

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

***Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 roll  
translatsiooni initsiatsioonis peale glükoosi puudumise stressi.**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Evgeniy Brik

Juhendajad: MSc Ivan Kisly

PhD Tiina Tamm

TARTU 2017

## INFOLEHT

### ***Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 roll translatsiooni initsiatsioonis peale glükoosi puudumise stressi.**

Ribosoom on ribosüüm, mis viib läbi translatsiooni. *S. cerevisiae* ribosoom koosneb 40S ja 60S subühikutest ning nad interakteeruvad omavahel 17 subühikute vaheliste sildade kaudu. eB12 ja eB13 on kaks sarnase arhitektuuriga eukarüoodi spetsiifilised subühikute vahelised sillad.

Glükoos on peamine energiaallikas pagaripärmile. Translatsioon on energiakulukas protsess, seega glükoosi puudumine on stress rakkude jaoks ning nad vähendavad oma energia tarbimist eelkõige translatsiooni mahasurumisega. See on pöörduv protsess, kuna translatsioon taastub glükoosi lisamisel söötmesse. *S. cerevisiae* rakkudes on kolm glükoosiga seotud signaalirada, mis mõjuvad translatsiooni. Ei ole teada, milliste faktorite abil toimub signaaliülekanne translatsiooni masinavärgile. Kuna sillad eB12 ning eB13 paiknevad ribosoomi välispinnal, siis oli bakalaureusetöö eesmärgiks analüüsida täpsemalt ribosoomi eB12 ja eB13 sildade olulisust glükoosi puudumise stressi järgsel translatsiooni taastumisel *S. cerevisiae* rakkudes.

Märksõnad: pagaripärm, stress, translatsioon, ribosoom, subühikute vahelised sillad.

CERCS kood: P320 (Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees), P330 (Bioenergeetika).

### **Role of *Saccharomyces cerevisiae* ribosome eukaryote specific bridges eB12 and eB13 in translation initiation after glucose depletion stress.**

Ribosome is a ribozyme, which carries out translation. *S. cerevisiae* ribosome is composed of 40S and 60S subunits, which interact with each other by 17 intersubunit bridges. Two of them, eukaryote specific intersubunit bridges eB12 and eB13, have similar architecture.

Glucose is a main energy source for baker's yeast. Translation is an energy consuming process, so in the absence of glucose cells reduce their energy consumption by suppression of the translation. This is a reversible process and translation restores with glucose addition to the growth medium. *S. cerevisiae* cells have three signaling pathways related to glucose, which act on translation. It is not known which factors transduce signals to the translation machinery. Since eB12 and eB13 bridges are located on the surface of the ribosome, the aim of this study was to analyse the involvement of these bridges in translation recovery after glucose depletion stress.

Keywords: baker's yeast, stress, translation, ribosome, intersubunit bridges.

CERCS code: P320 (Nucleic acids, protein synthesis), P330 (Bioenergetics).

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Ribosoomi üldiseloomustus.....	6
1.1.1 <i>S. cerevisiae</i> ribosoomi 40S subühik.....	7
1.1.2 <i>S. cerevisiae</i> ribosoomi 60S subühik.....	8
1.2 Subühikute vahelised sillad .....	10
1.3 Eukariöodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13 .....	11
1.3.1 Valk eL19 ja seda kodeerivad geenid.....	14
1.3.2 Valk eL24 ja seda kodeerivad geenid.....	15
1.4 Glükoosi mõju translatsioonile.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	21
2.1 Töö eesmärgid .....	21
2.2 Materjal ja meetoodika.....	21
2.2.1 Ribosoomide profiilide analüüs.....	23
2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> rakkude transformatsioon.....	24
2.2.3 Plasmidi säilimise analüüs.....	24
2.3 Tulemused .....	25
2.3.1 Ribosoomide profiilide analüüs WT rakkudes glükoosi puudumisel.....	25
2.3.2 Ribosoomide profiilide analüüs WT rakkudes peale glükoosi lisamist .....	27
2.3.3 Ribosoomide profiilide analüüs mutantsete ribosoomidega rakkudes .....	28
2.3.4 Plasmidi säilimise analüüs.....	36
2.4 Arutelu .....	36
KOKKUVÕTE .....	40
SUMMARY .....	41
TÄNUSÕNAD .....	44
KASUTATUD KIRJANDUS .....	45
LIHTLITSENS .....	49

## KASUTATUD LÜHENDID

4E-BP – eIF4E siduv valk (ingl. *eIF4E binding protein*)

cAPK – cAMP-sõltuv valgukinaas (ingl. *cAMP-dependent protein kinase*)

CFU – kolooniat formeeruv ühik (ingl. *colony forming unit*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DTT – ditiotreitool

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

eIF3 – eukarüoodi initsiatsioonifaktor 3 (ingl. *eukaryotic initiation factor 3*)

eIF4A – eukarüoodi initsiatsioonifaktor 4A (ingl. *eukaryotic initiation factor 4A*)

eIF4E – eukarüoodi initsiatsioonifaktor 4E (ingl. *eukaryotic initiation factor 4E*)

eIF4G – eukarüoodi initsiatsioonifaktor 4G (ingl. *eukaryotic initiation factor 4G*)

ES – lisasegment (ingl. *expansion segment*)

HXT – heksoosi transporter (ingl. *hexose transporter*)

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

PTC – peptidüültransferaasne tsepter (ingl. *peptidyl transferase center*)

SC – sünteetiline täissööde (ingl. *synthetic complete*)

SC-Trp – sünteetiline täissööde ilma trüptofaanita (ingl. *synthetic complete without tryptophan*)

uORF – ülesvoolu asuv avatud lugamisraam (ingl. *upstream open reading frame*)

UTR – mittetransleeriv regioon (ingl. *untranslated region*)

WT – metsiktüüp (ingl. *wild type*)

YP – rikas sööde ilma glükoosita (ingl. *yeast extract + peptone*)

YPD – rikas sööde glükoosiga (ingl. *yeast extract + peptone + dextrose*)

## SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribosüüm, mis koosneb ribosomaalsetest RNA molekulitest (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud) ning viib läbi translatsiooni. Translatsioon on eluks hädavajalik protsess, mis esineb kõikides organismides. Ribosoomi katalüütilises osas on universaalselt konserveerunud põhistruktuur. Prokarüootid ning eukarüootid erinevad teineteisest ribosoomide massi ja struktuuri poolest, sest eukarüooti ribosoomi koosseisus on eukarüooti spetsiifilised struktuurid, mis katavad ribosoomi põhistruktuuri.

Pagaripärmi *S. cerevisiae* ribosoom koosneb 40S ja 60S subühikutest, mis translatsiooni käigus interakteeruvad omavahel subühikute vaheliste sildade kaudu. Pagaripärmi ribosoomis on 12 konserveerunud silda ning 5 eukarüooti spetsiifilist silda. Eukarüooti spetsiifilised sillad eB12 ja eB13 on sarnase arhitektuuriga. Nende sildade põhistruktuuri moodustavad eukarüooti spetsiifiliste r-valkude eL19 ja eL24 pikad C-terminaalsed  $\alpha$ -heeliksid. Arvatakse, et sillad eB12 ja eB13 mängivad rolli translatsiooni initsiatsioonil.

Glükoos on peamine pagaripärmi rakkude energiaallikas ning selle puudumisel peavad rakud kiiresti vähendada oma energia tarbimist. Translatsioon on energiakulukas protsess, seega glükoosi puudumisel suruvad rakud kiiresti translatsiooni maha. See on pöörduv protsess - glükoosi lisamisel söötmesse translatsioon rakkudes taastub.

Käesoleva töö põhieesmärgiks on uurida *S. cerevisiae* ribosoomis olevate eukarüooti spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 rolli translatsiooni taastumisel pärast glükoosi puudumise stressi. Töö esimeses osas analüüsiti translatsiooni mahasurumist metsiktüübi ja mutantsete ribosoomidega rakkudes glükoosi puudumisel. Töö teises osas uuriti translatsiooni taastumist rakkudes, mille ribosoomides puudus kas eL24 valk, eB12 sild või eB13 sild.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

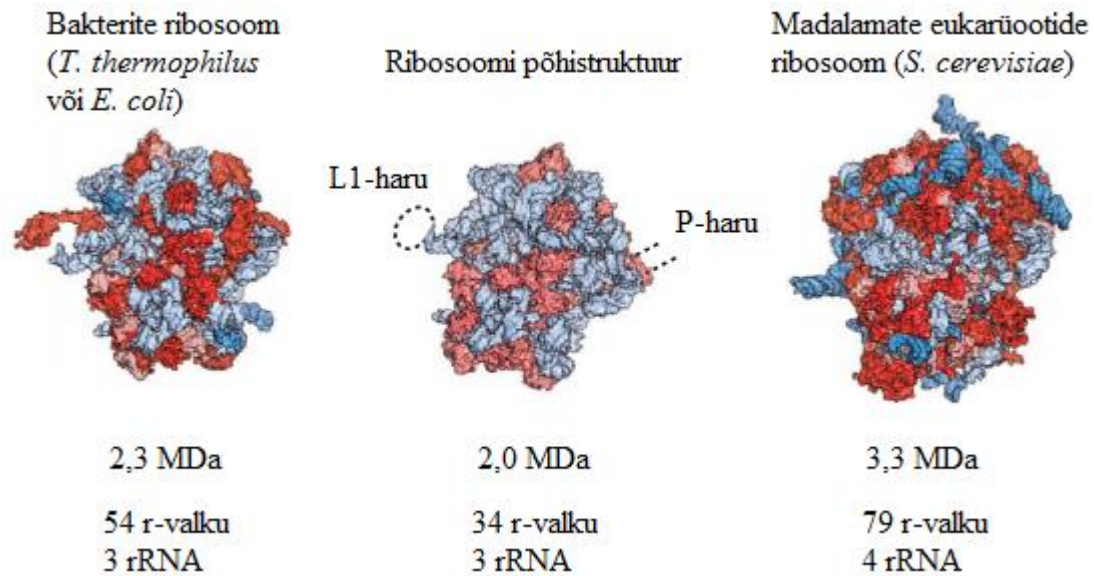
## 1.1 Ribosoomi üldiseloostus

Ribosoom on ribosüüm, mis koosneb ribosomaalsetest RNA molekulitest (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud). Ribosoomid esinevad kõikide organismide rakkudes ning viivad läbi translatsiooni: polüpeptiidahela järjestikust sünteesi aminohapetest, mis on määratud matriits RNA (mRNA) nukleotiidjärjestusega. Iga aminohape polüpeptiidahelas kodeeritakse mRNA nukleotiidide tripletiga, mida nimetatakse koodoniks.

Ribosoomi põhistruktuuri (ingl. *common core*) moodustuvad konserveerunud rRNA ahelad ja r-valgud. Põhistruktuuris paiknevad translatsiooni jaoks olulisemad osad: dekodeerimistsenter (ingl. *decoding center*), peptidüültransferaasne tsepter (ingl. *peptidyl transferase center, PTC*) ja kolme transport-RNA-d (tRNA) siduvad saidid: A, P ning E saidid (Smith jt., 2008). Prokariidid ning eukariidid erinevad teineteisest ribosoomide massi ja struktuuri poolest (joonis 1). Ribosoomide mass varieerub 2,3 MDa bakterites kuni 4,3 MDa kõrgemates eukariootides (Melnikov jt., 2012). Eukariooti ribosoom on ligikaudu 1,4 korda suurem kui bakteri ribosoom, kuna eukariooti ribosoomi koosseisus on eukariooti spetsiifilised valgud, polüpeptiidsed lisadomeenid ja rRNA lisasegendid (ingl. *expansion segments, ES*). Eukariooti spetsiifilised struktuurid, mille mass on umbes 1,35 MDa katavad ribosoomi põhistruktuuri (Ben-Shem jt., 2011).

Ribosoomide suurust hinnatakse sedimentatsioonikoefitsientiga. Eubakterite ribosoomi sedimentatsioonikoefitsient on umbes 70S (Taylor ja Storck, 1964). Eukariootidel, sealhulgas ka *S. cerevisiae*, ribosoomide sedimentatsiooni koefitsient on umbes 80S (De Ley, 1964). 70S ribosoom koosneb 30S väikesest subühikust ja 50S suurest subühikust. 80S ribosoom koosneb 40S väikesest subühikust ja 60S suurest subühikust. Sedimentatsioonikoefitsient sõltub rRNA ja r-valkude arvust ja pikkusest ning ribosoomide kolmedimensionaalsest kujust. Nendest faktoritest sõltub ka subühikute vaheliste kontaktide ehk subühikute vaheliste sildade arv ja iseloom.

Selles töös käsitleme pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi.

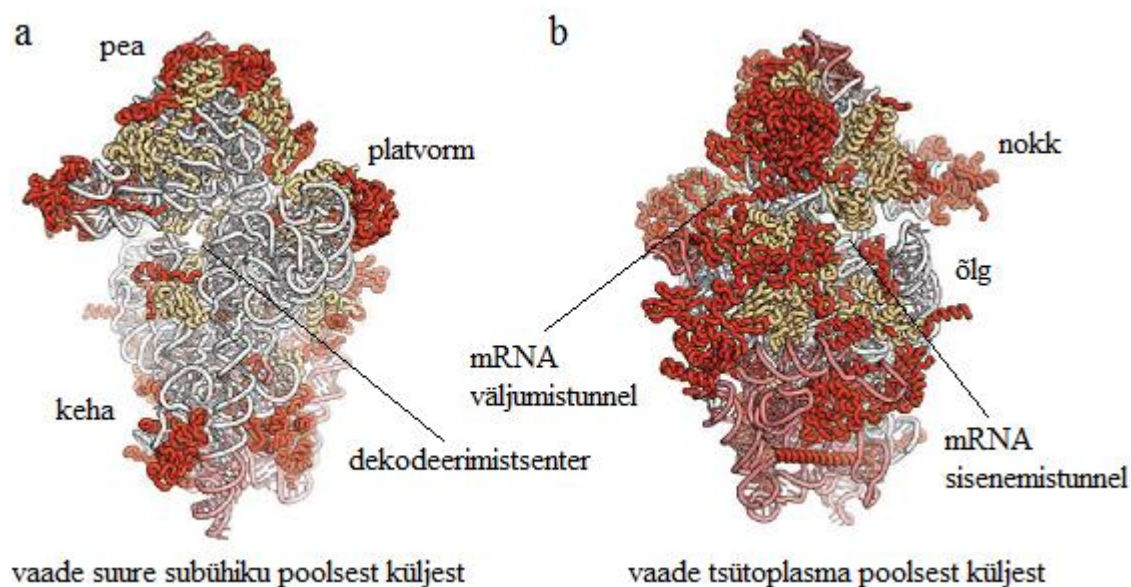


**Joonis 1. Bakterite ja madalamate eukarüootide ribosoomide võrdlus.** Konserveerunud rRNA järjestused on kujutatud helesiniselt, konserveerunud polüpeptiidsed osad - helepunaselt. Bakteri ja eukarüoodi spetsiifilised rRNA lisasegmenid ja polüpeptiidsed lisadomeenid on kujutatud vastavalt tumesiniselt ja tumepunaselt. Punktirjoontega on näidatud ribosoomi paindlikud harud. Joonis on muudetud Melnikov jt., 2012 järgi.

### 1.1.1 *S. cerevisiae* ribosoomi 40S subühik

*S. cerevisiae* ribosoomi 40S subühik koosneb ühest 18S rRNA molekulist ja 33 r-valgust (Ben-Shem jt., 2011). 40S subühiku 18 r-valku on eukarüoodi spetsiifilised, teistel valkudel esinevad eukarüoodi spetsiifilised lisadomeenid (Lecompte jt., 2002; Ben-Shem jt., 2011). Pagaripärmi 18S rRNA ahelas on 1798 nukleotiidi ning see sisaldab 10 eukarüoodi spetsiifilist lisasegmenti (Spahn jt., 2001; Ben-Shem jt., 2011). 40S subühikus, nagu selle bakteriaalses analoogis, eristatakse 5 struktuurset osa: pea (ingl. *head*), keha (ingl. *body*), platvorm (ingl. *platform*), nokk (ingl. *beak*) ja õlg (ingl. *shoulder*) (joonis 2) (Melnikov jt., 2012; Ben-Shem jt., 2011). Väikese subühiku peamiseks ülesanneks on dekodeerimine, mis toimub dekodeerimistsentris (joonis 2a). Dekodeerimise käigus valitakse see aminoatsüül-tRNA molekul, mille antikoodon on komplementaarne mRNA-s oleva koodoniga, mille tulemusena aminohappeid liidetakse kokku õiges järjekorras (Melnikov jt., 2012). mRNA liigub translatsiooni käigus ribosoomi sisse läbi sisenemistunneli, mis asub osade pea ja õlg vahel. Peale dekodeerimist, liigub mRNA

ribosoomist välja väljumistunneli kaudu, mis paikneb osade pea ja platvorm vahel (joonis 2b) (Yusupova jt., 2001).



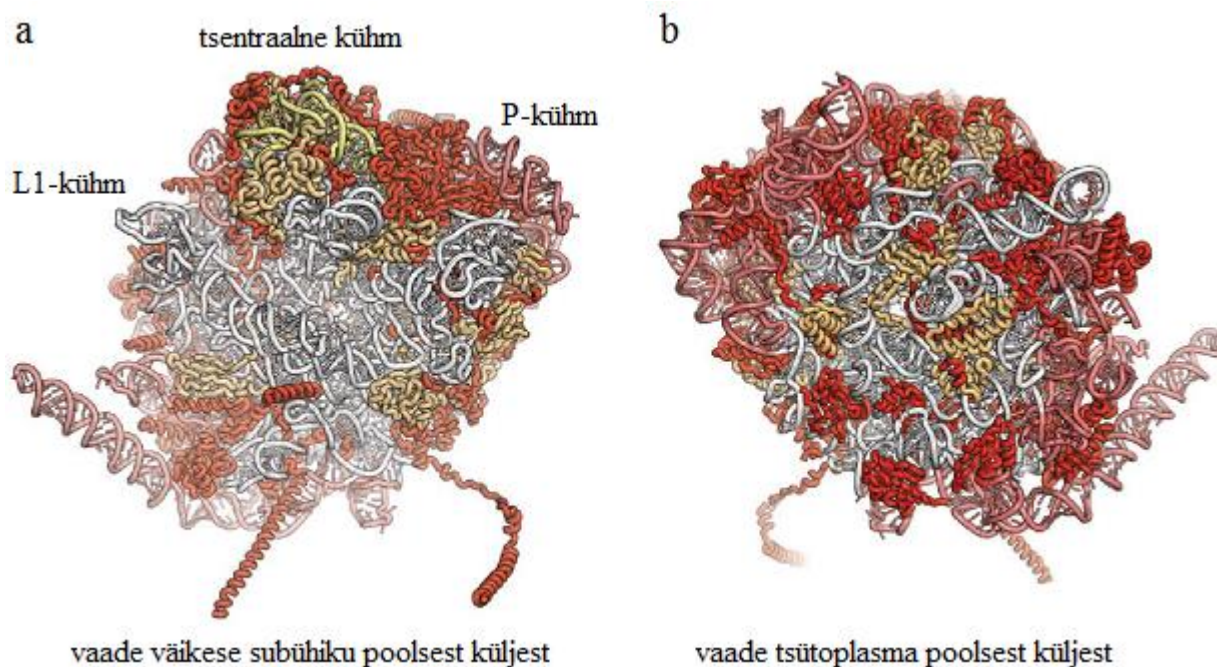
**Joonis 2. Pagaripärmi 40S subühiku struktuur.** Konserveerunud rRNA järjestused ja konserveerunud polüpeptiidsed domeenid on kujutatud vastavalt valgelt ja oranžilt. Eukariöodi spetsiifilised rRNA lisasegmendid ja polüpeptiidsed domeenid on kujutatud punaselt. Joonis on muudetud Melnikov jt., 2012 järgi.

