

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* kasvutingimuste
optimeerimine antibiootikumitundlikkuse hindamiseks**

Bakalauruse töö

12 EAP

Taavi Tamm

Juhendaja: PhD Margus Leppik

TARTU 2026

INFOLEHT

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* kasvutingimuste optimeerimine antibiootikumitundlikkuse hindamiseks.

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on oluline mudelorganism eukarüootse ribosoomi biogeneesi ja translatsiooni uurimisel. Antibiootikumitundlikkuse määramine võimaldab hinnata ribosoomi talitluslikke muutusi, kuid usaldusväärsete tulemuste saamiseks peavad kasvutingimused võimaldama optimaalset kasvu ja mõõtmistulemused olema reprodutseeritavad. Käesoleva töö eesmärk oli optimeerida pärmis kasvutingimusi 96-süvendilisel mikrotiiterplaadil vedelkultuuris, mis võimaldaks reprodutseeritavat generatsiooniaegade määramist erinevate söötmete ja inhibiitorite tingimustes ning kasutada optimeeritud tingimusi erinevate pärmitüvede tsükloheksimiiditundlikkuse hindamiseks IC_{50} väärtuste kaudu. Töö tulemusena kohandati kasvutingimusi *BMG Labtech POLARstar Omega* mikroplaadilugejas, mis võimaldasid erinevate pärmitüvede antibiootikumitundlikkust vedelkultuuris hinnata.

Märksõnad: ribosoom, rRNA, modifikatsioonid, antibiootikumitundlikkus, IC_{50}

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Optimization of growth conditions of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the assessment of antibiotic sensitivity

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an important model organism for studying eukaryotic ribosome biogenesis and translation. Determining antibiotic sensitivity makes it possible to study functional changes in the ribosome, but to obtain reliable results, the growth conditions must allow optimal growth and the measurement results must be reproducible. The aim of this study was to optimize the growth conditions of yeast in liquid culture on a 96-well microtiter plate, which would enable the reproducible determination of generation times under different medium and inhibitor conditions, and to use the optimized conditions to assess the cycloheximide sensitivity of different yeast strains through IC_{50} values. As a result of the work, growth conditions were adapted in a BMG Labtech POLARstar Omega microplate reader, enabling the antibiotic sensitivity of different yeast strains to be evaluated in liquid culture.

Märksõnad: ribosome, rRNA, modifications, antibiotic sensitivity, IC_{50}

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

SISUKORD

SISUKORD.....	3
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Ribosoom	6
1.2 rRNA modifikatsioonid.....	6
1.3 Translatsioon	9
1.4 Antibiootikumid.....	11
1.5 rRNA modifikatsioonid ja antibiootikumitundlikkus	13
2.0 EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjalid ja metoodika	15
2.2.1 Kasutatud söötmed ja tüved	15
2.2.2 Rakkukultuuride ettevalmistus.....	17
2.2.3 Andmetöötlus.....	18
2.2.4 Transformatsioon.....	19
2.2.5 AI kasutus.....	19
2.3 Tulemused ja arutelu	20
Kokkuvõte	30
SUMMARY	31
Kasutatud kirjandus	33
LISAD	39
Lisa 1.....	39
Lisa 2.....	40

Kasutatud lühendid

aa-tRNA – *aminoacyl-RNA* (aminoatsüül-tRNA)

CHX – *cycloheximide* (tsükloheksimiid)

eIF – *eukaryotic initiation factor* (eukarüootne initsiatsioonifaktor)

eEF – *eukaryotic elongation factor* (eukarüootne elongatsioonifaktor)

eRF – *eukaryotic release factor* (eukarüootne vabastamisfaktor)

IC – *inhibiting concentration* (inhibeeriv kontsentratsioon)

Met-tRNA_i – *initiator methionyl-tRNA* (initsiaator-metionüül-tRNA)

MFC – *multifactor complex* (mitme faktori kompleks)

OD – *optical dilution* (optiline hajuvus)

PIC – *preinitiation complex* (preinitsiatsiooni kompleks)

PTC – *peptidyltransferase centre* (peptidüültransferaasne keskus)

RNP – *ribonucleoprotein* (ribonukleoproteiin)

rpm – *rotations per minute* (rotatsioonide arv minutis)

TC – *ternary complex* (kolmikkompleks)

UTR – *untranslated region* (mittetransleeriv piirkond)

Sissejuhatus

Valgusüntees ehk translatsioon on kõigi elusorganismide üks kesksemaid rakulisi protsesse, mille käigus sünteesitakse mRNA järjestuse alusel valgud. Seda protsessi viib läbi ribosoom, mis koosneb ribosomaalsest RNA-st ja ribosomaalsetest valkudest. Ribosoomi täpne ja efektiivne töö sõltub lisaks selle põhikomponentidele ka ribosomaalse RNA keemilistest modifikatsioonidest, mis paiknevad sageli ribosoomi funktsionaalselt olulistes piirkondades. Sellised modifikatsioonid võivad mõjutada ribosoomi struktuuri, translatsiooni efektiivsust ja täpsust ning raku kohanemist erinevate stressitingimustega.

