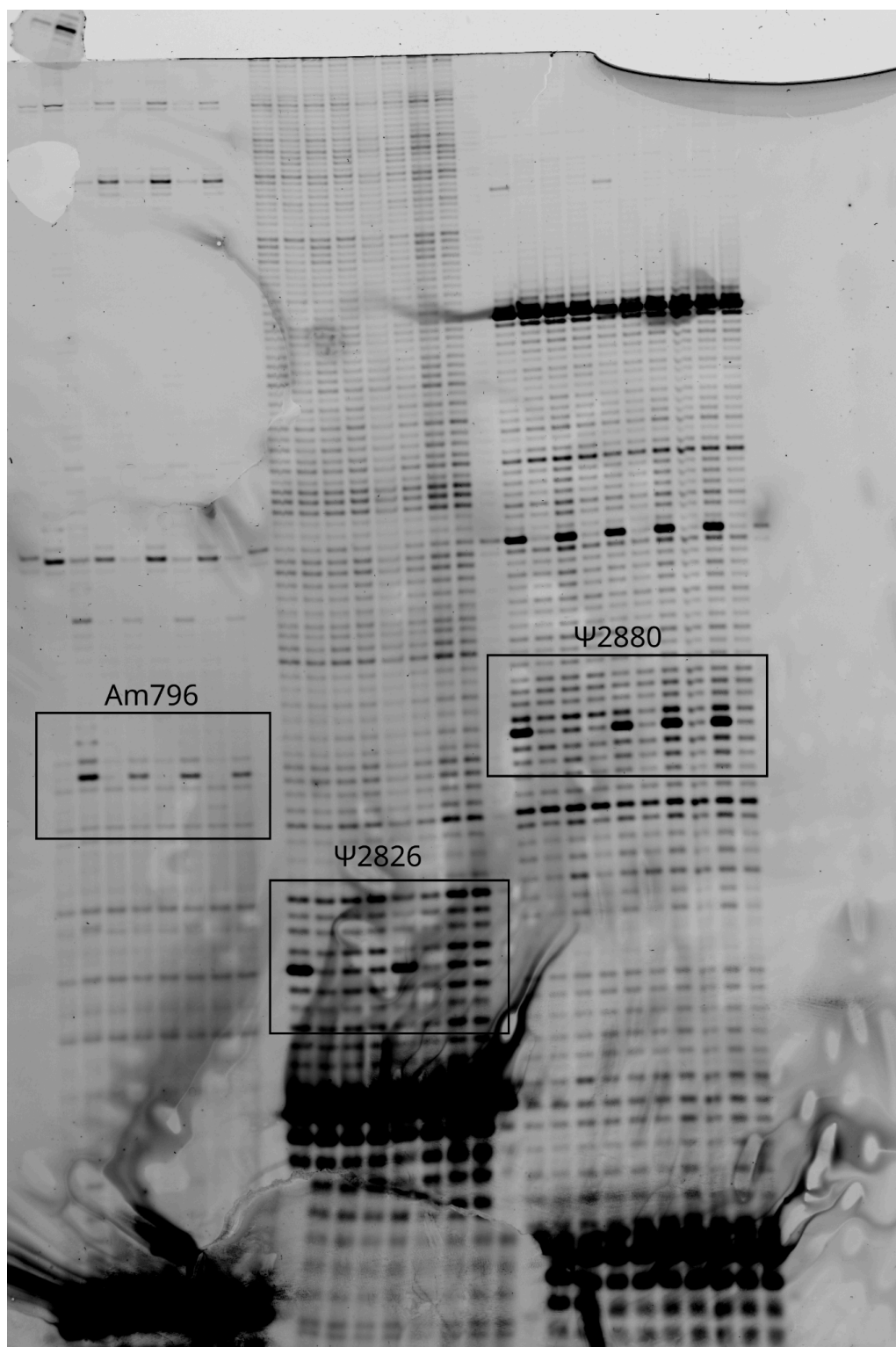
Yeastgenome.org <https://www.yeastgenome.org/>. Kasutatud 27.06.2024, 19.11.2024, 26.11.2024, 04.02.2024, 13.05.25.

## LISAD

### Lisa 1



**Joonis 14. Töötlemata poliakrüülamiid geel.** Joonisel on näha praimer ekstensiooni tulemusi, nukleotiidid on eraldatud üksteisest 7% poliakrüülamiid geelil ning visualiseeritud laseriga fluorestseeruva märgise ergastumisel. Positsioonid vasakult paremale – Gm2921 ja Um2922, Um2724, Gm2619 ning Am420.



**Joonis 15. Töötlemata polüakrüülamiid geel.** Joonisel on näha praimer ekstensiooni tulemusi, nukleotiidid on eraldatud üksteisest 7% polüakrüülamiid geelil ning visualiseeritud laseriga fluorestseeruva märgise ergastumisel. Positsioonid vasakult paremale – Am796, Ψ2826 ja Ψ2880.

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Ronald Varik,

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

**Pagaripärmi ribosoomi peptidüültransferaasi keskuse piirkonnas paiknevate  
evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonide mõju  
temperatuuritundlikkusele,**

mille juhendajad on Margus Leppik, PhD ja Prof. Tiina Tamm, PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i 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.

Ronald Varik

29.05.2025