### 1.1.2 *S. cerevisiae* ribosoomi 60S subühik

*S. cerevisiae* ribosoomi 60S subühik koosneb kolmest rRNA molekulist: 25S, 5,8S ja 5S (Ben-Shem jt., 2011). 25S rRNA ahelas on 3392 nukleotiidi, 5,8S rRNA ahelas on 158 nukleotiidi ja 5S rRNA ahelas on 121 nukleotiidi (Spahn jt., 2001). 60S subühiku koosseisus on 46 r-valku, millest 28 on eukariöodi spetsiifilised (Lecompte jt., 2002). Teistel r-alkudel on olemas eukariöodi spetsiifilised lisadomeenid (Ben-Shem jt., 2011). 60S subühik, sarnaselt bakteriaalse ribosoomi 50S subühikule, on kroonikujuline, millel eristatakse kolme osa: L1-kühm (ingl. *L1-stalk*), P-kühm (ingl. *P-stalk*) ja tsentraalne kühm (ingl. *central protuberance*) (joonis 3) (Melnikov jt., 2012; Ben-Shem jt., 2011; Armache jt., 2010). 50S subühikus on P-kühmu asemel nn. L7/L12-kühm (ingl. *L7/L12-stalk*) (Melnikov jt., 2012; Spahn jt., 2001).

Suure subühiku peamiseks ülesanneks on peptiidsideme moodustamine. Suur subühik sisaldab peptidüültransferaasset tsentrit, kolme tRNA-d siduvat saiti: A, P ning E saidid ja peptiidi

väljumistunnelit (Melnikov jt., 2012). Peptidüültransferaasne tsepter asub ribosoomi konserveerunud osas ja koosneb valdavalt rRNA-st (Melnikov jt., 2012). Peptiidsideme moodustumise hetkel atakeerib A saidis oleva aminoatsüül-tRNA molekuli  $\alpha$ -aminorühm karbonüülse süsiniku aatomit peptidüül-tRNA molekulis, mis asub P-saidis, pikendades peptiidi ühe aminohapejäagi võrra (Rodnina jt., 2007). Sünteesitav peptiid väljub ribosoomist peptiidi väljumistunneli kaudu. E saidis olev tRNA lahkub ribosoomist ning toimub translokatsioon – ribosoomi nihkumine mRNA-l ühe koodoni võrra edasi. Selle tulemusena satub A-saidis olev peptidüül-tRNA molekul ribosoomi P-saiti, deatsüleeritud tRNA satub E saiti ja ribosoom on valmis siduma järgmise aminoatsüül-tRNA molekuli vabanenud A saiti (Noller jt., 2002). Translokatsiooni käigus pöörlevad ribosoomi subühikud teineteise suhtes – eristatakse pre-translokatsioonilist ja post-translokatsioonilist konformatsiooni (Dunkle jt., 2011). Translokatsioon on oluline protsess. On näidatud, et subühikute omavahelise pöörde takistamine põhjustab translatsiooni seiskumist (Horan ja Noller, 2007).



**Joonis 3. Pagaripärmi 60S subühiku struktuur.** Konserveerunud rRNA järjestused ja konserveerunud polüpeptiidsed domeenid on kujutatud vastavalt valgelt ja oranžilt. Eukariöodi spetsiifilised rRNA lisasegendid ja polüpeptiidsed domeenid on kujutatud punaselt. Joonis on muudetud Melnikov jt., 2012 järgi.

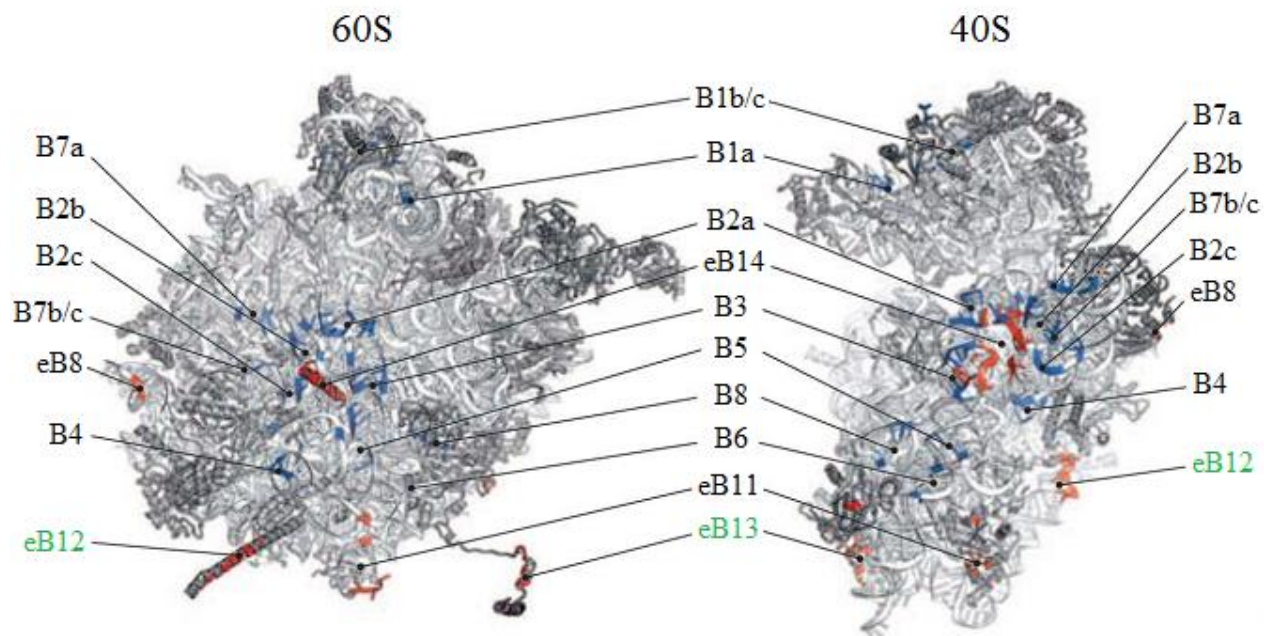
## 1.2 Subühikute vahelised sillad

80S ribosoomi moodustumiseks ja translatsiooni toimumiseks on vajalik subühikute vaheline interaktsioon. Selle interaktsiooni eest vastutavad subühikute vahelised sillad. Neid jaotatakse konserveerunud ja eukarüoodi spetsiifilisteks sildadeks (Spahn jt., 2001). Konserveerunud sillad esinevad nii prokarüootide kui ka eukarüootide ribosoomides, kuid eukarüoodi spetsiifilised sillad ei kuulu bakteri ribosoomi struktuuri. *S. cerevisiae* ribosoomis on 12 konserveerunud ning 5 eukarüoodi spetsiifilist silda (Yusupov jt., 2001; Ben-Shem jt., 2011) (joonis 4). Subühikute vahelised kontaktid, mis tekkivad sildade moodustumisel, saab ehituse poolest jaotada kolme klassi: rRNA-rRNA, rRNA-valk ning valk-valk kontaktid (Ben-Shem jt., 2011). Märkimisväärne osa konserveerunud sildadest sisaldab oma struktuuris rRNA-rRNA kontakte. Eukarüoodi spetsiifilised sillad sisaldavad ainult rRNA-valk või valk-valk kontakte (Ben-Shem jt., 2011). Kõik kontaktid subühikute vahelistes sildades on moodustunud ainult mittekovalentsete sidemetega (peamiselt vesiniksidemetega) rRNA molekulide ja r-valkude vahel. Valgu molekulid interakteeruvad teiste molekulidega nii aminohapete kõrvalahelate kui ka selgroo vahendusel. RNA molekulid omakorda interakteeruvad teiste molekulidega lämmastikaluste, fosfaatrühmade või riboos-selgroo kaudu (Ben-Shem jt., 2011). Kõik rRNA komponente sisaldavad sillad on moodustunud suure subühiku 25S rRNA või väike subühiku 18S rRNA osalusel. 5S ja 5,8S rRNA molekulid ei osale sildade moodustumisel (Ben-Shem jt., 2011).

Ainult rRNA-rRNA kontakte sisaldavad konserveerunud subühikute vahelised sillad on B2a, B2b, B2c, B3 ja B7a (joonis 4). Sillad B2a ja B3 asuvad ribosoomi pöörlemispunkti juures, kuid sillad B2b, B2c ja B7a asuvad ribosoomi põhistruktuuri perifeersemas alas. Konserveerunud rRNA-valk klassi subühikute vahelised sillad on B1a, B6, B7b/c ja B8 ning nad paiknevad ribosoomi põhistruktuuri perifeerias (Ben-Shem jt., 2011). Ainuke konserveerunud valk-valk klassi sild B1b/c asub samuti ribosoomi perifeereses alas (joonis 4). Konserveerunud sild B5 on huvitav selle poolest, et ta sisaldab nii rRNA-rRNA kui ka rRNA-valk klassi kontakte ning paikneb B8 silla läheduses. Erandiks on B4 sild, mis sisaldab kõiki kolme klassi kontakte (joonis 4) (Yusupov jt., 2001; Ben-Shem jt., 2011).

Eukarüoodi spetsiifilised sillad asuvad reeglina ribosoomi perifeerias, kus subühikute omavahelised pöörlemised translokatsiooni käigus põhjustavad märgatavaid nihkumisi (Ben-Shem jt., 2011). Täpsemalt, sild eB8 asub mRNA väljumistunneli läheduses, sild eB11 - väike subühiku keha juures, sillad eB12 ja eB13 paiknevad ribosoomi välispinnal (joonis 4). Ainsaks erandiks on sild eB14, mis asub dekodeerimistsentri juures ribosoomi pöörlemispunkti lähedal.

Eukariöodi spetsiifilistes sildades eB11 ja eB14 on ainult rRNA-valk klassi kontaktid. Sillad eB8, eB12 ja eB13 sisaldavad nii rRNA-valk kui ka valk-valk klassi kontakte (Ben-Shem jt., 2011).



**Joonis 4. Subühikute vaheliste sildade paiknemine pagaripärmi *S. cerevisiae* ribosoomi 60S subühikus (a) ja 40S subühikus (b).** Rohelisega on näidatud käesoleva töö jaoks olulised sillad eB12 ja eB13. Siniselt on tähistatud konserveerunud sillad, punaselt on tähistatud eukariöodi spetsiifilised sillad. Joonis on muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

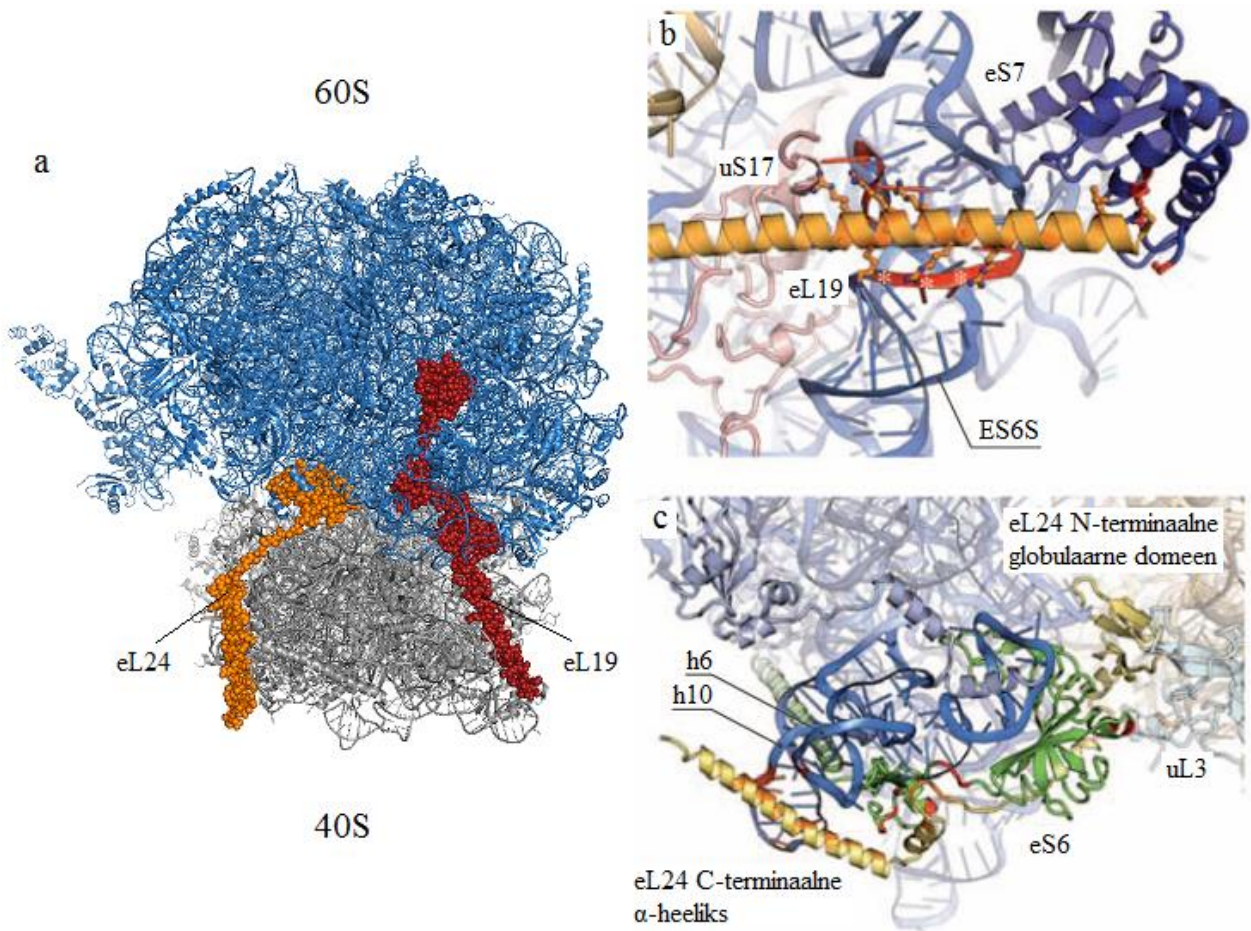
### 1.3 Eukariöodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13

Subühikute vahelised sillad eB12 ja eB13 on suhteliselt sarnase arhitektuuriga. Nende põhilisteks osadeks on eL19 ja eL24 valkude pikad  $\alpha$ -heeliksid, mis ulatuvad suurest subühikust väljapoole vastavalt E- ja A-saidi poolsetelt külgedelt (joonis 5a) (Ben-Shem jt., 2011). Mõlemad sillad on dünaamilised – sildasid moodustavate kontaktide arv ja iseloom erineb ribosoomi pre- ja post-translokatsioonilistes konformatsioonides.

Sild eB12 koosneb suure subühiku r-valgust eL19, väike subühiku r-valkudest uS17 ning eS7 ja 18S rRNA lisasegmendist ES6S (joonis 5b) (Ben-Shem jt., 2011). Silla eB12 põhistruktuuri moodustumisel osalevad eL19 valgu C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi Arg162, Arg163, Lys165, Asn166, Arg167, Arg170, Arg172, Arg173, Arg176 ja Lys180 kõrvalahelad, 18S rRNA ES6S

lisasegmeni 813, 815 ja 855 nukleotiidide lämmastikalused ning 814, 815, 850, 851, 852, 853 ja 854 nukleotiidide fosfaatid. Pre-translokatsioonilises konformatsioonis tekivad lisakontaktid eL19 valgu Asn156 ja Glu160 kõrvalahelate ning uS17 valgu Phe154 ja Phe156 osalemisel. Post-translokatsioonilises konformatsioonis kontaktid uS17 valguga kaovad ja tekkivad uued kontaktid, kus osalevad eL19 valgu Leu185 ja Ala189 selgrood ning eS7 valgu Arg39 ja Ser2 kõrvalahelad (Ben-Shem jt., 2011). On näidatud, et initsiatsioonifaktor eIF4G seondub 40S subühikuga mRNA väljumistunneli lähedal, mille juures paikneb silla eB12 põhiosa ES6S lisasegment (Marintchev jt., 2009). Seega on tõenäoline, et eL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks osaleb translatsiooni initsiatsiooni lõppstaadiumis (Ben-Shem jt., 2011).

Sild eB13 koosneb suure subühiku r- Valkudest eL24 ja uL3, väikese subühiku r-valgust eS6 ning 18S rRNA heeliksistest h6 ja h10 (joonis 5c) (Ben-Shem jt., 2011). Silla eB13 põhistruktuuri moodustamisel osalevad eL24 valgu Pro81, Ile82, Thr83, Ile90, Arg93, Arg94 kõrvalahelad ja Gly84 selgroog ning eS6 valgu Pro130, Phe144, Phe145 ja Phe156 kõrvalahelad ja Arg132, Phe144, Arg159 selgrood. Selleks, et sild eB13 oleks stabiilsem, on vajalikud interaktsioonid uL3 valgu Ser297 ja Phe298 selgroogude ning eS6 valgu His22 ja Arg25 kõrvalahelate vahel. Ainuke lisakontakt, mis on iseloomulik pre-translokatsioonilisele konformatsioonile, on tekkinud uL3 valgu Arg300 kõrvalahela ja eS6 valgu His22 kõrvalahela vahel. Post-translokatsioonilises konformatsioonis tekib palju spetsiifilisi kontakte, kus osalevad eL24 valgu Lys70, Arg71, Arg73, Arg101, Arg105, Lys108, Asp112, Lys113, Lys117, Asp119, Lys120, Arg123 ja Lys124 kõrvalahelad ning 18S rRNA 273, 274, 280, 1712, 1713 ja 1714 nukleotiidide fosfaatid, 18S rRNA 75, 278 ja 280 nukleotiidide lämmastikalused ning eS6 valgu Glu150, Asp151 ja Asp155 kõrvalahelad (Ben-Shem jt., 2011).