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on laialdaselt kasutatav eukarüootne mudelorganism, mille abil saab uurida ribosoomi funktsioneerimist ja translatsiooni mõjutavaid tegureid. Kuna pärmi ribosoom on paljuskorral konserveerunud teiste eukarüootide, sealhulgas inimese ribosoomiga, võimaldab selle uurimine saada laiemalt rakendatavaid teadmisi eukarüootse valgusünteesi regulatsiooni kohta. Varasemad uuringud on näidanud, et teatud 25S rRNA modifikatsioonide puudumine võib põhjustada pärmirakkudes aeglustunud kasvu, külm tundlikkust ja vähenenud valgusünteesi aktiivsust. Samas ei ole uuritud, kuidas nende modifikatsioonide puudumine mõjutab rakkude tundlikkust translatsiooni inhibeervate ühendite suhtes.

Antibiootikumide ja teiste translatsiooni inhibiitorite tundlikkuse määramine on oluline meetod ribosoomi funktsionaalsete muutuste hindamiseks. Traditsiooniliselt kasutatakse pärmirakkude keemilise tundlikkuse määramiseks plaatimismeetodeid, mille eeliseks on lihtsus ja kättesaadavus, kuid mille puudusteks on suur töömaht ja märkimisväärne ressursikulu. Vedelkultuuris mikrotiiterplaadil põhinev kasvukiiruse mõõtmine võimaldab hinnata rakkude kasvu dünaamilisemalt ja kvantitatiivsemalt ning sobib seetõttu antibiootikumitundlikkuse täpsemaks määramiseks. Selleks tuleb aga optimeerida katsetingimusi nii, et mõõtmistulemused oleksid stabiilsed, reprodutseeritavad ja võrreldavad erinevate tüvede vahel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimeerida *Saccharomyces cerevisiae* kasvutingimusi 96-süvendilisel mikrotiiterplaadil vedelkultuuris ning testida optimeeritud tingimusi erinevate *S. cerevisiae* tüvede tsükloheksiimiiditundlikkuse hindamiseks IC_{50} väärtuste määramise kaudu.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ribosoom

Ribosoom on valgusünteesi ehk translatsiooni läbiviiv rakuline kompleks. Translatsiooni käigus lisab ribosoom kasvavasse polüpeptiidahelasse 10-20 aminohapet sekundis, säilitades seejuures suure täpsuse, tehes vaid 1 vea 3000 valguahelasse lülitatava aminohappe kohta (Wilson ja Nierhaus, 2003). Kõik ribosoomid koosnevad kahest alaühikust, millest suurem sisaldab peptidüültransferaasset keskust (PTC), vastutades aminohappe lülitamise eest valguahelasse (Nissen et al., 2000). Väiksem sisaldab dekodeerivat tsentrit, vastutades õige transport RNA (tRNA) valiku ja sellega korrektse aminohappe valiku eest (Ogle et al., 2001). Pärmseene *Saccharomyces cerevisiae* eukarüootne ribosoom sisaldab nelja ribosomaalse RNA (rRNA) molekuli ja 79 erinevat valku (Ben-Shem et al., 2010). Suur 60S alaühik koosneb kolmest rRNA molekulist (25S; 5,8S; 5S) ja 46-st valgust ning väike 40S alaühik sisaldab ühte 18S rRNA ahelat, ning 33 valku (Ben-Shem et al., 2010).

Translatsiooni käigus liiguvad tRNA molekulid ribosoomis järjestikku läbi kolme seondumissaidi: A-, P- ja E-saidi. A ehk aminoatsüül-sait võtab koodoni ja antikoodoni paardumise põhjal vastu uue aminoatsüül-tRNA (aa-tRNA) molekuli (Ben-Shem et al., 2010). P ehk peptidüül saidis paikneb üldjuhul kasvavat peptiidahelat kandev tRNA, kuid peale peptiidi ülekannet A-saidis asuvale aa-tRNA-le jääb P-saiti deatsetüleeritud tRNA (Wilson ja Doudna Cate, 2012). E ehk väljumissait seob deatsetüleeritud tRNA-d, enne selle väljumist ribosoomist (Wilson ja Doudna Cate, 2012). Peptiidsideme tekkimist vahendab PTC, mis paikneb suure alaühiku piirkonnas, kus A-saidi aa-tRNA ja P-saidi peptidüül-tRNA reaktiivsed 3' otsad ruumiliselt kokku tuuakse ja toimub kasvava peptiidahela ülekanne A-saidi aa-tRNA-le (Polacek ja Mankin, 2005). PTC koosneb eksklusiivselt rRNA-st, mistõttu käsitletakse PTC-d ribosüümina, ehk rRNA põhise ensüümina (Polacek et al., 2001). Sünteesitav polüpeptiidahel väljub ribosoomist peptiidi väljumistunneli kaudu, mis kaitseb kuni 50 aminohappe pikkust valguahelat proteolüütiliste ensüümide eest (Holtkamp et al., 2015).

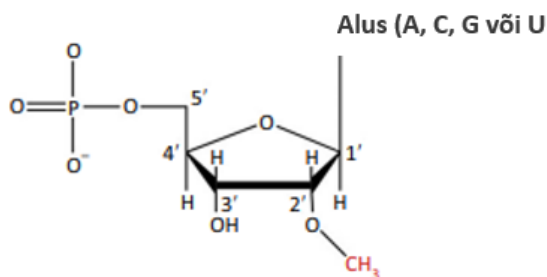
1.2 rRNA modifikatsioonid

rRNA-d läbivad transkriptsiooni ja ribosoomi biogeneesi käigus mitmeid spetsiifilisi keemilisi modifikatsioone, mille käigus muudetakse kindlates positsioonides paiknevaid nukleotiidide (Koš ja Tollervey, 2010). Eukarüootides on ligikaudu 2% rRNA nukleotiididest modifitseeritud ning need modifikatsioonid on sageli evolutsiooniliselt konserveerunud ning koonduvad

ribosoomi funktsionaalselt olulistesse piirkondadesse (Sharma ja Lafontaine, 2015; Yang et al., 2017). Pärmis on kirjeldatud 12 erinevat rRNA modifikatsiooni tüüpi (Joonis 1), mida võib esineda kokku 112 positsioonis (Taaka et al., 2016; Yang et al., 2017). Kõige levinumad rRNA modifikatsioonid on riboosi 2'-O-metüleerimine ja pseudouridüleerimine (Ψ) (Yang et al., 2017). Riboosi metüleerimisel lisatakse üks metüülgrupp riboosi 2'-OH rühmale, moodustades 2'-O-metüül sideme (Joonis 1A). Kõik neli ribonukleosiidi võivad läbida 2'-O-metüleerimise. Pseudouridiin tekib uridiini isomeriseerumisel, mille käigus pööratakse lämmastikalus 180° ümber N₃–C₆ telje (Joonis 1A). Modifikatsioonid tekivad kas väikeste tuumakese RNA-de (snoRNA) ja nendega seotud valkude moodustatud väikenukleaarse ribonukleoproteiinide (snoRNP) või eraldiseisvate spetsiifiliste modifitseerivate ensüümide vahendusel. 2'-O-metüleerimist ja pseudouridüleerimist juhivad vastavalt C/D box ja H/ACA box snoRNP-kompleksid. Mõlemas kompleksis määrab snoRNA komplementaarse järjestuse kaudu sihtkoha rRNA-s ning valguline komponent viib läbi metüleerimise või pseudouridüleerimise reaktsiooni ning pseudouridüleerimine tekib H/ACA box snoRNP-komplekside vahendusel (Kiss-László et al., 1996; Ni et al., 1997). Vähem levinud modifikatsioonid tekivad enamasti spetsiifiliste ensüümide katalüüsitud reaktsioonides (Sharma et al., 2013, 2015).

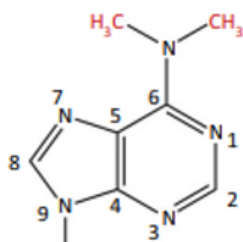
Vaatamata rRNA modifikatsioonide kõrgele konserveeritusele ja paiknemisele ribosoomi funktsionaalselt olulistes piirkondades ei põhjusta üksikute või väheste modifikatsioone suunavate snoRNA-de kaotamine, millega kaasneb vastavate modifikatsioonide kadumine rRNA-st, raku eluvõimetust (Baxter-Roshek et al., 2007). Läbi üksikute või mitmete rRNA modifikatsioonide samaaegse eemaldamise teel on võimalik uurida nende panust ribosoomi funktsioneerimisse. *S. cerevisiae* PTC piirkonnas paikneb neli evolutsiooniliselt konserveerunud 25S rRNA modifikatsiooni (Ψ 2826, Gm2619, m5C2870, Um2921) (Leppik et al., 2024). Nende nelja evolutsiooniliselt konserveerunud 25S rRNA modifikatsiooni ja kolme mittekonserveerunud 25S rRNA modifikatsiooni (Gm2922, Ψ 2880, Um2724) samaaegse puudumisega kaasneb rakkudel aeglustunud kasv, tugevam külmatundlikkus, vähenenud globaalne valgusüntees ning aktiivselt transleerivate ribosoomide osakaalu langus (Leppik et al., 2024). Kuigi on selge, et need modifikatsioonid on olulised ribosoomi optimaalseks toimimiseks, ei ole seni uuritud nende modifikatsioonide mõju translatsiooni inhibeervate antibiootikumide tundlikkusele.

(A) Riboos

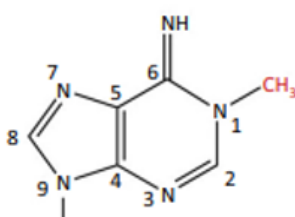


2'-O-metüleeritud nukleosiid (Nm)

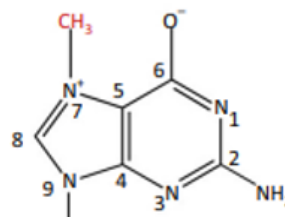
(B) Puriin



N^6, N^6 -dimetüüladenosiin (m_2^6A)

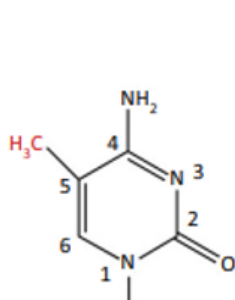


N^1 -metüüladenosiin (m^1A)

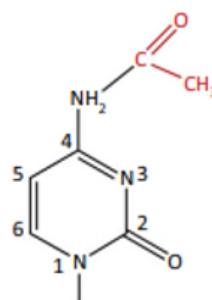


N^7 -metüülguanosiin (m^7G)