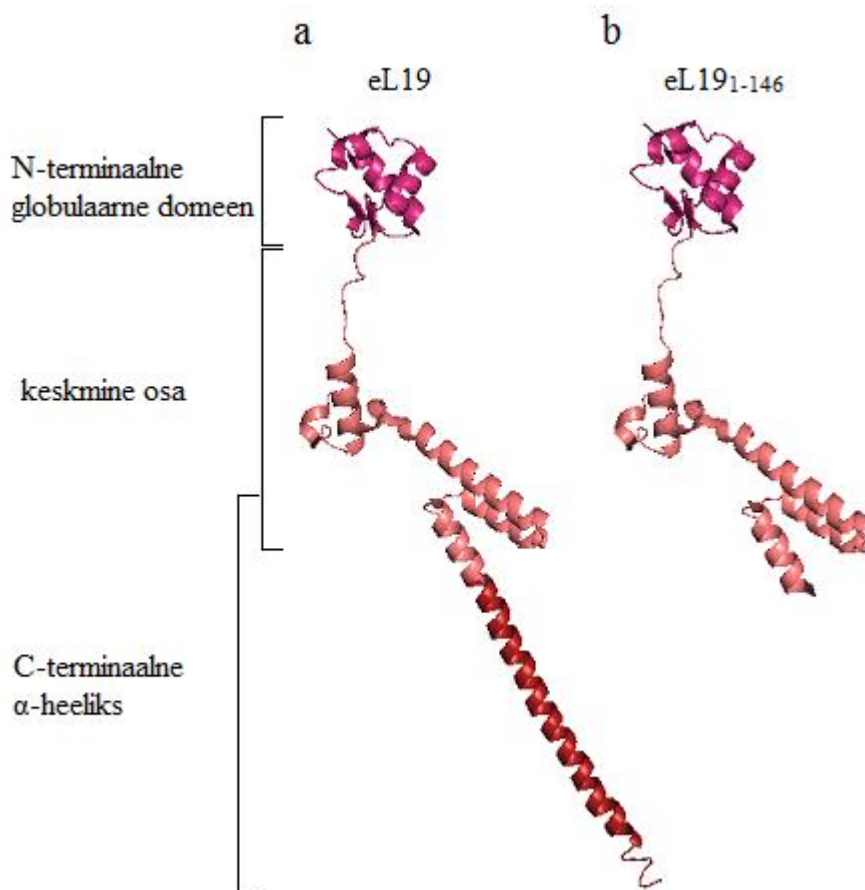
**Joonis 5. Eukariöodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13.** (a) eB12 ja eB13 sildade asukohad ribosoomis. Suur subühik on kujutatud siniselt, väike subühik on kujutatud hallilt. Silla eB13 põhiosa moodustab valk eL24, mis on kujutatud oranžilt. Silla eB12 põhiosa moodustab valk eL19, mis on kujutatud punaselt. Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Ben-Shem jt., 2011 avaldatud struktuuri järgi. (b) Silla eB12 struktuur. Valgu eL19 C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks, valgud uS17 ja eS7 on kujutatud vastavalt oranžilt, roosalt ning tumesiniselt. 18S rRNA lisasegment ES6S on kujutatud helesiniselt. Joonis on muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi. (c) Silla eB13 struktuur. Valgu eL24 N-terminaalne globulaarne domeen ja C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks ning valgud eS6 ja uL3 on kujutatud vastavalt kollaselt, roheliselt ning türkiissiniselt. 18S rRNA heeliksid h6 ja h10 on kujutatud vastavalt helesiniselt ja tumesiniselt. Joonis on muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

### 1.3.1 Valk eL19 ja seda kodeerivad geenid

*S. cerevisiae* r-valku eL19 kodeerivad kaks paraloogilist geeni *RPL19A* ja *RPL19B*, millede süstemaatilised nimetused on vastavalt *YBR084C-A* ja *YBL027W* (Song jt., 1996; Planta ja Mager, 1998). Mõlemad geenid sisaldavad avatud lugemisraami (ingl. *open reading frame, ORF*) 5'-otsa lähedal ühte introni. Kuigi splaissitud eksonid *RPL19A* ja *RPL19B* geenidel erinevad 34 nukleotiidi poolest, on nende poolt transleeritud polüpeptiidid identsed. Erinevalt eksonitest, ei ole *RPL19A* ja *RPL19B* intronid ning 5'- ja 3'-mittetransleerivad regioonid (ingl. *untranslated regions, UTR*) homoloogilised (Song jt., 1996). *RPL19A* deletsioon ei mõjuta praktiliselt rakkude kasvu võrreldes metsiktüübiga 30°C juures rikkal söötmel – rakkude generatsiooniaeg on 107,9±8,0 minutit (Steffen jt., 2012). Metsiktüüpi rakkude generatsiooniaeg samas söötmes on 90,7±7,4 minutit. *RPL19B* deletsioon põhjustab generatsiooniaja pikenemist 131,9±9,5 minutini (Steffen jt., 2012). Mõlema geeni deletsiooni tulemusena rakud surevad, mis näitab, et nende geenide poolt kodeeritud valk eL19 on eluks hädavajalik (Song jt., 1996).

*S. cerevisiae* r-valk eL19 on 189 aminohapejäagist koosnev polüpeptiid molekulmassiga 21,7 kDa (Song jt., 1996; Planta ja Mager, 1998). Valgu eL19 molekul koosneb kolmest domeenist: N-terminaalne globulaarne domeen, keskmine osa ja C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (joonis 6a) (Ben-Shem jt., 2011). Bakterites ei ole eL19 homoloogi leitud, kuid arhedes ekspresseeritakse eL19 valk lühendatud C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksiga (Lecompte jt., 2002; Armache jt., 2013). *S. cerevisiae* eL19 järjestus on 57,5% homoloogiline imetajate eL19 järjestustega ning 35,8% homoloogiline arhebakteri *H. marismortui* eL19 järjestusega (Song jt., 1996). eL19 on aluseline valk: pagaripärmi eL19 sisaldab 58 aluselist ja 19 happelist aminohapejääki; roti eL19 sisaldab 69 aluselist ja ainult 13 happelist aminohapejääki (Song jt., 1996; Chan jt., 1987). Valgu eL19 N-terminaalne domeen ja keskmine osa on eluks hädavajalikud kuna mängivad rolli ribosoomi biogeneesis (Pöll jt., 2009; Kisly jt., 2016). Molekulaarbioloogia laboris konstrueeriti pagaripärmi mutantne eB12 $\Delta$  tüvi, mille genoomist on deleteeritud mõlemad *RPL19A* ja *RPL19B* geenid ning plasmiidilt on ekspresseeritud pagaripärmi eL19 valgu 146 N-terminaalset aminohapejääki. See valk mimikeerib arhede ribosoomis oleva eL19 valgu struktuuri (joonis 6b) (Kisly jt., 2016). Mutandil eB12 $\Delta$  puudub eB12 silla moodustumise eest vastutav eL19 valgu regioon. Sellised mutantid 60S subühikud ei moodusta 40S subühikute lisamisel 80S ribosoomi *in vitro* (Kisly jt., 2016). On näidatud, et eB12 $\Delta$  rakud on tundlikud paromomütsiini ja neomütsiini suhtes, mis viitab translatsioonitäpsuse langusele. Lisaks on näidatud, et eB12 $\Delta$  rakkudes on aktiveeritud üldine stressivastus ning nad on vähem tundlikud hüperosmootsele

stressile (Kisly jt., 2016). Seoses sellega pakuti välja hüpotees, et eB12 silla puudumisel põhjustatud translatsioonitäpsuse langus põhjustab rakkudes stressivastuse aktivatsiooni, mis omakorda tekitab omandatud stressitolerantsuse (ingl. *acquired stress response*) (Kisly jt., 2016).



**Joonis 6. Valku eL19 struktuur.** (a) eL19 valgu struktuur metsiktüüpi rakkude ribosoomides. (b) Mutandi eB12 $\Delta$  rakkudes ekspresseeritud eL19 valk (eL19<sub>1-146</sub>), mille struktuur mimikeerib arhede ribosoomides olevat eL19 valgu struktuuri. N-terminaalne globulaarne domeen on kujutatud tumeroosalt. Keskmine osa ja C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi ühine osa on kujutatud heleroosalt. C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi eukarioodi spetsiifiline osa on kujutatud punaselt. Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Ben-Shem jt., 2011 avaldatud struktuuri järgi.

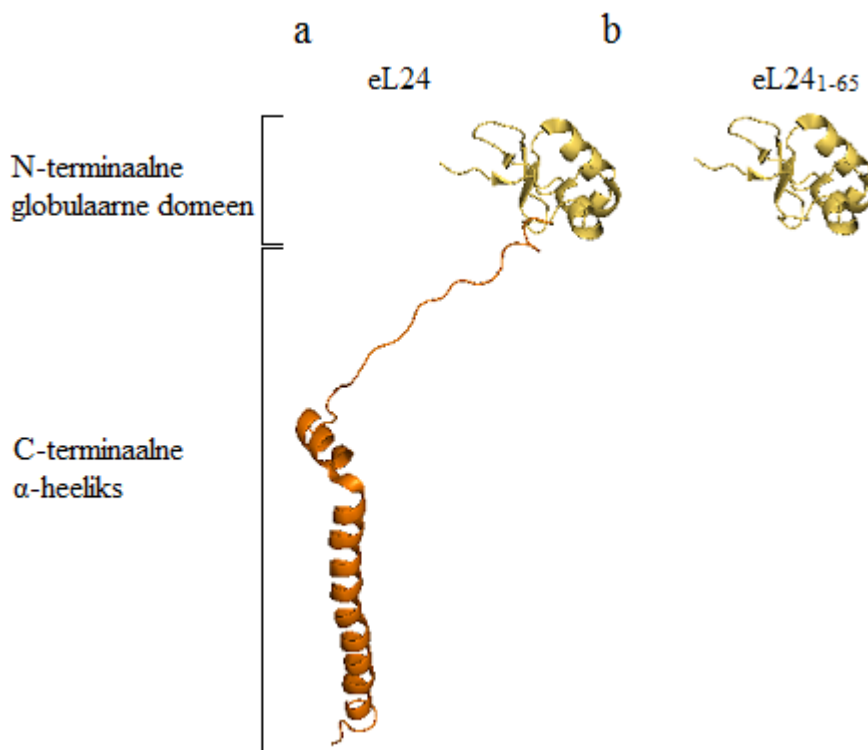
### 1.3.2 Valk eL24 ja seda kodeerivad geenid

*S. cerevisiae* r-valku eL24 kodeerivad kaks paraloogilist geeni *RPL24A* ja *RPL24B*, millede süstemaatilised nimetused on vastavalt *YGL031C* ja *YGR148C* (Planta ja Mager, 1998). Mõlemad geenid sisaldavad 5'-UTR alas ühte introni. Nende geenide 5'- ja 3'-mittekodeerivad alad ei ole

homoloogilised. Splaissitud *RPL24A* ja *RPL24B* eksonid erinevad üksteisest 35 nukleotiidi poolest ja nende poolt kodeeritud polüpeptiidid erinevad viie aminohapejäägi poolest. Neist neli aminohapejäägi asendust on konservatiivsed. *RPL24A* ja *RPL24B* poolt kodeeritud valkudes asuvad kolm erinevat aminohapejääki C-terminaalses  $\alpha$ -heeliksis, ülejäänud kaks - N-terminaalses globulaarses domeenis (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Rakkude generatsiooniga on uuritud kahe uurimisrühma poolt ning need tulemused on üksteisest erinevad. Baronas-Lowell, D. M. ja Warner, J. R. poolt avaldatud tulemuste järgi on metsiktüüpi rakkude generatsiooniaeg  $105,3 \pm 6,9$  minutit, *RPL24A* deletsiooniga rakkude pooldumisaeg on  $129,7 \pm 2,8$  minutit ja *RPL24B* deletsiooniga rakkude pooldumisaeg on  $121,3 \pm 3,6$  minutit (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Kennedy, B. K. poolt juhitud uurimisrühma saadud andmete järgi on metsiktüüpi rakkude generatsiooniaeg  $90,7 \pm 7,4$  minutit, *RPL24A* deletsiooniga rakkude pooldumisaeg on  $100,6 \pm 7,5$  minutit ja *RPL24B* deletsiooniga rakkude pooldumisaeg on  $102,3 \pm 4,1$  minutit (Steffen jt., 2012). Vaatamata nendele erinevustele ei erine *RPL24A* või *RPL24B* deletsiooniga rakkude generatsiooniaeg metsiktüüpi rakkudest märgatavalt. Mõlema geeni deletsiooniga rakud on eluvõimelised. Selliste rakkude pooldumisaeg on  $136,8 \pm 2,5$  minutit, mis on umbes 30% pikem metsiktüüpi pooldumisajast. (Baronas-Lowell ja Warner, 1990).

*S. cerevisiae* r-valk eL24 on 155 aminohapejäägist koosnev polüpeptiid (Planta ja Mager, 1998). Valgu eL24 molekul koosneb kahest domeenist: N-terminaalne globulaarne domeen ja C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (joonis 7a) (Ben-Shem jt., 2011). Bakterites ei ole leitud eL24 homoloogi, kuid arhedes ekspresseeritakse eL24 valk ilma C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksita (Lecompte jt., 2002; Armache jt., 2013). Arhede eL24 valgu molekulis on 66 aminohapejääki (Armache jt., 2013). eL24 on aluseline valk: pagaripärmi eL24 valgu mõlemad variandid sisaldavad 48 aluselist ja 13 happelist aminohapejääki polüpeptiidahela kohta (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). On näidatud, et eL24 puudumisel rakkudes ei muutu 60S ja 40S subühikute koguste suhe, mis viitab sellele, et eL24 ei osale ribosoomi biogeneesis (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Valgu eL24 deletsioon põhjustab peptidüültransferaasse aktiivsuse vähenemist kuni 30% metsiktüübist (Dresios jt., 2001). Samas, eL24 deletsioon ei mõjuta translatsioonitäpsust isegi paromomütsiini juuresolekul (Dresios jt., 2000). eL24 võib interakteeruda eIF3 valguga abifaktorite abil ja osaleda translatsiooni initsiatsiooni regulatsioonis ja ülesvoolu asuvate avatud lugamisraamide (ingl. *upstream open reading frame, uORF*) reinitseerimisel (Thiebeauld jt., 2009; Zhou jt., 2010). Valgu eL24 N-terminaalne domeen osaleb silla B6 moodustamisel ning lisaks sellele interakteerub ribosoomi antiassotsieerimisfaktoriga eIF6 (Ben-Shem jt., 2011; Gartmann jt.,

2010). eB13 silla olulisuse analüüsiks konstrueeriti molekulaarbioloogia laboris mutantne tüvi eL24 $\Delta$ , mille genoomis on deleteeritud mõlemad *RPL24A* ja *RPL24B* geenid. Selles mutandis ekspresseeriti plasmiidilt kas täispikka pagaripärmi eL24 valku (eL24 kontrolltüvi) või ainult 65 N-terminaalset aminohappejääki (mutant eB13 $\Delta$ ), mis mimikeerib arhede ribosoomis oleva eL24 struktuuri (Kisly ja Tamm, avaldamata andmed) (joonis 7b). Mutandil eB13 $\Delta$  puudub eB13 silla moodustumise eest vastutav eL24 valgu regioon.



**Joonis 7. Valgu eL24 struktuur.** (a) eL24 valgu struktuur metsiktüüpi rakkude ribosoomides. (b) Mutandi eB13 $\Delta$  rakkudes ekspresseeritud eL24 valk (eL24<sub>1-65</sub>), mille struktuur mimikeerib arhede ribosoomides oleva eL24 valgu struktuuri. N-terminaalne globulaarne domeen ja C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks on kujutatud vastavalt kollaselt ja oranžilt. Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Ben-Shem jt., 2011 avaldatud struktuuri järgi.

#### 1.4 Glükoosi mõju translatsioonile

Glükoos on peamine süsiniku- ja energiaallikas pagaripärmi rakkudele. Glükoosi eemaldamisel söötimest peavad rakud kiiresti ümber lülituma teistele süsiniku- ja energiaallikatele ning vähendada oma energia tarbimist. Translatsioon on energiakulukas protsess, seega glükoosi

puudumise korral suruvad rakud kiiresti oma translatsiooni maha. Translatsiooni mahasurumine glükoosi puudumisel on pöörduv protsess - pagaripärmi rakud taastavad translatsiooni glükoosi lisamisel söötmesse (Ashe jt., 2000). On teada kolm glükoosiga seotud signaalirada, mis mõjuvad translatsiooni: peamine glükoosi repressiooni ja derepressiooni rada, heksoosi transporteri (ingl. *hexose transporter*, *HXT*) induktsioonirada ning cAMP-sõltuvate valgukinaaside (ingl. *cAMP-dependent protein kinase*, *cAPK*) rajad (joonis 8) (Ashe jt., 2000).