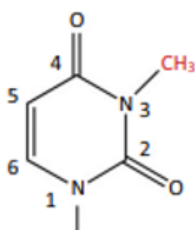
(C) Pürimidiin



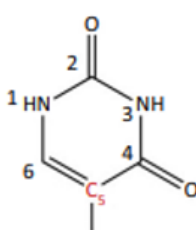
C^5 -metüülsütidiin (m^5C)



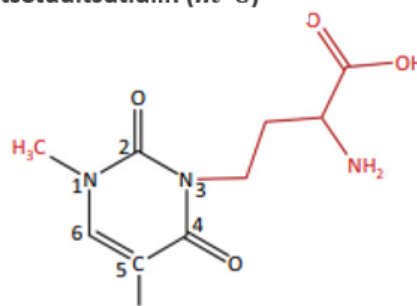
N^4 -atsetüülsütidiin (m^5C)



N^3 -metüüluridiin (m^3U)



Pseudouridiin(ψ)



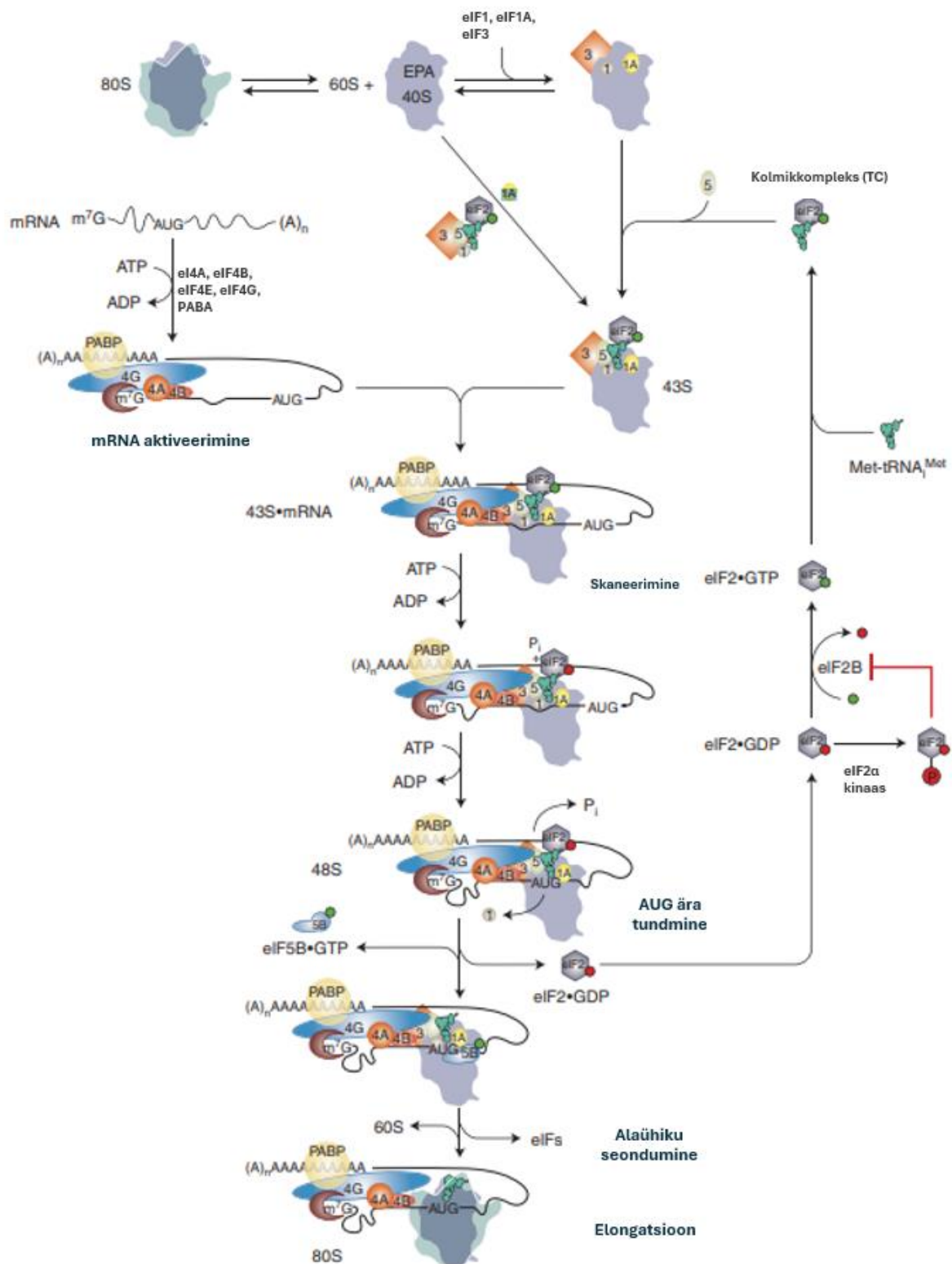
N^1 -metüül- N^3 -(3-amino-3-karboksüpropüül) pseudouridiin ($m^1acp^3ψ$)

Joonis 1. rRNA-s esinevad modifikatsioonid pärmis. Pärmis rRNA-s on kirjeldatud 12 tüüpi modifikatsiooni: kaheksa modifitseeritud lämmastikalust (kolm puriini (B) ja viis pürimidiini modifikatsiooni (C)) ning kõik neli 2'-O-metüleeritud nukleosiidi (C, G, A ja U)(A). Punasega märgitud aatomid tähistavad modifikatsioone. Kohandatud inglise keelest eesti keelde. (Sharma ja Lafontaine, 2015)

1.3 Translatsioon

Translatsioon on valgu sünteesimise protsess, mille käigus loeb ribosoom infokandja-RNA (mRNA) koodonjärjestust ning sünteesib sellele vastava aminohappelise järjestusega polüpeptiidahela. Selle protsessi toimumiseks on vajalik kahe ribosomaalse alaühiku koordineeritud koostöö (Kolář et al., 2024). Translatsiooni protsess jaguneb neljaks etapiks – initsiatsiooniks, elongatsiooniks, terminatsiooniks ja ribosoomi taaskasutamiseks (Kolář et al., 2024). Nende etappide täpseks ja järjestikuseks toimumiseks osalevad mitmed omavahel koordineeritult toimuvad translatsioonifaktorid (Kolář et al., 2024).

Eukarüootse translatsiooni initsiatsioon koosneb kahest põhietapist – 40S alaühiku seondumisest mRNA-ga ning suure 60S seondumine 48S initsiatsiooni kompleksiga. 40S alaühiku seondumiseks mRNA-ga moodustub esmalt 43S preinitsiatsiooni kompleks (PIC). Selle tekkeks seondub 40S alaühikuga kolmikkompleks (TC), mis koosneb initsiaator-metionüül-tRNA-st (Met-tRNA_i) ja GTP-ga seotud eukarüootsest initsiatsioonifaktorist eIF2 (Shin et al., 2011). TC seondumiseks 40S alaühikuga ja 43S PIC seondumiseks mRNA-ga tekib mitme faktori kompleks (MFC). MFC koosneb TC seondumisel initsiatsioonifaktoritega eIF1, eIF1A, eIF5 ja eIF3 (Joonis 2)(Asano et al., 2000). 43S PIC värbamiseks mRNA-le peab mRNA 5'-cap ots olema ette valmistatud. Selle protsessi keskne tegur on 5'-cap struktuurile seonduv eIF4F kompleks, mis koosneb initsiatsioonifaktoritest eIF4A, eIF4G ja eIF4E (Joonis 2)(Lindqvist et al., 2008). Lisaks seondub mRNA 3'-polü(A) sabaga polü(A)-siduv valk (PABP), mis interakteerub eIF4G-ga kujundades tsirkulaarse mRNA struktuuri ja seeläbi soodustab 43S PIC värbamist mRNA-le (Joonis 2)(Lindqvist et al., 2008). eIF4B on abifaktor, mis seondub eIF4A-ga ning soodustab mRNA 5' otsa mittetransleeritava piirkonna (5'-UTR) sekundaarstruktuuride lahtiharutamist (Lindqvist et al., 2008). Peale mRNA-le seondumist 5' cap lähedusse, hakkab 43S kompleks liikuma 5'-3' suunas ning skaneerib mRNA-d sobiva alguskoodoni leidmiseks (Joonis 2)(Pestova ja Kolupaeva, 2002). Sobiva translatsiooni alguskoodoni äratundmine sõltub seda ümbritsevast Kozaki järjestusest, ehk alguskoodoni lähikonnas paiknevast konserveerunud nukleotiidsest kontekstist (Kozak, 1986). Sobiva alguskoodoni äratundmine kutsub esile eIF1 eemaldumise, mis soodustab eIF2 seoselise GTP hüdrolyüüsi. Selle tulemusena vabaneb GDP-eIF2 kompleks ning skaneeriv kompleks läheb üle suletud kompleksiks, mille tulemusel kinnitub mRNA tugevamalt ribosoomi mRNA kanalisse ning moodustub 48S initsiatsiooni kompleks, millele saab suur alaühik seonduda (Joonis 2)(Lomakin et al., 2003). Suure



Joonis 2. Eukarüootse initsiatsiooni mudel. Joonisel on näidatud eukarüootse initsiatsiooni etapid ja osalevad initsiatsioonifaktorid. Kohandatud inglise keelest eesti keelde. (Hinnebusch ja Lorsch, 2012)

alaühiku seondumisel vabanevad eIF5 ja eIF1A, initsiaator-tRNA liigub P-saiti ning moodustub translatsiooniks valmis 80S initsiatsioonikompleks (Joonis 2)(Jackson et al., 2010).