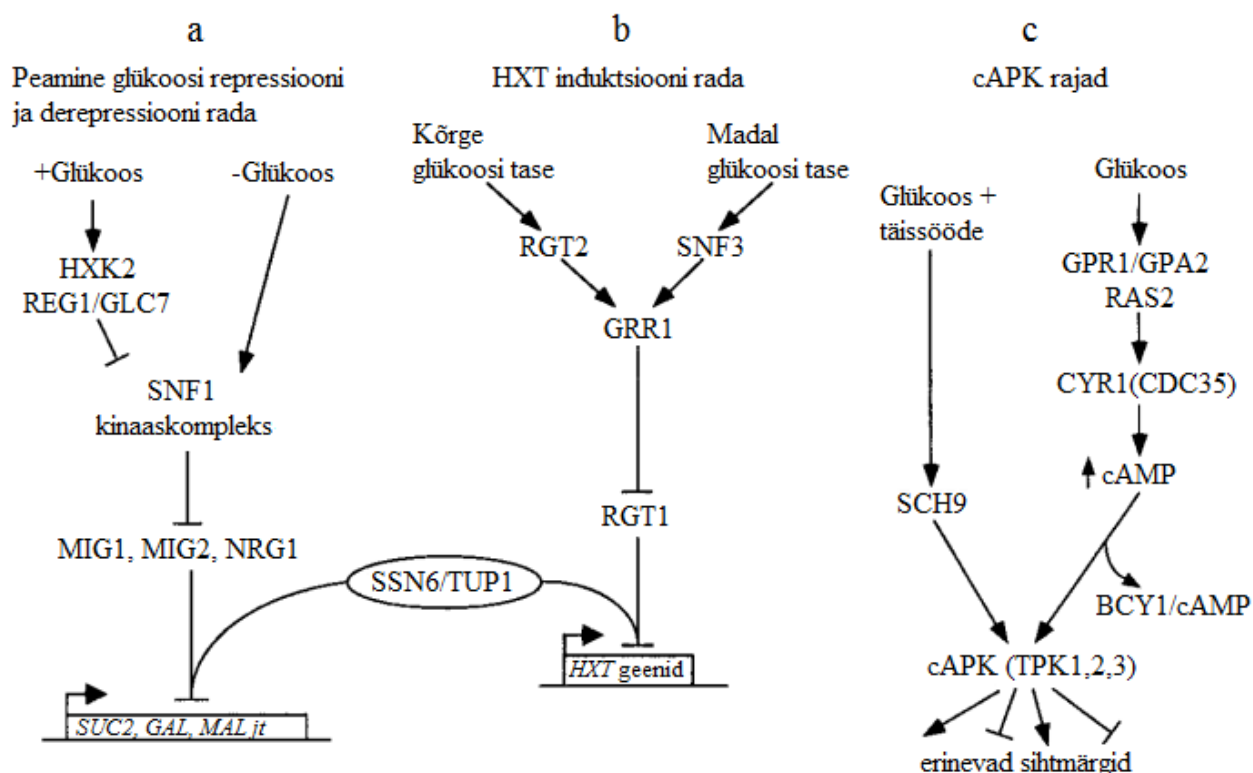
Peamise glükoosi repressiooni ja derepressiooni raja esimeses etapis toimub Snf1 kinaaskompleksi inhibeerimine Hxk2-Reg1/Glc7 kompleksi poolt glükoosi juuresolekul. Glükoosi puudumisel Snf1 kinaaskompleks aktiveerub ning surub maha transkriptsiooni repressorite Mig1, Mig2 ja Nrg1 toimet. Sellel juhul käivitatakse teiste süsiniku- ja energiaallikate metabolismiga seotud geenide transkriptsioon, näiteks *SUC2*, *GAL*, *MAL* jt. Näidati, et *reg1* ja *hxk2* deletsioonidega *S. cerevisiae* tüved ei suru translatsiooni maha glükoosi puudumise korral (Ashe jt., 2000).

HXT induktsioonirajal on kaks peamist retseptori: Rgt2 ja Snf3 (Özcan, 2002). Rgt2 on aktiveeritud kõrgema glükoosi kontsentratsiooniga, Snf3 tunneb ära väga madalat glükoosi kontsentratsiooni. Retseptorid, millele on seondunud glükoos, aktiveerivad Grr1, mis omakorda blokeerib transkriptsiooni repressorit Rgt1. Aktiivses olekus Rgt1 surub maha HXT perekonna geenide transkriptsiooni, mis on seotud erinevate heksooside transportiga (Özcan ja Johnston, 1995). Näidati, et *rgt2* ja *snf3* deletsioonidega *S. cerevisiae* tüvi ei suru translatsiooni maha glükoosi puudumise korral (Ashe jt., 2000). Samuti Ssn6 transkriptsiooni repressori puudumise korral toimub aktiivne translatsioon glükoosi puudumisel (Ashe jt., 2000).

Erinevalt eespoolt mainitud radadest, sõltub cAPK raja aktivatsioon cAMP sünteesist glükoosi juuresolekul söötmes. Selles protsessis osalevad Sch9, Cyr1(Cdc35) valgud ja Gpr1/Gpa2-Ras2 kompleks. Raja peamiseks osaks on cAMP-sõltuvad proteiinkinaasid Tpk1, Tpk2 ja Tpk3. Näidati, et mutantsed *S. cerevisiae* tüved *tpk1<sup>wl</sup> tpk2Δ tpk3Δ* ning *tpk1Δ tpk2<sup>wl</sup> tpk3Δ* ei suru translatsiooni maha glükoosi puudumise korral (Ashe jt., 2000). Nendes mutantides on deleteeritud kaks geeni ja kolmanda geeni (mis on tähistatud kui <sup>wl</sup>) ekspressioon on nõrgendatud. Huvitav on see, et mutant *tpk1Δ tpk2Δ tpk3<sup>wl</sup>* surub translatsiooni maha glükoosi puudumise korral sarnaselt metsiktüübile (Ashe jt., 2000).

On teada, et aminohapete puudumise korral toimub initsiatsioonifaktori eIF2  $\alpha$ -domeeni fosforüleerimine eIF2 $\alpha$  kinaasi poolt. See põhjustab translatsiooni initsiatsiooni blokeerimist. Leiti, et glükoosi puudumise stressis initsiatsioonifaktorit eIF2 $\alpha$  ei fosforüleerita (Ashe jt., 2000;

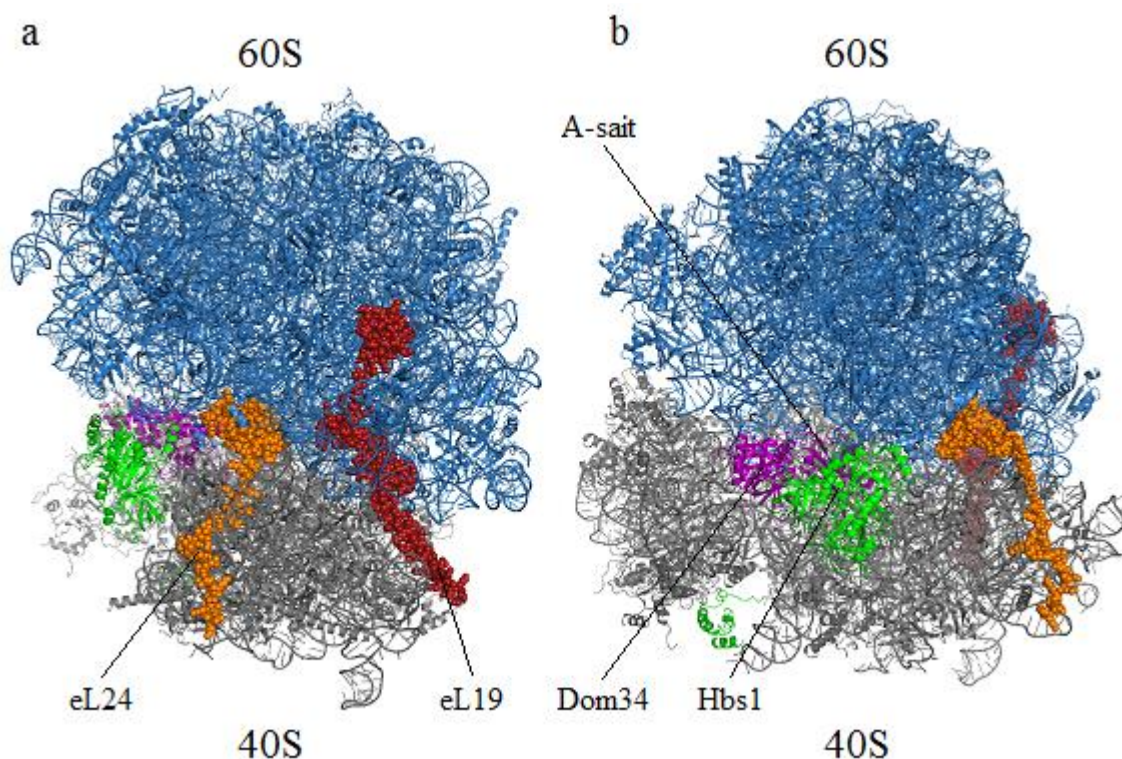
Castelli jt., 2011). Oksüdatiivse stressi või membraani kahjustuste korral toimub translatsiooni mahasurumine initsiatsioonifaktori eIF4E blokeerimisega 4E-BP (ingl. *eIF4E binding protein*) poolt. Uuringud näitasid, et ka 4E-BP ei osale translatsiooni mahasurumisel glükoosi puudumise stressis (Castelli jt., 2011). Näidati, et glükoosi puudumisel rakud peatavad translatsiooni initsiatsiooni eIF4A helikaasi eemaldamise kaudu 43S pre-initsiatsiooni kompleksist (Castelli jt., 2011).



**Joonis 8. Signaalirajad, mis on seotud glükoosi puudumise stressiga.** Nooled tähistavad aktivatsiooni, tõmpotsaga jooned tähistavad inhibeerimist. Joonis on muudetud Ashe jt., 2000 järgi.

Glükoosi sisaldavas söötmes kasvavates rakkudes moodustuvad translatsiooni initsiatsioonil 80S ribosoomid, mis omakorda moodustavad polüsoome. Glükoosi puudumisel seondub tsütoplasmas paikneva translatsiooni lõpetanud ribosoomiga valk Stm1, mis moodustab kontakte 40S ja 60S subühikutega (Ben-Shem jt., 2011). Stm1 valgu  $\alpha$ -heeliks siseneb mRNA sisenemistunnelisse ja blokeerib translatsiooni initsiatsiooni. Lisaks sellele, Stm1 valk takistab monosoomi spontaantset dissotsieerumist ja kaitseb ribosoomi degradeerimise eest (Ben-Shem jt., 2011). Translatsiooni initsiatsiooniks on vaja dissotsieerida tsütoplasmas olevaid 80S ribosoomid, kuna initsiatsiooniks

on vajalikud vabad 60S ja 40S subühikud. Näidati, et monosoomide dissotsieerimiseks on vajalik valgukompleks Dom34-Hbs1 (van den Elzen jt., 2014). Dom34-Hbs1 kompleks koos GTP molekuliga seondub ribosoomi A-saiti ja tunneb ära dekodeerimistsentri (joonis 9) (Hilal jt., 2016). Kui Dom34-Hbs1 ei leia sisenemistunnelis mRNA molekuli, siis seondub sellele kompleksile faktor Rli1 ning Dom34-Hbs1 kompleks hüdrolyüsib GTP molekuli (Hilal jt., 2016; van den Elzen jt., 2014). Saadud energia arvel dissotsieerib Dom34-Hbs1 kompleks ribosoomi vabadeks subühikuteks. Dom34 või Hbs1 deletsioonimutantidel ei toimu translatsiooni taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi, sest on raskendatud monosoomide dissotsieerimine subühikuteks. Topeltmutandid, kus puudub *DOM34* ja *STMI* ekspressioon või *HBS1* ja *STMI* ekspressioon, on võimelised taastama translatsiooni glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi (van den Elzen jt., 2014).



**Joonis 9. Dom34-Hbs1 kompleksi seondumissait ribosoomis.** (a) Vaade ribosoomi sildade poolsest küljest. (b) Vaade ribosoomi A-saidi poolsest küljest. Suur subühik on kujutatud siniselt, väike subühik on kujutatud hallilt. Silla eB13 põhiosa moodustab valk eL24, mis on kujutatud oranžilt. Silla eB12 põhiosa moodustab valk eL19, mis on kujutatud punaselt. Dom34 ja Hbs1 on kujutatud vastavalt purpurselt ja roheliselt. Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Hilal jt., 2016 avaldatud struktuuri järgi.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö uurimisobjektideks on pagaripärmi ribosoomi eukariooti spetsiifilised subühikute vahelised sillad eB12 ja eB13. Nende sildade põhilisteks osadeks on vastavalt eL19 ja eL24 valgud. Valk eL19 on kodeeritud paraloogiliste geenide *RPL19A* ja *RPL19B* poolt. Mõlema geeni deletsiooni tulemusena rakud surevad (Song jt., 1996). Käesolevas töös kasutati mutanti eB12 $\Delta$ , mille genoomist on deleteeritud mõlemad *RPL19A* ja *RPL19B* geenid ning plasmiidilt on ekspresseeritud pagaripärmi eL19 valgu 146 N-terminaalset aminohappejääki. eB12 $\Delta$  mutandi valk eL19 mimikeerib arhede ribosoomis oleva eL19 valgu struktuuri (Kisly jt., 2016). Valk eL24 on kodeeritud paraloogiliste geenide *RPL24A* ja *RPL24B* poolt. Mõlema geeni deletsiooniga rakud on eluvõimelised, kuid nende generatsiooniaeg on umbes 30% pikem võrreldes metsiktüübi rakkudega (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Käesolevas töös kasutati mutanti eL24 $\Delta$ , mille genoomist on deleteeritud mõlemad *RPL24A* ja *RPL24B* geenid. Selles mutandis ekspresseeriti plasmiidilt kas täispikka pagaripärmi eL24 valgu (eL24 kontrolltüvi) või ainult 65 N-terminaalset aminohappejääki (mutant eB13 $\Delta$ ). eB13 $\Delta$  mutandis olev eL24 mimikeerib arhede ribosoomis oleva eL24 struktuuri (Kisly ja Tamm, avaldamata andmed).

Töö täpsemateks eesmärkideks olid:

1. Uurida, kui efektiivselt suruvad eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  või eL24 $\Delta$  mutantseid ribosoomide omavad pagaripärmi rakud maha translatsiooni glükoosi puudumisel.
2. Iseloomustada eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  ja eL24 $\Delta$  mutantsete ribosoomidega rakkudes polüsoomide taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi.

### 2.2 Materjal ja meetodika

Töös kasutatud *S. cerevisiae* tüved on toodud tabelis 1. Kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 2. Kasutatud söötmed on toodud tabelis 3. Tardsöötmete valmistamiseks lisati vedelsöötmetele agarit nii, et selle lõppkontsentratsioon oleks 2%.

**Tabel 1.** Töös kasutatud *S. cerevisiae* tüved.

<b>Tüve number</b>	<b>Tüve nimi</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Päritolu</b>
TYSC309	WT	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Labori kolleksioon
TYSC360	eB12Δ	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A<sub>1-146</sub>]</i>	Labori kolleksioon
TYSC488	eL24Δ	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6 [pRS314]</i>	Labori kolleksioon
-	eB13Δ	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6 [pRS314-rpl24<sub>1-65</sub>]</i>	Selles töös valmistatud
-	eL24 kontroll	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6 [pRS314-RPL24A]</i>	Selles töös valmistatud

**Tabel 2.** Töös kasutatud plasmiidid.

<b>Plasmidi nimi</b>	<b>Vektor</b>	<b>Geen</b>	<b>Promootor</b>	<b>Terminaator</b>	<b>Marker</b>	<b>Päritolu</b>
<i>pRS314</i>	<i>pRS314</i>	-	-	-	<i>TRP1</i>	Labori kolleksioon
<i>pRS314-rpl24<sub>1-65</sub></i>	<i>pRS314</i>	<i>rpl24<sub>1-65</sub></i>	<i>RPL24A promootor</i>	<i>RPL24A terminaator</i>	<i>TRP1</i>	Labori kolleksioon
<i>pRS314-RPL24A</i>	<i>pRS314</i>	<i>RPL24A</i>	<i>RPL24A promootor</i>	<i>RPL24A terminaator</i>	<i>TRP1</i>	Labori kolleksioon

**Tabel 3.** Töös kasutatud söötmed.

Sööde	Söötme koostis
YPD	1% Bacto pärmiekstrakt, 2% Bacto peptoon, 2% glükoos
YP	1% Bacto pärmiekstrakt, 2% Bacto peptoon
SC	0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu
SC-Trp	0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu, millest puudub trüptofaan

### 2.2.1 Ribosoomide profiilide analüüs

Ribosoomide profiilide analüüsiks kasutati muudetud Foiani jt. (1991) poolt kirjeldatud meetodit. Pärmirakke kasvatati 400 ml YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600} \approx 0,8$ ). YPD-kontrolliks võeti rakukultuurist 50 ml ja pandi kasvama 30°C juurde. Ülejäänud 350 ml rakukultuuri tsentrifugeeriti toatemperatuuril 3200 RPM (*Hettich Rotina 420R Swing-out rotor Cat. No. 4723*), 3 minutit. Supernatant eemaldati ning sadestatud rakud suspendeeriti YP söötmes. Saadud YP kultuur inkubeeriti 10 minutit 30°C juures. YP-kontrolliks võeti YP rakukultuurist 50 ml rakke ning lisati nendele tsükloheksimiidi (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Ülejäänud 300 ml rakukultuurile lisati glükoosi (lõppkontsentratsioon 2%). 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes võeti sellest rakukultuurist 50 ml proovid. Kõikidele proovidele lisati tsükloheksimiidi (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Tsükloheksimiidi lisati ka 50 ml YPD-kontroll rakkudele (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Rakke inkubeeriti tsükloheksimiidiga vähemalt 2 minuti jään. Peale seda rakud koguti tsentrifugeerimise teel 4°C juures 3200 RPM (*Hettich Rotina 420R Swing-out rotor Cat. No. 4723*), 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakke pesti 5 ml puhvris A (20 mM HEPES-KOH (pH = 7,5), 100 mM KCl, 5 mM  $(CH_3COO)_2Mg$ , 1 mM DTT) koos tsükloheksimiidiga (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Rakud resuspendeeriti 600 µl puhvris A ning lisati 400 µl klaasikuule ( $\varnothing = 0,5$  mm). Rakud lüüsi *Precellys 24 (Bertin Technologies)* homogenisaatoriga (6000 RPM, 3×1 minut, paus 1 minut, 4°C). Lüüsitud rakkude lahustumatu materjal sadestati lauatsentrifugeerimisega (*Heraeus Biofuge Fresco*) tsentrifugeerimise teel (13000 RPM, 4°C, 20 minutit). Saadud rakulüsaatis mõõdeti optiline tihedus lainepikkusel 260 nm ( $OD_{260}$ ). Puhvris A valmistatud 7%-47% sahharoosigradientidele (ühe gradienti maht 36 ml) kanti 20  $OD_{260}$  ekvivalentühikut rakulüsaati. Gradientid tsentrifugeeriti 4°C,  $\omega^2t = 1,8 \times 10^{11}$  rad<sup>2</sup>×s kasutades SW28 rootorit (*Beckman Coulter*

*Optima™ L-90K Ultracentrifuge*). Ribosoomide profiilide visualiseerimiseks lainepikkusel 260 nm kasutati peristaltilist pumpa P-1, detektori Uvis-920 ja isekirjutajat REC112 (*GE Healthcare*). Profiilid digitaliseeriti tarkvaraga CorelDraw X7 (versioon 17.6.0.1021). Saadud profiilide joonistel mõõdeti polüsoomide ja monosoomide pindalad tarkvara ImageJ (versioon 1.49v) abil. Pindalade väärtuste põhjal arvutati iga profiili jaoks polüsoomide / monosoomide suhed (P/M suhed). Iga tüve ning ajapunkti jaoks on arvatud keskmised ja standardhälbed tarkvara Microsoft Office Excel 2010 abil. Katset korrati vähemalt kolm korda.