Elongatsioon algab järgmise aa-tRNA seondumisega A saiti. Kogu elongatsiooni vältel seondub ribosoomiga uus aa-tRNA kolmikkompleksina. Kolmikkompleks koosneb aa-tRNA-st ja GTP-eEF1A-st, kus GTP-eEF1A vahendab aa-tRNA seondumist A-saiti ning sobiva koodon-antikoodon paardumise korral mRNA-ga hüdrolyüsib GTP GDP-ks, mis põhjustab eEF1A-GDP eraldumise ribosoomist. See võimaldab aa-tRNA-l täielikult A-saiti paigutada ja valmistab kompleksi ette järgmiseks reaktsiooniks (Xu et al., 2022). Järgmine samm peale õige aa-tRNA akomodeerumist A-saiti on PTC poolt katalüüsitud peptiidahela ülekanne ja uue peptiidsideme loomine. Selle käigus katalüüsitakse peptiidahela ülekanne P-saidis oleva tRNA-lt A-saidis asuvale aa-tRNA-le, mille käigus pikeneb peptiidahel ühe aminohappe võrra (Xu et al., 2022). Tulemuseks on ühe aminohappe võrra pikenenud peptiidahel A-saidis paikneval tRNA-l, P-saiti jääb deatsetüleeritud tRNA. Järgmisena seondub ribosoomiga GTP-eEF2 kompleks, mille GTP hüdrolyüs annab energia tRNA-mRNA kompleksi translokeerumiseks – A saidist P saiti, ning P saidist E saiti, kust deatsetüleeritud tRNA eemaldub ribosoomist ja mRNA-st (Xu et al., 2022).

Terminatsioon algab ribosoomi A-saidi jõudmisega stop-koodonini. Stop-koodoni tunneb ära vabastamisfaktor eRF1, mis seondub tRNA asemel A saiti (Hellen, 2018). Seejärel moodustab GTP-d siduv eRF3 eRF1-ga kompleksi. GTP hüdrolyüsi järel eRF1 M-domeen paigutub PTC-sse, kus põhjustab peptidüül-tRNA sideme hüdrolyüsi, mille tagajärjel vabastatakse peptiid(Hellen, 2018). ATPaas ABCE1 seondumisel ribosoomiga, ning ATP hüdrolyüsil lahutatakse ribosoom 60S ja mRNA-ga seotud 40S alaühikuteks (Hellen, 2018). mRNA vabastatakse initsiatsioonifaktorite eIF1, eIF1A, eIF3 ja eIF3j abil (Hellen, 2018).

1.4 Antibiootikumid

Antibiootikumid on bioaktiivsed ühendid, mis pärivad mikroorganismide kasvu või põhjustavad nende hukkumist. Traditsiooniliselt kasutatakse antibiootikumide mõistet meditsiinis bakterite vastu toimivate ühendite kohta, kuid laiemas mikrobioloogilises käsitluses saab terminit kasutada eukarüootsete mikroorganismide, näiteks seente, vastu toimivate ühendite kohta (Brautaset et al., 2000). Antibiootikumide klassifitseerimiseks kasutatakse mitut erinevat lähenemist, sealhulgas keemilise struktuuri või toimemehhanismi järgi. Toimemehhanismil põhinev jaotus on laialdaselt kasutatud, sest see kirjeldab, millist raku funktsiooni ühend mõjutab. Peamised rühmad, mida eristatakse on rakumembraani

kahjustavad ühendid, rakuseina sünteesi-, nukleiinhapete sünteesi- ja valgusünteesi inhibiitorid (O'Rourke et al., 2020).

Valgusünteesi inhibiitorid moodustavad antibiootikumide seas olulise klassi, sest valgusüntees on raku elutegevuseks üks hädavajalikumaid protsesse. Eukarüootse valgusünteesi ja seda mõjutatavate inhibiitorite uurimiseks kasutatakse sageli mudelorganismina *S. cerevisiae*-d, sest *S. cerevisiae* ribosoomi struktuur on suurel määral konserveerunud teiste eukarüootidega, näiteks ka inimese ribosoomiga (Spahn et al., 2001).

Tabel 1. Eukarüootse translatsiooni inhibiitorite klassid, tuntumad esindajad ja toimetemehhanismid

Inhibiitorite klass	Mõjutatav translatsiooni etapp	Peamine toimetemehhanism	Näited
PTC inhibiitorid	Peptiidsideme moodustumine	Seonduvad 60S alaühiku PTC keskusesse ning takistavad aminohappe lisamist kasvavasse peptidahelasse	Anisomütsiin, trihhodermiin
Ribosoomi translokatsiooni inhibiitorid	Elongatsioon, tRNA-mRNA kompleksi translokatsioon	Blokeerivad tRNA-mRNA kompleksi liikumist ühe koodoni võrra edasi	Tsükloheksimiid, laktimidomütsiin
Initsiatsiooni inhibiitorid	Initsiatsioon	Inhibeerivad eIF4 komplekse	Hippuristanool
Dekodeerimis-keskuse inhibiitorid	aa-tRNA valimine ja koodon-antikoodon äratundmine	Seonduvad 40S alaühiku dekodeerimiskeskusesse ning häirivad aa-tRNA korrektset valikut ja translatsiooni täpsust	Paromomütsiin, hügromütsiin B

PTC inhibiitorid takistavad peptiidsideme sünteesi peptidüültransferaasi keskuses. Trihhotetseenid kuuluvad selliste antibiootikumide hulka ning seonduvad suure alaühiku A-

saiti PTC piirkonnas, peamiselt 25S rRNA-ga (Wang et al., 2021). Nende seondumine kutsub esile 25S rRNA-s konformatsioonilisi muutusi, mis kujundavad toksiinidele sobiva sidumistasku (Wang et al., 2021). Selle tulemusena häiritakse A saidi aa-tRNA korrektset paiknemist (Wang et al., 2021).

Translokatsiooni inhibiitorid peatavad translatsiooni elongatsioonifaasis. Translokatsiooni antibiootikum tsükloheksimiid (CHX) seondub suure 60S alaühiku E-saidiga ning takistab deatsetüleeritud tRNA translokeerumist E-saiti (Shen et al., 2021). CHX seondumistasku koosneb peamiselt kahest ribosomaalsest valgust uL15 ja eL42 ning 25S rRNA-st (Shen et al., 2021). Selline struktuur, kuhu CHX seondub on eukarüootide seas tugevalt konserveerunud (Shen et al., 2021).

Iniitsiatsiooni inhibiitorid takistavad ribosoomi seondumist mRNA-ga takistades kas mRNA 5'-otsa ettevalmistamist, eIF4F kompleksi funktsioneerimist või mRNA skaneerimist 40S alaühiku poolt. Iniitsiatsiooni mõjutav antibiootikum hippuristanool sihtmärgiks on eIF4A1, mis on eIF4F-kompleksi kuuluv ATP-sõltuv RNA helikaas, mis aitab lahti harutada mRNA 5'-otsa sekundaarstruktuure (Steinberger et al., 2020). Hippuristanool seondumiskoht on eIF4A1 valgu C-terminaalse domeeniga ning lukustab selle suletud, mittefunktsionaalsesse konformatsiooni (Steinberger et al., 2020). Selle tulemusel väheneb eIF4A1 võime mRNA-d siduda ja selle struktuure avada, mis omakorda pärsib 40S ribosomaalse alaühiku efektiivset seondumist mRNA-ga (Steinberger et al., 2020).

Dekodeerimiskeskuse inhibiitorid seonduvad dekodeerimiskeskusesse ja takistades koodon-antikoodon paardumise teket. Hügomütsiin B seondub kahe alaühiku vahelise silla B2a piirkonda ning takistab eEF2 seondumist, seeläbi inhibeerib eEF2 vahendatud translokatsiooni (Zhao et al., 2025).

1.5 rRNA modifikatsioonid ja antibiootikumitundlikkus

Kuna paljud translatsiooni inhibeervad antibiootikumid seonduvad ribosoomi funktsionaalselt olulistesse piirkondadesse, võivad rRNA modifikatsioonid mõjutada rakkude tundlikkust nende ühendite suhtes (Stojković et al., 2016). rRNA modifikatsioonide puudumine võib põhjustada nii lokaalseid muutusi ribosoomis kui ka kaugmõjulisi struktuurseid ümberkorraldusi, mõjutades seeläbi ribosoomi funktsiooni ja translatsiooni efektiivsust (Leppik et al., 2024). Need muutused võivad omakorda kas soodustada või takistada antibiootikumide seondumist ribosoomile ning muuta rakkude tundlikkust translatsiooni inhibeervate ühendite suhtes

(Stojković et al., 2016). Seetõttu on rRNA modifikatsioonide rolli mõistmine eriti tähtis antibiootikumiresistentsuse uurimisel, kuna see aitab selgitada resistentsuse tekkemehhanisme ning võib aidata tuvastada uusi antibiootikumide sihtmärke resistentsuse ületamiseks.

rRNA modifikatsioonide mõju antibiootikumide tundlikkusele saab määrata mitmel viisil, millest üks võimalus on IC_{50} väärtuse määramine. Meetod kujutab endast antibiootikumi inhibeeriva kontsentratsiooni (IC) määramist, mille juures inhibeerib antibiootikum rakkude kasvukiirust 50% võrreldes ilma antibiootikumita kasvanud kontrolliga (Hung et al., 2018). Kui rRNA modifikatsioonide puudumine mõjutab ribosoomi struktuuri, dünaamikat või otseselt antibiootikumi seondumispäika, avalduks see IC_{50} väärtuse muutumisega. Madalam IC_{50} väärtus viitab suurenenud tundlikkusele antibiootikumi suhtes ja kõrgem IC_{50} väärtus viitab vähenenud antibiootikumi tundlikkusele.

2.0 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Avaldatud kvantitatiivsed pärmi keemilise tundlikkuse määramise meetodid nõuavad sageli kallist aparatuuri või spetsiaalseid vahendeid. Seetõttu kasutavad paljud laborid mikrobioloogiliste inhibiitorite tundlikkuse hindamiseks lihtsamat traditsioonilist plaatimismeetodit, kus rakud külvatakse kemikaali sisaldavatele agarsöötme plaatidele ning tundlikkust hinnatakse kolooniate olemasolu, arvu või suuruse järgi. Kuigi see meetod on odavam ja kättesaadavam, on selle peamiseks puudusteks, märkimisväärne töömaht ja ressursikulu.