### **2.2.2 *S. cerevisiae* rakkude transformatsioon**

*S. cerevisiae* rakkude transformatsiooniks kasutati muudetud Knop jt., (1999) poolt kirjeldatud meetodit. eL24Δ (TYSC488) rakud kasvatati 20 ml YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600} \approx 0,8$ ). Rakukultuuri tsentrifuugiti toatemperatuuril 3200 RPM (*Hettich Rotina 420R Swing-out rotor Cat. No. 4723*), 2 minuti. Rakud pesti 10 ml steriilse milli-Q veega ja 5 ml LiOAc-TE lahusega (10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM CH<sub>3</sub>COOLi, 1 mM EDTA). Rakud suspendeeriti 120 µl LiOAc-TE lahuses. Suspensionile lisati eelnevalt 95°C juures denatureeritud ja seejärel kuni 4°C jahutatud kandja-DNA 10 mg/ml lahust ning segati *vortex*'il. Ettevalmistatud 1,5 µl plasmiidse DNA lahusele lisati 50 µl rakususpensiooni ja suspendeeriti. Inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit ning seejärel lisati 300 µl PEG-LiOAc-TE lahust (10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM CH<sub>3</sub>COOLi, 1 mM EDTA, 50% PEG 4000), segati *vortex*'il ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Pärast seda lisati 30 µl DMSO, segati *vortex*'il ja inkubeeriti 10 minuti 42°C juures. Rakud tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga (*Hettich Rotina 420R Swing-out rotor Cat. No. 4723*) toatemperatuuril 3200 RPM 3 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 100 µl steriilses milli-Q vees. 50 µl rakususpensiooni külvati selektiivsöötmega (SC-Trp) tassile. Tasse inkubeeriti 30°C juures kuni kolooniate tekkemiseni.

### **2.2.3 Plasmidi säilimise analüüs**

Pärmirakke kasvatati kolme paralleelkultuurina 10 ml YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600} \approx 0,8$ ). Iga paralleelkultuuri jaoks tehti 10× lahjendus milli-Q vees ja mõõdeti lahjenduse optiline tihedus ( $OD_{600}$ ). Saadud optilise tiheduse järgi arvutati rakkude arvu 10× lahjenduses kasutades tabeli, milles on toodud pärmirakkude ja optilise tiheduse omavaheline seos (Amberg jt., 2005). Peale seda tehti lahjendused, et saada 200 rakku

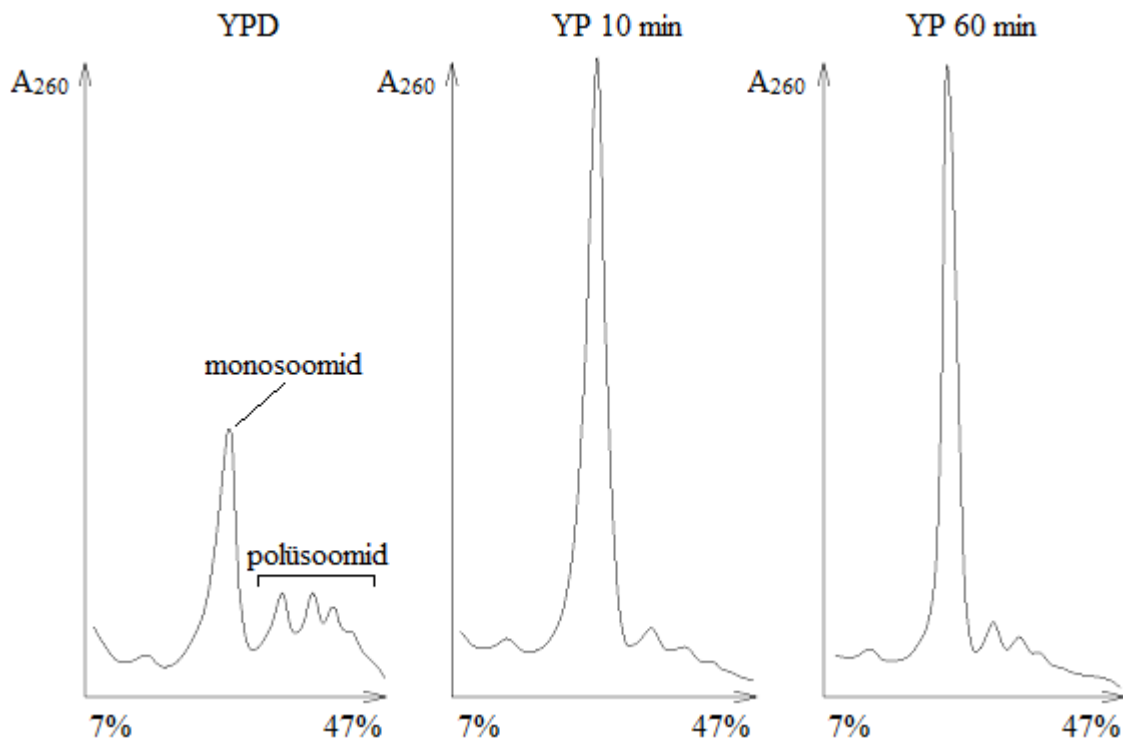
100 µl - 150 µl milli-Q vees. Igast paralleelkultuurist külvati rakud kolmele täissöötmega (ingl. *synthetic complete*, SC) ja kolmele täissöötmega ilma trüptofaanita (ingl. *synthetic complete without tryptophan*, SC-Trp) tassidele. Tasse inkubeeriti kolooniate tekkimiseni 30°C juures. Kolooniad loendati ning arvutati keskmine rakkude ellujäämise protsent SC-Trp tassidel SC tasside suhtes. Katset korrati vähemalt kaks korda ühe tüve jaoks.

## 2.3 Tulemused

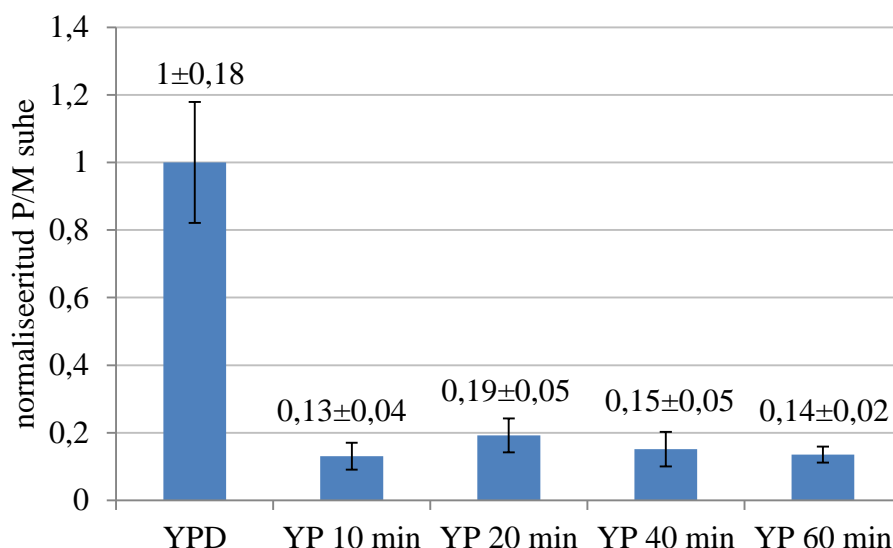
### 2.3.1 Ribosoomide profiilide analüüs WT rakkudes glükoosi puudumisel

Selleks, et analüüsida ribosoomide profiile glükoosi puudumisel, kasutati WT rakke (TYSC309). Rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini, vahetati YPD sööde YP söötme vastu. YP söötmes kasvavast kultuurist võeti 10 minuti, 20 minuti, 40 minuti ja 60 minuti järel rakke rakulüsaadi tegemiseks ning analüüsiti nende ribosoomide sahharoosi gradiendis lahutamise teel. Tulemuseks on profiilide joonised, mis peegeldavad monosoomide ja polüsoomide koostises oleva rRNA jaotumist sahharoosi gradiendis sõltuvalt partiklite sedimentatsioonikoefitsiendist. Kuna rRNA neelab kiirgust lainepikkusel 260 nm, siis neeldumine ning järelkult profiilides olevate piikide pindalad sõltuvad rRNA kontsentratsioonist. Saadud ribosoomide profiilide analüüsil arvutati polüsoomide (P) piikide ja monosoomide (M) piikide pindalate suhted (P/M suhted), mis võimaldavad hinnata rakulüsaadis sisalduva polüsoomide koguse võrreldes monosoomide kogusega. Arvutati normaliseeritud P/M suhe, mis näitab kui palju moodustab YP söötmes kasvanud rakkude P/M suhe YPD söötmes kasvanud rakkude P/M suhtest.

YPD söötmes kasvanud rakkude profiilides on detekteeritavad kõrged polüsoomide ja madalad monosoomide piigid (joonis 10). 10 minutit ja 60 minutit YP söötmes kasvanud rakkude profiilides on detekteeritavad oluliselt langenud polüsoomide piigid ning mažoorised monosoomide piigid (joonis 10). YP söötmes 20 minutit ja 40 minutit kasvanud rakkude profiilid olid sarnased profiilidele, mida saadi 10 minutit ja 60 minutit YP söötmes kasvanud rakkudest (tulemused ei ole näidatud). Saadi, et YP söötmes 10 minutit kasvanud rakkude P/M suhe langeb kiiresti võrreldes YPD söötmes kasvanud rakkude P/M suhtega ning säilib madalal tasemel ka 60 minuti jooksul (joonis 11). Järeldati, et translatsiooni mahasurumiseks piisab 10 minutist rakkude YP söötmes kasvatamisest.



**Joonis 10. Ribosoomide profiilid YPD ja YP söötmes kasvanud WT rakkudest. *S. cerevisiae*** rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Rakukultuur jagati kaheks. Ühel osal vahetati YPD sööde YP söötmeks vastu. Teine osa kasvas edasi YPD söötmes. 20 OD<sub>260</sub> ekvivalentühikut rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifuugimise teel ning visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. „YPD“ tähistab glükoosi sisaldavas söötmes kasvanud rakukultuuri. „YP 10 min“ ja „YP 60 min“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita söötmes vastavalt 10 minutit ja 60 minutit. X-teljel on sahharoosi kontsentratsioon, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katsetes kasutati WT rakke (TYSC309).



**Joonis 11. Normaliseeritud P/M suhted WT rakkudes glükoosi puudumisel.** Ribosoomide profiilide alusel arvutati monosoomide (M) ning polüsoomide (P) pindalad. Polüsoomide pindalad jagati vastavate monosoomide pindaladega ja saadud P/M suhted normaliseeriti YPD-s kasvatatud rakkude P/M suhtes. „YPD“ tähistab glükoosi sisaldavas söötmes kasvanud rakukultuuri. „YP 10 min“, „YP 20 min“, „YP 40 min“ ja „YP 60 min“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita vastavalt 10 minutit, 20 minutit, 40 minutit ja 60 minutit. Katsetes kasutati WT rakke (TYSC309). Joonisel on toodud vähemalt kolme katse keskmised tulemused ja standardhälbed.

### 2.3.2 Ribosoomide profiilide analüüs WT rakkudes peale glükoosi lisamist

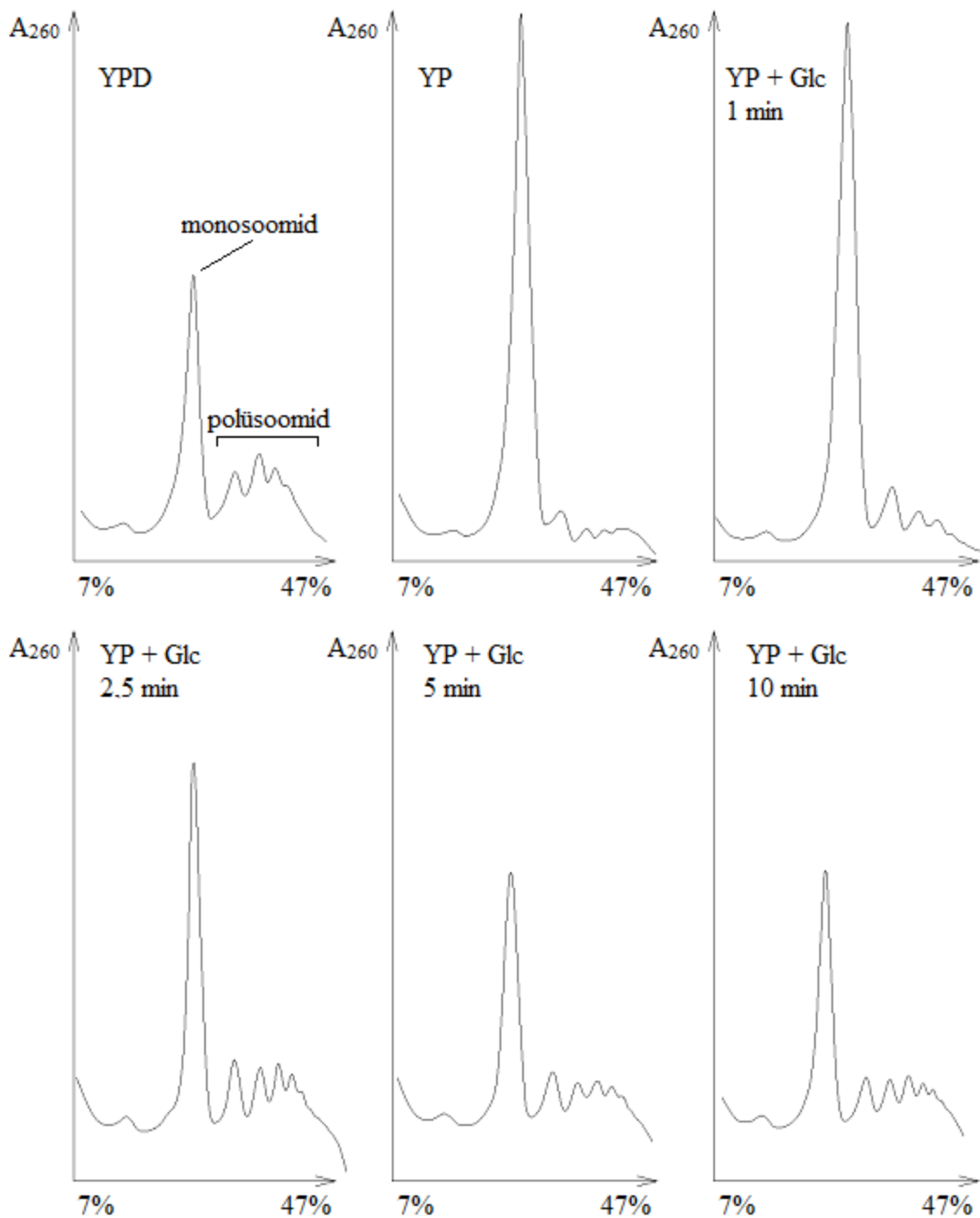
Selleks, et analüüsida ribosoomide profiile peale glükoosi lisamist, kasutati WT rakke (TYSC309). Rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini, vahetati YPD sööde YP söötme vastu ning kasvatati 10 minutit. Seejärel lisati kultuurile glükoosi ning valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. Ribosoomide analüüsiti sahharoosi gradiendis lahutamise teel (joonis 12). YPD söötmes kasvanud rakkude profiilides on detekteeritavad kõrged polüsoomide ja madalad monosoomide piigid. 10 minutit YP söötmes kasvanud rakkude profiilides on detekteeritavad oluliselt langenud polüsoomide piigid ning mažoorsed monosoomide piigid. 2,5 minuti jooksul peale glükoosi lisamist suurenevad rakulüsaatide profiilides polüsoomide piigid ja vähenevad monosoomide piigid, võrreldes YP söötmes kasvanud rakkude profiilides detekteeritud piikidega. 2,5 minutit, 5 minutit ja 10 minutit pärast glükoosi lisamist kasvanud rakkude profiilides on sarnased nii polüsoomide

kui ka monosoomide piigid (joonis 12). Saadud ribosoomide profiilides määrati polüsoomide (P) ja monosoomide (M) piikide pindalade suhted (P/M suhted) ning normaliseeriti YPD söötmes kasvanud rakkude P/M suhte vastu (joonis 13). P/M suhete analüüs kinnitas, et rakkudes toimub kiire polüsoomide taastumine 2,5 minuti jooksul peale glükoosi lisamist. 2,5 minutile, 5 minutile ja 10 minutile vastavad P/M suhted ei erine oluliselt omavahel (joonis 13).

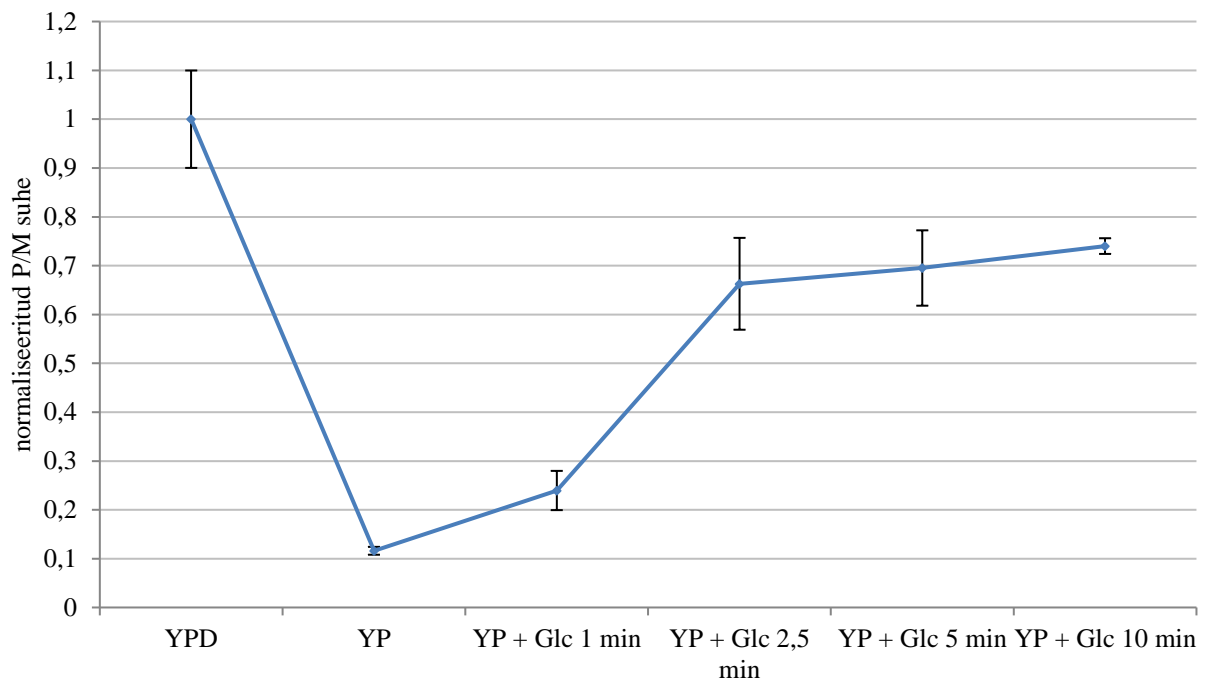
### **2.3.3 Ribosoomide profiilide analüüs mutantsete ribosoomidega rakkudes**

Järgmisena uuriti translatsiooni mahasurumist glükoosi puudumisel ning translatsiooni taastumist peale glükoosi lisamist eL24 $\Delta$  (TYSC488), eB13 $\Delta$  ja eL24 kontrolltüve rakkude ribosoomides. Rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini, vahetati YPD sööde YP söötme vastu ning kasvatati YP söötmes 10 minutit. Seejärel lisati kultuurile glükoosi ning valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. Ribosoomi analüüsiti sahharoosi gradiendis lahutamise teel. Kõikides analüüsitud rakulüsaatides on ribosoomide profiilid sarnased rakkude kasvatamisel YPD söötmes, 10 minutit YP söötmes ja 2,5 minutit, 5 minutit ja 10 minutit peale glükoosi lisamist YP söötmesse. WT ja eL24 kontrolltüvedel on omavahel sarnased ribosoomide profiilid 1 minutit pärast glükoosi lisamist YP söötmes kasvanud rakkudele (tulemused ei ole näidatud). 1 minut peale glükoosi lisamist kasvanud eL24 $\Delta$  ja eB13 $\Delta$  tüvede ribosoomide profiilid näitavad järsku monosoomide piikide langust võrreldes WT ja eL24 kontrolltüvede profiilidega (joonised 14 ja 15).

Saadud ribosoomide profiilides määrati polüsoomide (P) ja monosoomide (M) piikide pindalate suhted (P/M suhted) ning normaliseeriti saadud P/M suhted YPD söötmes kasvanud rakkude P/M suhte vastu. P/M suhete analüüs kinnitas, et 1 minuti jooksul peale glükoosi lisamist taastub eL24 $\Delta$  ja eB13 $\Delta$  rakkudes P/M suhe kiiremini võrreldes WT ja eL24 kontrolltüvede rakkudega (eL24 $\Delta$  P/M = 0,46 $\pm$ 0,05; eB13 $\Delta$  P/M = 0,43 $\pm$ 0,06; WT P/M = 0,24 $\pm$ 0,04; eL24 kontrolltüve P/M = 0,24 $\pm$ 0,02) (joonis 16). YPD söötmes kasvanud rakkude, YP söötmes kasvanud rakkude, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti pärast glükoosi lisamist kasvanud rakkude vastavad P/M suhted ei erine oluliselt tüvede vahel (joonis 16).

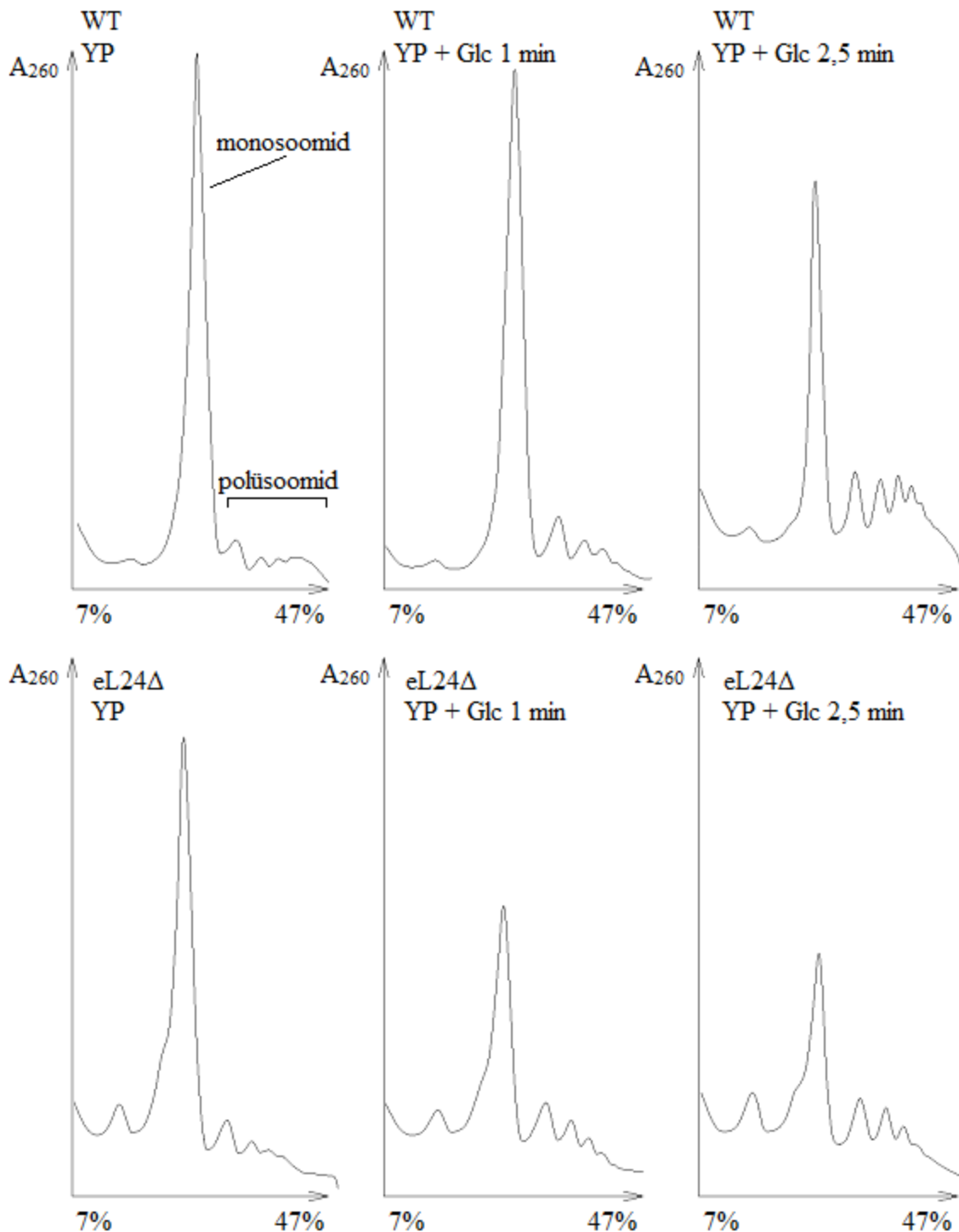


**Joonis 12. Ribosoomide profiilid WT rakulüsaatides peale glükoosi lisamist.** *S. cerevisiae* rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Ühel osal vahetati YPD sööde YP söötme vastu. YP söötmes kasvanud rakukultuurist võeti osa rakke. Ülejäänud rakukultuurile lisati glükoosi ja seejärel valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. 20 OD<sub>260</sub> ekvivalentühikut rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifugimise teel ja visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on sahharoosi kontsentratsioon, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katsetes kasutati WT rakke (TYSC309).

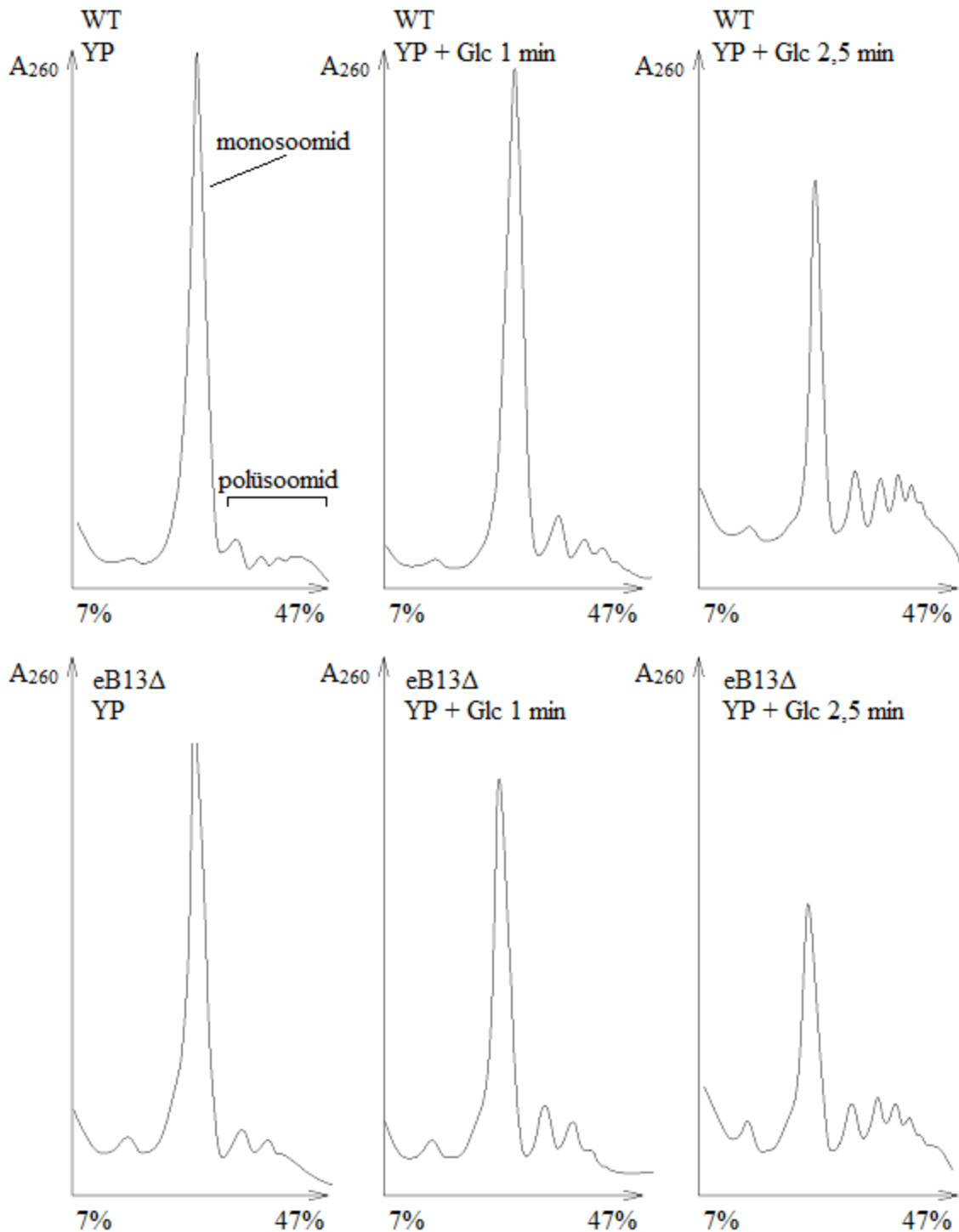


**Joonis 13. Normaliseeritud P/M suhted WT rakulüsaatides peale glükoosi lisamist.**

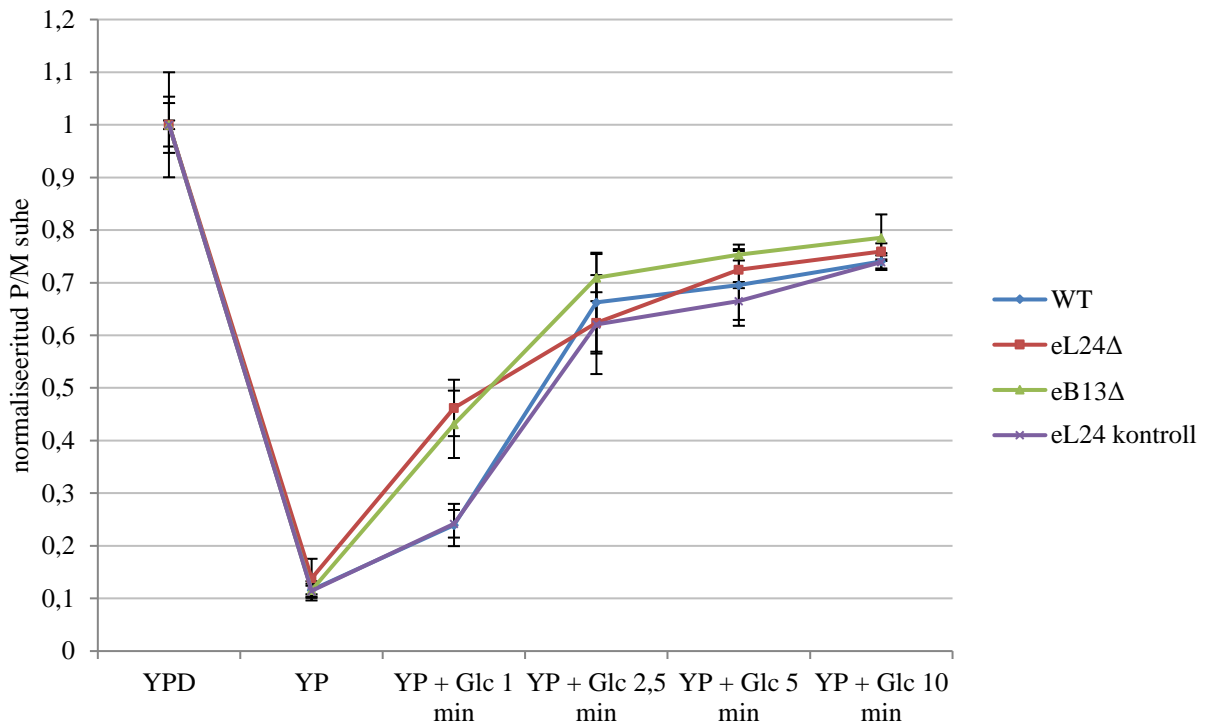
Ribosoomide profiilide alusel arvutati monosoomide (M) ning polüsoomide (P) pindalad. Polüsoomide pindalad jagati vastavate monosoomide pindaladega ja saadud P/M suhted normaliseeriti YPD suhtes. „YPD“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud rikkas glükoosi sisaldavas söötmes. „YP“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita 10 minutit. „YP + Glc 1 min“, „YP + Glc 2,5 min“, „YP + Glc 5 min“, „YP + Glc 10 min“ tähistavad rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita ning seejärel kasvanud glükoosi sisaldavas söötmes vastavalt 1 minut, 2,5 minutit, 5 minutit ja 10 minutit. Joonisel on toodud vähemalt kolme katse keskmised tulemused ja standardhälbed.



**Joonis 14. WT ja eL24Δ rakulüsaatide ribosoomide profiilid.** *S. cerevisiae* rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Ühel osal vahetati YPD sööde YP söötme vastu. YP söötmes kasvanud rakukultuurist võeti osa rakke. Ülejäänud rakukultuurile lisati glükoosi ja seejärel valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. 20 OD<sub>260</sub> ekvivalentühikut rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifugimise teel ja visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on sahharoosi kontsentratsioon, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katsetes kasutati WT (TYSC309) ja eL24Δ (TYSC488) rakke.

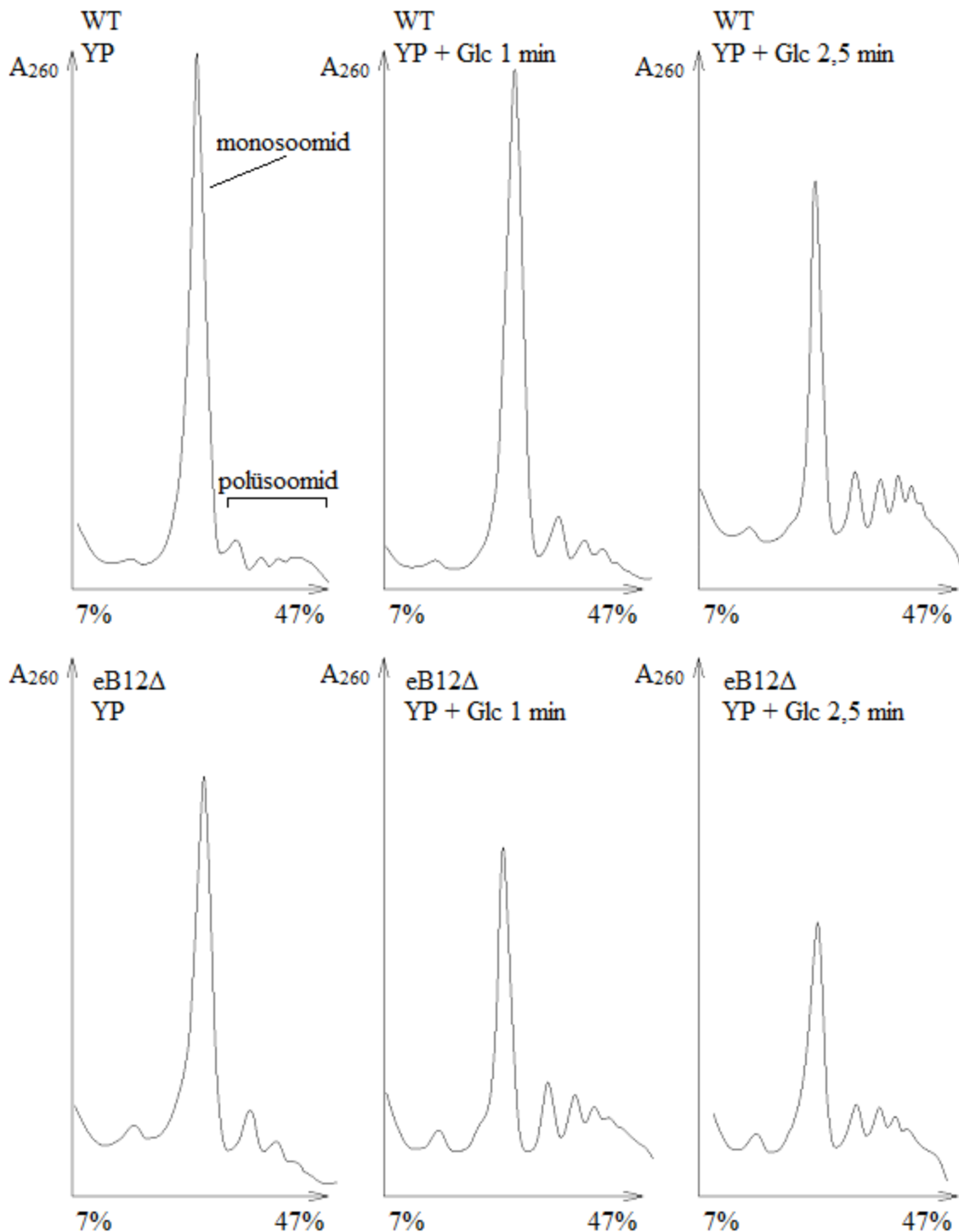


**Joonis 15. WT ja eB13Δ rakulüsaatide ribosoomide profiilid.** *S. cerevisiae* rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Ühel osal vahetati YPD sööde YP söötme vastu. YP söötmes kasvanud rakukultuurist võeti osa rakke. Ülejäänud rakukultuurile lisati glükoosi ja seejärel valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. 20 OD<sub>260</sub> ekvivalentühikut rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifugimise teel ja visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on sahharoosi kontsentratsioon, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katsetes kasutati WT (TYSC309) ja eB13Δ rakke.



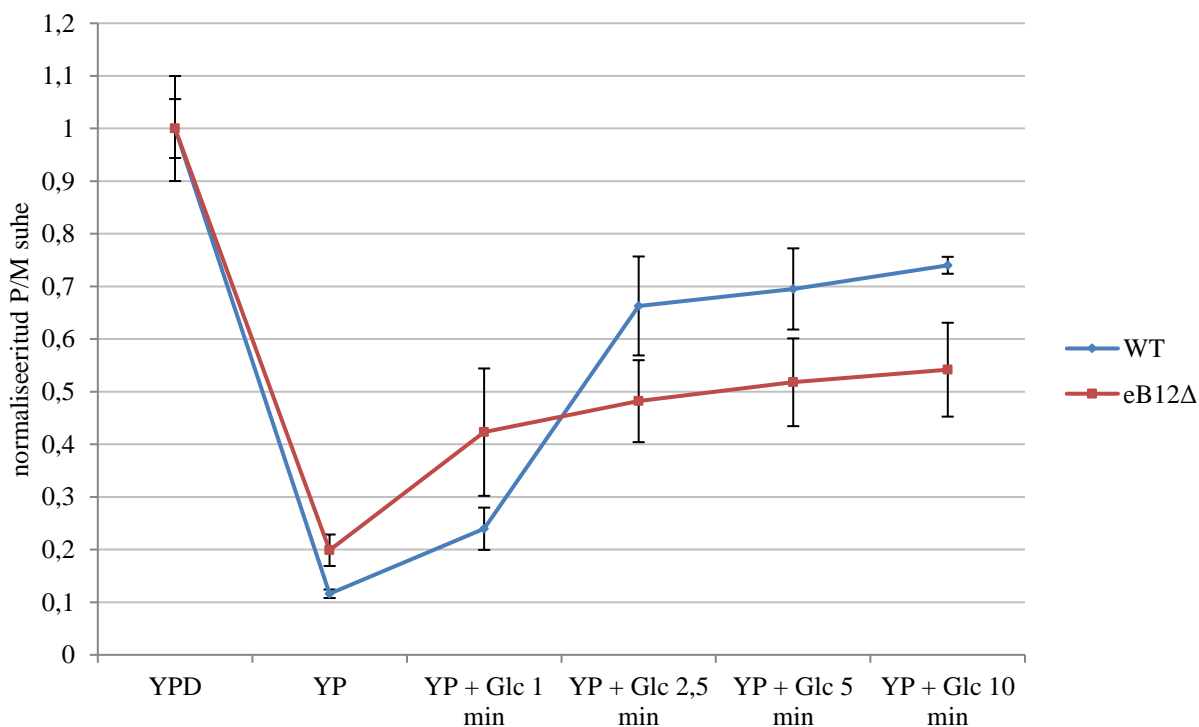
**Joonis 16. Normaliseeritud P/M suhted WT, eL24 kontroll, eB13Δ ja eL24Δ rakulüsaatides peale glükoosi lisamist.** Ribosoomide profiilide alusel arvutati monosoomide (M) ning polüsoomide (P) pindalad. Polüsoomide pindalad jagati vastavate monosoomide pindaladega ja saadud P/M suhed normaliseeriti YPD suhtes. „YPD“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud rikkas glükoosi sisaldavas söötmes. „YP“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita 10 minutit. „YP + Glc 1 min“, „YP + Glc 2,5 min“, „YP + Glc 5 min“, „YP + Glc 10 min“ tähistavad rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita ning seejärel kasvanud glükoosi sisaldavas söötmes vastavalt 1 minut, 2,5 minutit, 5 minutit ja 10 minutit. Joonisel on toodud vähemalt kolme katse keskmised tulemused ja standardhälbed.

Viimaseks uuriti eB12Δ (TYSC360) tüve rakkude translatsiooni mahasurumist glükoosi puudumisel ning translatsiooni taastumist peale glükoosi lisamist. Rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini, vahetati YPD sööde YP söötme vastu ning kasvatati YP söötmes 10 minutit. Seejärel lisati kultuurile glükoosi ning valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. Ribosoomide analüüsiti sahharoosi gradiendis lahutamise teel (joonis 17). WT (TYSC309) ja eB12Δ (TYSC360) tüvedes on sarnased ribosoomide profiilid kasvatamisel YPD söötmes. YP söötmes ja 1 minut peale glükoosi lisamist kasvanud eB12Δ rakkude profiilides on kõrgemad polüsoomide piigid ja madalamad



**Joonis 17. WT ja eB12Δ rakulüsaatide ribosoomide profiilid.** *S. cerevisiae* rakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Ühel osal vahetati YPD sööde YP söötme vastu. YP söötmes kasvanud rakukultuurist võeti osa rakke. Ülejäänud rakukultuurile lisati glükoosi ja seejärel valmistati rakulüsaadid 1 minuti, 2,5 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödumisel. 20 OD<sub>260</sub> ekvivalentühikut rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifugimise teel ja visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on sahharoosi kontsentratsioon, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katses kasutati WT (TYSC309) ja eB12Δ (TYSC360) rakke.

monosoomide piigid kui samades tingimustes kasvanud WT rakkude profiilides. 2,5 minuti peale glükoosi lisamist kasvanud eB12 $\Delta$  rakkude ribosoomide profiilides on madalamad monosoomide ja polüsoomide piigid võrreldes WT ribosoomide profiilides olevate piikidega. 5 minuti ja 10 minuti peale glükoosi lisamist kasvanud WT ja eB12 $\Delta$  rakkude profiilid on sarnased 2,5 minutil saadud profiilidega. Ribosoomide profiile kasutades määrati P/M suhted ning normaliseeriti neid YPD söötmes kasvanud rakkude P/M suhte vastu. Normaliseeritud P/M analüüsist järeldati, et pärast glükoosi lisamist söötmesse eB12 $\Delta$  tüvi rakkude P/M suhe taastub aeglasemalt kui WT rakkude P/M suhe (joonis 18).



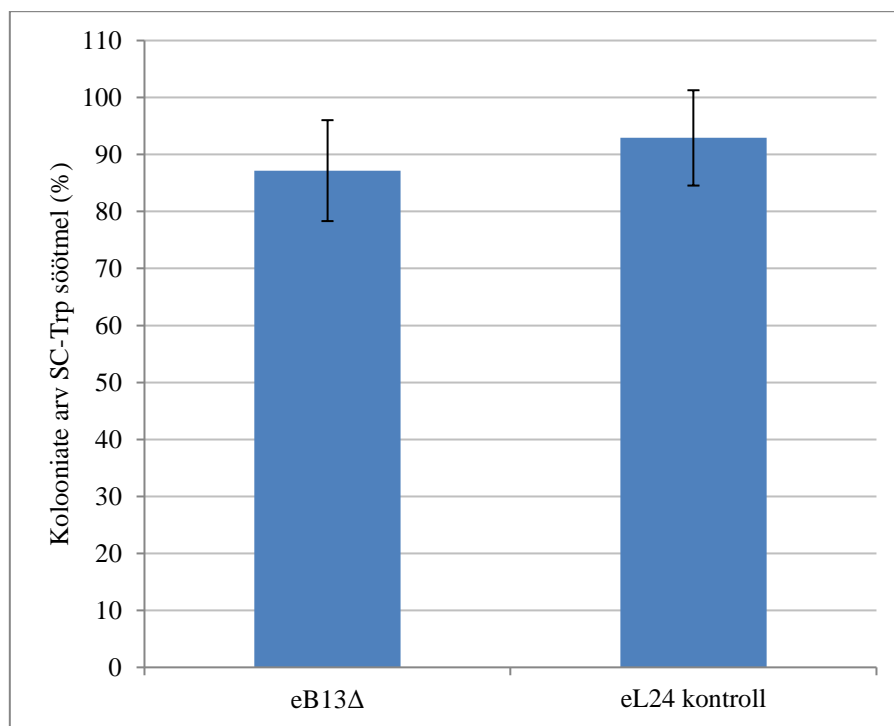
**Joonis 18. Normaliseeritud P/M suhted WT ja eB12 $\Delta$  rakulüsaatides peale glükoosi lisamist.** Ribosoomide profiilide alusel arvutati monosoomide (M) ning polüsoomide (P) pindalad. Polüsoomide pindalad jagati vastavate monosoomide pindaladega ja saadud P/M suhted normaliseeriti YPD suhtes. „YPD“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud rikkas glükoosi sisaldavas söötmes. „YP“ tähistab rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita 10 minutit. „YP + Glc 1 min“, „YP + Glc 2,5 min“, „YP + Glc 5 min“, „YP + Glc 10 min“ tähistavad rakukultuuri, mis on kasvanud ilma glükoosita ning seejärel kasvanud glükoosi sisaldavas söötmes vastavalt 1 minut, 2,5 minutit, 5 minutit ja 10 minutit. Joonisel on toodud vähemalt kolme katse keskmised tulemused ja standardhälbed.

### 2.3.4 Plasmidi säilimise analüüs

eL24 $\Delta$  ja eB13 $\Delta$  rakkude P/M suhete analüüs näitas, et esimesel minutil peale glükoosi lisamist on mõlemas tüves kõrgenenud P/M suhe võrreldes metsiktüübiga. eB13 $\Delta$  rakkudes on deleteeritud mõlemad *RPL24A* ja *RPL24B* geenid ning eluks mittehädavajalik eL24<sub>1-65</sub> valk on ekspresseeritud *TRP1* markeriga plasmiidilt. On võimalik, et eB13 $\Delta$  fenotüüp on sarnane eL24 $\Delta$  fenotüübile seetõttu, et eB13 $\Delta$  tüve rakkud ei säilita eL24<sub>1-65</sub> valku ekspresseerivat plasmidi kasvades rikkas söötmes. Selle selgitamiseks analüüsiti plasmidi säilimist eB13 $\Delta$  tüves ja eL24 kontrolltüves. Rakke kasvatati YPD söötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakukultuuri optilise tiheduse järgi arvutati rakkude arv, tehti lajendused ning külvati SC või SC-Trp tassidele. Pärast tasside inkubeerimist 30°C juures loendati moodustunud kolooniad ning arvutati keskmine rakkude ellujäämise protsent SC-Trp tassidel SC tasside suhtes. SC tassidel kasvavad kõik rakud, kuna SC sisaldab kõiki eluks vajalikke nukleotiide ja aminohappeid. SC-Trp tassidel puudub trüptofaan. Kuna eL24 $\Delta$  genoomis ei ole *TRP1* geeni, mis kodeerib vajaliku ensüümi trüptofaani biosünteesi jaoks, siis eL24 $\Delta$  rakud surevad SC-Trp tassil. Transformeerimiseks kasutatud plasmiidides on olemas *TRP1* geen selektsioonimarkerina, seega ainult need rakud, mis säilitasid plasmidi, jäävad ellu SC-Trp tassil ning moodustavad kolooniad. Tulemused näitavad, et eB13 $\Delta$  rakkudes säilib valku ekspresseeriv plasmiid sarnaselt eL24 kontrolltüve rakkudega (joonis 19).

## 2.4 Arutelu

*S. cerevisiae* ribosoomis on kirjeldatud 17 subühikute vahelist silda. Neist 5 on eukariöodi spetsiifilised sillad, mis ei esine bakterites ega arhedes. Käesoleva bakalaureusetöö uurimisobjektideks on kaks eukariöodi spetsiifilist silda – eB12 ja eB13. Nende sildade põhikomponentideks on vastavalt eL19 ning eL24 valgud. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  ja eL24 $\Delta$  mutantsete ribosoomidega rakkudes translatsiooni initsiatsiooni mahasurumist glükoosi puudumise stressi tingimustes ning polüsoomide taastumist glükoosi lisamisel peale stressi. Selleks kasutati ribosoomide profiilide analüüsi. Tulemuseks on profiilide joonised, mis peegeldavad monosoomide ja polüsoomide jaotumist sahharoosi gradiendis sõltuvalt partiklite sedimentatsioonikoefitsiendist. Ribosoomide profiilide alusel arvutati monosoomide ning polüsoomide pindalad. Polüsoomide pindalad jagati vastavate monosoomide pindaladega ja saadud P/M suhted normaliseeriti YPD-s kasvanud rakukultuurist saadud P/M suhtes.



**Joonis 19. Plasmidi säilimine eB13Δ ja eL24 kontrolltöve rakkudes.** Lahjendatud rakukultuuridest külvati umbes 200 CFU SC või SC-Trp tassidele. Kolooniad loendati ning arvutati keskmine rakkude ellujäämise protsent SC-Trp tassidel SC tasside suhtes. Joonisel on toodud vähemalt kahe katse keskmised ja standardhälbed.

Töös uuriti WT, eB12Δ, eB13Δ ja eL24Δ rakkude translatsiooni mahasurumist glükoosi puudumise stressis. Saadud tulemustest selgus, et 10 minutiline glükoosi puudumine põhjustab P/M suhte järsku langust. See on kooskõlas varem avaldatud andmetega *S. cerevisiae* glükoosi puudumisel translatsiooni mahasurumise kohta (Ashe jt., 2000). Glükoosi lisamisel P/M suhe kasvas, mis viitab translatsiooni aktivatsioonile rakkudes.

Töös analüüsiti mutantide eL24Δ ja eB13Δ polüsoomide taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi. Saadud tulemuste järgi selgus, et esimesel minutil peale glükoosi lisamist tekkis eL24Δ ja eB13Δ tüvedes rohkem polüsoome võrreldes metsiktüübiga. 2,5 minutil, 5 minutil ja 10 minutil toimub polüsoomide taastumine eL24Δ ja eB13Δ rakkudes sarnaselt metsiktüübiga. eB13Δ tüves ekspresseerub eL24<sub>1-65</sub> valk plasmiidilt. eL24 kontrolltöves ekspresseerub täispikk eL24 valk plasmiidilt. Nii eL24<sub>1-65</sub> kui ka eL24 valgud ei ole eluks hädavajalikud ning seetõttu on võimalik, et kasvatamisel rikkas söötmes kaotavad transformeeritud rakud eL24<sub>1-65</sub> või eL24 valke ekspresseerivad plasmiidid. Selektiivsöötmes kasvatamisel saadud eB13Δ ja eL24 kontrolltöve rakkude ellujäämise protsent näitas, et rikkas

söötmes kasvatatud eB13 $\Delta$  mutantne tüvi säilitab valku ekspresseeriva plasmidi sarnaselt eL24 kontrolltüvega (eB13 $\Delta$  tüve puhul 87,2 $\pm$ 8,9%, eL24 kontrolltüve puhul 92,9 $\pm$ 8,4%). Seega esimesel minutil peale glükoosi lisamist toimuv metsiktüübist aktiivsem initsiatsioon on põhjustatud just eB13 silla puudumisest, mitte valgu eL24 puudumisest.

Aktiivse translatsiooni korral initsieerib enamuse 80S ribosoomidest translatsiooni mRNA molekulidelt ja moodustuvad polüsoomid, mille tulemusena P/M suhe suureneb. Glükoosi puudumisel lõpetavad ribosoomid transleerimise, kuid ei lähe uuele translatsiooni ringile ja vabanevad tsütoplasmasse. Sellel juhul langeb P/M suhe järsult. Translatsiooni initsieerimiseks on vaja dissotsieerida tsütoplasmas olevaid 80S ribosoomide, kuna initsiatsiooniks on vajalikud vabad 60S ja 40S subühikud. Tsütoplasmas olevate ribosoomidega on seondunud valk Stm1, mis blokeerib mRNA sisenemistunneli ja seega ka translatsiooni initsiatsiooni (Ben-Shem jt., 2011). Näidati, et monosoomide dissotsieerimiseks 60S ja 40S subühikuteks on vajalik valgukompleks Dom34-Hbs1 (van den Elzen jt., 2014). Dom34 või Hbs1 deletsioonimutantidel ei toimu translatsiooni taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi, kuna 80S ribosoomide dissotsieerimine subühikuteks on raskendatud (van den Elzen jt., 2014).

On teada, et eB13 $\Delta$  ribosoomide subühikute omavaheline seondumine on nõrgem võrreldes metsiktüüpi subühikutega. Kõrgel soolakontsentratsioonil dissotsieeritud subühikutega *in vitro* reassotsieerimise analüüs erinevatel Mg<sup>2+</sup> kontsentratsioonidel näitas, et WT 40S ja 60S subühikud reassotsieerivad 80S ribosoomideks 10 mM – 25 mM Mg<sup>2+</sup> kontsentratsioonidel. eB13 $\Delta$  ribosoomide subühikud moodustavad nendel Mg<sup>2+</sup> kontsentratsioonidel nn „*loose couple*“ partikleid (Kisly ja Tamm, avaldamata andmed). Need „*loose couple*“ partiklid kujutavad endast ribosoomide, kus nõrgenenud subühikute vaheliste kontaktide tõttu on muutunud partiklite kolmedimensiooniline kuju. Seega on võimalik, et eB13 $\Delta$  ribosoomide aktiivsem initsiatsioon esimesel minutil peale glükoosi lisamist on põhjustatud eB13 $\Delta$  monosoomide kiiremast dissotsiatsioonist võrreldes WT monosoomidega Dom34-Hbs1 kompleksi poolt (eB13 $\Delta$  tüve puhul P/M suhe on 0,43 $\pm$ 0,06, WT puhul 0,24 $\pm$ 0,04).

Käesolevas töös analüüsiti ka mutandi eB12 $\Delta$  polüsoomide taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi. Saadud tulemuste järgi selgus, et eB12 $\Delta$  rakkude P/M suhe ei vähene glükoosi puudumisel WT tasemeni (eB12 $\Delta$  tüve puhul 0,20 $\pm$ 0,03, WT puhul 0,13 $\pm$ 0,04). On teada, et eB12 $\Delta$  rakkudel on aktiveeritud üldine stressivastus. Näidati, et eB12 $\Delta$  rakkudel on üleekspressioneeritud üldise stressivastuse geenid *HSP12*, mille mRNA tase on 2,1 korda suurem võrreldes metsiktüübiga ning *CTT1*, mille mRNA tase on 1,3 korda suurem võrreldes

metsiktüübiga (Kisly jt., 2016). WT tasemest suurem eB12Δ rakkude P/M suhe glükoosi puudumisel võib olla põhjustatud üldise stressivastuse geenide kõrgema ekspressiooniga võrreldes metsiktüübiga.

Saadud tulemused näitasid ka, et eB12Δ rakkudes on aeglasem polüsoomide taastumine glükoosi lisamisel võrreldes WT rakkudega. Pärast glükoosi puudumist 10 minutit glükoosi sisaldavas söötmes kasvanud eB12Δ rakkude P/M suhe on  $0,54 \pm 0,09$ ; samas tingimustes kasvanud WT rakkude P/M suhe on  $0,74 \pm 0,02$ . On teada, et eB12Δ ribosoomide subühikute omavaheline seondumine on palju nõrgem võrreldes metsiktüüpi subühikutega. Kõrgel soolakontsentratsioonil dissotsieeritud subühikutega *in vitro* reassotsieerimise analüüs erinevatel  $Mg^{2+}$  kontsentratsioonidel näitas, et WT 40S ja 60S subühikud reassotsieerivad 80S ribosoomideks 10 mM – 25 mM  $Mg^{2+}$  kontsentratsioonidel. eB12Δ ribosoomide subühikud ei reassotsieeri isegi 25 mM  $Mg^{2+}$  juuresolekul (Kisly jt., 2016). On võimalik, et eB12Δ ribosoomide nõrgenenud subühikute omavaheline seondumine põhjustab konformatsioonilisi muutusi, mille tõttu Dom34-Hbs1 kompleks seondub nõrgemini tsütoplasmas olevate 80S ribosoomidega ning ei saa neid subühikuteks dissotsieerida. Selle tulemusel on eB12Δ rakkudes aeglasem translatsiooni initsiatsioon pärast glükoosi lisamist.

On näidatud, et initsiatsioonifaktor eIF4G seondub 40S subühikuga mRNA väljumistunneli lähedal, mille juures paikneb silla eB12 moodustamisel osalev ES6S lisasegment (Ben-Shem jt., 2011; Marintchev jt., 2009). Seega on võimalik, et eL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliksi puudumine mõjutab eIF4G seondumist 40S subühikuga translatsiooni initsiatsiooni lõppstaadiumil, mille tõttu polüsoomid ei taastu metsiktüübi tasemeni glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti ribosoomi subühikute vaheliste eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 olulisust glükoosi puudumise stressi järgsel translatsiooni taastumisel *S. cerevisiae* rakkudes. Need sillad on moodustatud vastavalt eukariöodi spetsiifiliste r-alkude eL19 ja eL24 pikkadest C-terminaalsetest  $\alpha$ -heeliksitest. Kuna sillad eB12 ning eB13 paiknevad ribosoomi välispinnal, siis arvatakse, et sillad eB12 ja eB13 mängivad rolli translatsiooni initsiatsioonil.

Glükoos on peamine energiaallikas rakkudele ning selle puudumisel on vaja kiiresti vähendada oma energia tarbimist eelkõige translatsiooni mahasurumisega, kuna translatsioon on energiakulukas protsess. Translatsiooni mahasurumine on pöörduv protsess - glükoosi lisamisel söötmesse translatsioon rakkudes taastub.

Käesolevas töös kasutati mutante eL24 $\Delta$  ja eB12 $\Delta$ . Mutandi eB12 $\Delta$  genoomist on deleteeritud mõlemad *RPL19A* ja *RPL19B* geenid ning plasmiidilt on ekspresseeritud pagaripärmi eL19 valgu 146 N-terminaalset aminohappejääki. Mutandi eL24 $\Delta$  genoomist on deleteeritud mõlemad *RPL24A* ja *RPL24B* geenid. Seda tüve kasutades tehti kaks uut tüve: esimeses ekspresseeriti plasmiidilt täispikka pagaripärmi eL24 valku (eL24 kontrolltüvi) ning teises ekspresseeriti ainult 65 N-terminaalset aminohappejääki (mutant eB13 $\Delta$ ).

Töö esimeses osas uuriti, kui kiiresti metsiktüübi, eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  ja eL24 $\Delta$  pagaripärmi rakkudes surutakse translatsioon maha glükoosi puudumisel. Selleks kasutati ribosoomide profiilide analüüsi. Selgus, et 10 minutiline rakkude kasvatamine ilma glükoosita söötmes on piisav selleks, et rakkudes olevad ribosoomid lõpetaksid translatsiooni. Ribosoomide profiilid näitavad nendes tingimustes polüsoomide piikide kadumist ning mažoorse monosoomide piigi teket.

Töö teises osas iseloomustati metsiktüübi, eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  ja eL24 $\Delta$  rakkudes toimuvat polüsoomide taastumist glükoosi lisamisel peale glükoosi puudumise stressi kasutades ribosoomide profiilide analüüsi. Selgus, et eB13 silla puudumisel initsieerivad ribosoomid kiiremini translatsiooni peale glükoosi lisamist võrreldes metsiktüübi ribosoomidega. Ribosoomid, milles puudub eB12 sild taastavad translatsiooni oluliselt aeglasemalt võrreldes metsiktüübi ribosoomidega.

## SUMMARY

### **Role of *Saccharomyces cerevisiae* ribosome eukaryote specific bridges eB12 and eB13 in translation initiation after glucose depletion stress.**

Evgeniy Brik

Ribosome is a ribozyme, which is composed of rRNA molecules and ribosomal proteins. Ribosome carries out translation – one of the most important processes in organisms across all kingdoms of life. Prokaryotic and eukaryotic ribosomes have universally conserved common core in their catalytic site. However, prokaryotic and eukaryotic ribosomes differ in size – eukaryotic ribosome is about 1,4 times bigger than prokaryotic ribosome. It is due to presence of eukaryote specific ribosomal proteins, eukaryote specific protein domains and rRNA expansion segments. Eukaryote *S. cerevisiae* ribosome has a sedimentation coefficient of 80S and it is composed of small 40S and large 60S subunits. During translation, 40S and 60S subunits interact with each other by intersubunit bridges. There are 12 conserved bridges and 5 eukaryote specific bridges in *S. cerevisiae* ribosome. Two eukaryote specific intersubunit bridges eB12 and eB13 have similar architecture. Bridge eB12 consists of large subunit protein eL19, small subunit proteins uS17, eS7 and 18S rRNA expansion segment ES6S. Bridge eB13 consists of large subunit protein eL24 and uL3, small subunit protein eS6 and 18S rRNA helices h6 and h10. Since bridges eB12 and eB13 are located on the ribosome surface, it is speculated that they are involved in translation initiation. Main part of the eB12 bridge is C-terminal  $\alpha$ -helical domain of the eL19 protein. This protein is encoded by two paralogous genes *RPL19A* and *RPL19B*. Deletion of both *RPL19A* and *RPL19B* is lethal, which indicates that eL19 protein is an essential protein for yeast cells. Main part of the eB13 bridge is C-terminal  $\alpha$ -helical domain of the eL24 protein. This protein is encoded by two paralogous genes *RPL24A* and *RPL24B*. It has been shown that cells remain viable after deletion of both *RPL24A* and *RPL24B* genes.

Glucose is a main carbon- and energy source for baker's yeast cells. Glucose starvation directs cells to minimize their energy consumption. Translation is a highly energy consuming process, so glucose depleted cells suppress their translation. Suppression of the translation is a reversible process and translation restores with glucose addition to the growth medium. *S. cerevisiae* cells have three signaling pathways related to glucose, which act on translation: main glucose repression / derepression pathway, hexose transporter induction pathway and cAMP-dependent

protein kinase pathways. It is currently not known which factors transduce signal from these pathways to the translation machinery.

eL24 $\Delta$  and eB12 $\Delta$  *S. cerevisiae* mutants were used in this work. Strain eL24 $\Delta$  lack both *RPL24A* and *RPL24B* genes and therefore the protein eL24 is not expressed. This strain was used to make strains eB13 $\Delta$  and eL24 control, which have plasmids expressing truncated 65 N-terminal amino acids long eL24 protein (eL24<sub>1-65</sub>) or expressing full-length eL24 protein, respectively. Strain eB12 $\Delta$  lack both *RPL19A* and *RPL19B* genes in its genome and expresses from plasmid a truncated 146 N-terminal amino acids long eL19 protein.

The first aim of this study was to investigate how effectively eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  or eL24 $\Delta$  cells suppress their translation in glucose depletion stress. It was concluded that 10 minutes of glucose depletion is enough to suppress translation in yeast cells of all strains used in this work. As seen from ribosome profiles, glucose starvation leads to decreasing polysome peaks but in the same time increasing monosome peaks. It indicates that most of 80S ribosomes finished translation, but remained in cytoplasm in „standby mode“. Based on ribosome profiles, the polysome / monosome ratios (P/M ratios) were calculated. P/M ratios showed that 20 minutes, 40 minutes and 60 minutes of glucose depletion does not change amounts of polysomes and monosomes.

The second aim of this study was to figure out, how eB12 $\Delta$ , eB13 $\Delta$  and eL24 $\Delta$  cells restore their translation when glucose depletion stress was stopped by glucose addition to the growth media. Firstly, cells lacking bridge eB13 in their ribosomes (i.e. eB13 $\Delta$  and eL24 $\Delta$  cells) show more effective translation restoration than wild type cells at the first minute after glucose addition. There were no difference between translation restore of wild type ribosomes and eB13 lacking ribosomes at other time points. Based on ribosome profiles, P/M ratios were calculated. P/M ratios confirmed that difference occurs only at first minute after glucose depletion stress. It was proposed that eB13 $\Delta$  loses its eL24<sub>1-65</sub> expressing plasmid growing in rich medium and turns into eL24 $\Delta$  strain. It could explain similar phenotypes of eB13 $\Delta$  and eL24 $\Delta$  cells. To test this possibility, a plasmid maintaining analysis of eB13 and eL24 control strains was performed. Both strains were made by transformation with *TRP1* marker bearing plasmid, expressing eL24<sub>1-65</sub> or full length eL24 protein. eB13 $\Delta$  showed similar to eL24 control survival rate on synthetic complete medium lacking tryptophan. It was concluded that rapid translation restore at first minute after glucose addition to the growth medium is caused by bridge eB13 loss, but not eL24 protein loss. It was suggested that this effect is due to weaker interactions between 40S and 60S in mutant cells. Translation restore requires dissociation of 80S ribosomes in cytoplasm by

Dom34-Hbs1 complex. If interactions between ribosome subunits are weaker, then Dom34-Hbs1 may dissociate ribosomes into subunits more rapidly in comparing to wild type ribosomes. Secondly, cells containing ribosomes that lack eB12 bridge show much slower restoration of translation than wild type cells after glucose addition to the growth medium. At first minute after glucose addition to the growth medium eB12 $\Delta$  cells show higher polysome peaks and lower monosome peaks in comparing with wild type cells. But then, after 2,5 minute of glucose addition to the growth medium, eB12 $\Delta$  polysome peaks are lower and monosome peaks are higher than in wild type ribosome profiles. It was suggested that weakened interactions between 40S and 60S subunits due to loss of the eB12 may cause conformational changes in Dom34-Hbs1 binding site. Consequently Dom34-Hbs1 is unable to effectively bind and dissociate 80S ribosome into free subunits. It was also speculated that affected restoration of translation is due to conformational changes in ES6S in absence of eL19 that influences eIF4G binding ability to 40S subunit.

## TÄNUSÕNAD

Autor tänab selle töö juhendajaid Ivan Kisly ja Tiina Tamm targa juhendamise, keeruliste teadmiste selgitamise ning erilise kannatlikkuse eest. Samuti autor avaldab tänu oma vanematele ning molekulaarbioloogia labori juhatajale professor Jaanus Remmele moraalse toetuse eest. Lisaks autor tänab molekulaarbioloogia labori meeskonda sõbraliku, abivalmi ja toreda seltskonna loomise eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Amberg, D. C., Burke, D. J., Strathern, J. N. 2005. Measuring Yeast Cell Density by Spectrophotometry, p. 164. *In* Amberg, D. C, Burke, D. J., Strathern, J. N., *Methods in Yeast Genetics*, 2005 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
2. Armache, J.-P., Anger, A. M., Marquez, V., Franckenberg, S., ..., Wilson, D. N. (2013). Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: Implications for eukaryotic ribosome evolution. *Nucleic Acids Research*, 41 (2): 1284-1293.
3. Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A. M., ..., Beckmann, R. (2010). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (46): 19748-19753.
4. Ashe, M. P., De Long, S. K. and Sachs, A. B. (2000). Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 833-848.
5. Baronas-Lowell, D. M. and Warner, J. R. (1990). Ribosomal Protein L30 Is Dispensable in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10: 5235-5243.
6. Ben-Shem, A., de Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3,0 Å Resolution. *Science*, 334: 1524-1529.
7. Castelli, L. M., Lui, J., Campbell, S. G., ..., Ashe, M. P. (2011). Glucose depletion inhibits translation initiation via eIF4A loss and subsequent 48S preinitiation complex accumulation, while pentose phosphate pathway is coordinately up-regulated. *Molecular Biology of the Cell*, 22 (18): 3379-3393.
8. Chan, Y.-L., Lin, A., McNally, J., Peleg, D., Meyuhas, O. and Wool, I. G. (1987). The Primary Structure of Rat Ribosomal Protein L19. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 1111-1115.
9. De Ley, J. (1964). Sedimentation coefficients of yeast ribosomes. *Journal of general microbiology*, 37: 153-156.
10. Dresios, J., Derkatch, I. L., Liebman, S. W. and Synetos, D. (2000). Yeast Ribosomal Protein L24 Affects the Kinetics of Protein Synthesis and Ribosomal Protein L39 Improves Translational Accuracy, While Mutants Lacking Both Remain Viable. *Biochemistry*, 39: 7236-7244.

11. Dresios, J., Panopoulos, P., Frantziou, C. P. and Synetos, D. (2001). Yeast Ribosomal Protein Deletion Mutants Possess Altered Peptidyltransferase Activity and Different Sensitivity to Cycloheximide. *Biochemistry*, 40: 8101-8108.
12. Dunkle, J. A., Wang, L., Feldman, M. B., Pulk, A., Chen, V. B., Kapral, G. J., Noeske, J., Richardson, J. S., Blanchard, S. C., Cate, J. H. D. (2011). Structures of the Bacterial Ribosome in Classical and Hybrid States of tRNA Binding. *Science*, 332: 981-984.
13. Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J., Harashima, S. and Hinnebusch, A. G. (1991). GCD2, a Translational Repressor of the *GCN4* gene, Has a General Function in the Initiation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 3203-3216.
14. Gartmann, M., Blau, M., Armache, J.-P., Mielke, T., Topf, M. and Beckmann, R. (2010). Mechanism of eIF6-mediated Inhibition of Ribosomal Subunit Joining. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (20): 14845-14851.
15. Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Bürger, J., Mielke, T. & Spahn, C. M. T. (2016). Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution. *Nature Communications*, 7: 13521.
16. Horan, L. H., Noller, H. F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (12): 4881-4885.
17. Kisly, I., Gulay, S. P., Mäeorg, U., Dinman, J. D., Remme, J. and Tamm, T. (2016). The Functional Role of eL19 and eB12 Intersubunit Bridge in the Eukaryotic Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 428: 2203-2216.
18. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15 (10B): 963-972.
19. Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.-C., Moras, D., Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Research*, 30 (24): 5382-5390.
20. Marintchev, A., Edmonds, K. A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenbereg, N., Wagner, G. (2009). Topology and Regulation of the Human eIF4A/4G/4H Helicase Complex in Translation Initiation. *Cell*, 136 (3): 447-460.

21. Melnikov, S., Ben-Shem, A., de Loubresse, N. G., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19 (6): 560-567.
22. Noller, H. F., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Cate, J. H. D. (2002). Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Letters*, 514 (1): 11-16.
23. Planta, R. J., Mager, W. H. (1998). The list of Cytoplasmic Ribosomal Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 471-477.
24. Pöll, G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford, J. L. Jr, Tschoncher, H., Milkereit, P. (2009). rRNA Maturation in Yeast Cells Depleted of Large Ribosomal Subunit Proteins. *PLOS One*, 4 (12): e8249.
25. Rodnina, M. V., Beringer, M., Wintermeyer, W. (2007). How ribosomes make peptide bonds. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (1): 20-26.
26. Smith, T. F., Lee, J. C., Gutell, R. R. and Hartman, H. (2008). The origin and evolution of the ribosome. *BioMed Central*, 3: 16.
27. Song, J. M., Cheung, E., Rabinowitz, J. C. (1996). Organization and characterization of the two yeast ribosomal protein YL19 genes. *Current Genetics*, 30: 273-278.
28. Spahn, C. M. T., 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.
29. Steffen, K. K., McCormick, M. A., Pham, K. M., MacKay, V. L., Delaney, J. R., Murakami, C. J., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K. (2012). Ribosome Deficiency Protects Against ER Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191: 107-118.
30. Taylor, M. M., Storck, R. (1964). Uniqueness of bacterial ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52: 958-965.
31. Thiebeauld, O., Schepetilnikov, M., Park, H.-S., Geldreich, A., Kobayashi, K., Keller, M., Hohn, T., Ryabova, L. A. (2009). A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *The EMBO Journal*, 28 (20): 3171-3184.
32. Van den Elzen, A. M. G., Schuller, A., Green, R. & Seraphin, B. (2014). Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. *The EMBO Journal*, 33 (3): 265-276.
33. Özcan, S. (2002). Two Different Signals Regulate Repression and Induction of Gene Expression by Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (49): 46993-46997.

34. Özcan, S., Johnston, M. (1995). Three Different Regulatory Mechanisms Enable Yeast Hexose Transporter (*HXT*) Genes To Be Induced by Different Levels of Glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 1564-1572.
35. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5,5 Å Resolution. *Science*, 292: 883-896.
36. Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., Noller, H. F. (2001). The Path of Messenger RNA through the Ribosome. *Cell*, 106 (2): 233-241.
37. Zhou, F., Roy, B., von Arnim, A. G. (2010). Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biology*, 10: 193.

# LIHTLITSENS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Evgeniy Brik

(sünnikuupäev: 07.05.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

*Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi eukariöodi spetsiifiliste sildade eB12 ja eB13 roll translatsiooni initsiatsioonil peale glükoosi puudumise stressi,

mille juhendajad on MSc Ivan Kisly ja PhD Tiina Tamm,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.12.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017