Käesoleva töö eesmärgid olid:

1. Optimeerida *S. cerevisiae* kasvutingimusi 96-süvendiga mikrotiiterplaadil, et need oleksid kasutatavad erinevate tüvede antibiootikumitundlikkuse hindamiseks vedelkultuuris.
2. Testida optimeeritud katsetingimusi tsükloheksimiidi näitel erinevate *S. cerevisiae* tüvede IC₅₀ määramiseks.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed ja tüved

Tabel 2. Kasutatud söötmed ja nende koostised

Sööde	Koostis
YPD (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>) vedelsööde	1% Bacto™ pärmiekstrakt, 2% Bacto™ peptoon, 2% glükoos
YPD agarsööde	1% Bacto™ pärmiekstrakt, 2% Bacto™ 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 (Ade, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Lys Met, PABA, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Ura, Val)

SC -His agarsööde	2% Glükoos, 0,67% pärmilämmastikaluste segu, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu (Ade, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Lys Met, PABA, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Ura, Val), 2% agar
-------------------	---

Tabel 3. Kasutatud tüved, nende genotüüp, puuduvad modifikatsioonid ja päritolu

Tüvi	Genotüüp	Plasmiidid	Puuduvad modifikatsioonid	Allikas
TYSC309 (WT) (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>MATa ura3-52</i> <i>leu2Δ1</i> <i>his3Δ200</i> <i>trp1Δ36 arg4</i> <i>lys1</i>	-	-	Labori kollektsoon
TYSC309 + pRS413	<i>MATa ura3-52</i> <i>leu2Δ1</i> <i>his3Δ200</i> <i>trp1Δ36 arg4</i> <i>lys1</i>	<i>pRS413- his3</i>	-	Käesolev töö
TYSC960	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1</i> <i>his3Δ200</i> <i>trp1Δ36</i> <i>Δarg4 Δlys1</i> <i>ΔsnR34</i> <i>ΔsnR52</i> <i>ΔsnR67</i> <i>Δspb1::hphMX6</i> <i>Δnop2::natMX6</i>	<i>pRS314-spb1D52A,E679K (DE9)</i> <i>pRS315- nop2 C424A C478A (mut 2-1)</i> <i>pRS413- 3snR (snR34 snR52 snR67) his3</i>	G2922, m ⁵ C2870	Labori kollektsoon

TYSC962	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1::hphMX6 Δnop2::natMX6 snR34* snR52* snR67*</i>	<i>pRS314-spb1D52A,E679K (DE9) pRS315-nop2 C424A C478A (mut 2-1) pRS413-3snR (snR34* snR52* snR67*) his3</i>	Gm2619, Um2921, Ψ2826, G2922, m ⁵ C2870	Labori kollektsoon
TYSC964	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1::hphMX6 Δnop2::natMX6</i>	<i>pRS314-spb1D52A,E679K (DE9) pRS315-nop2 C424A C478A (mut 2-1); pRS413- his3</i>	Gm2619, Um2921, Ψ2826, Ψ2880, Am420, Um2724, G2922, m ⁵ C2870	Labori kollektsoon

snR34* snR52* snR67* on muteeritud nii, et nende ekspresseerimisel taastatakse rRNA-s vaid evolutsiooniliselt mittekonserveerunud modifikatsioonid.

2.2.2 Rakkukultuuride ettevalmistus

S. cerevisiae WT rakud kasvatati YPD tardsöötmele plaadidel inkubaatoris *Sanyo incubator* 30 °C juures 3 - 4 päeva. Ülejäänud tüved kasvatati SC -His tardsöötmele plaadidel inkubaatoris *Sanyo*

incubator 30 °C juures 3 - 5 päeva. Rakkude kasvatamiseks vedelsöötmes inokuleeriti üksik koloonia 3 ml vedelsöötmesse: WT tüve kasvatati YPD söötmes ning teisi tüvesid SC -His söötmes (Tabel 1.). Kultuure kasvatati inkubaator loksutis (*Infors HT Multitron*) olenevalt tüve kasvukiirusest 20-50 h tingimustel 30 °C ja 180 rpm. Rakukultuuri tihedus määrati optilise neelduvuse põhjal lainepikkusel 600 nm (OD₆₀₀). Üleöö rakukultuuride puhul lahjendati mõõtmiseks kultuuri 10 korda *Milli-Q* (MQ) veega. Rakukultuuri lahjendati söötmes tiheduseni OD₆₀₀ = 0,15 ja rakukultuur kanti 120 µl süvendi kohta 96-süvendilisele *Greiner BIO-ONE 96 Well, F-bottom, Clear, Suspension Culture plate* mikrotiiterplaadile, ning kasvatati *BMG Labtech POLARstar Omega* mikroplaadilugejas kuni rakud jõudsid eksponentsiaalse kasvufaasi algusesse. Antibiootikumidest valmistati iga soovitud lõppkonsentratsiooni kohta vahelahjendused, mille kontsentratsioon oli vastavast lõppkontsentratsioonist 60-korda kõrgem. Erinevate antibiootikumide kontsentratsiooniga rakukultuuride saamiseks lisati eksponentsiaalses kasvufaasis rakkudele 120 µl rakususpensiooni kohta 2 µl vastavat antibiootikumi vahelahjendust. Rakukultuure kasvatati katse ajal *BMG Labtech POLARstar Omega* mikroplaadilugejas temperatuuril 30 °C.

2.2.3 Andmetöötlus

Mõõtetulemusi töödeldi ja analüüsiti programmis *Microsoft Excel*. Saadud mõõtetulemuste põhjal koostati kasvukõverad logaritmilisel skaalal. Generatsiooniaja määramiseks kasutati mõõtmistulemusi eksponentsiaalse kasvufaasi vahemikust. Valitud andmelõigule genereeriti *Microsoft Excel* abil eksponentsiaalne trendijoon ning generatsiooniaeg arvutati trendijoonest võrrandis esitatud tõusu põhjal valemiga:

$$G = \frac{\ln(2)}{k}$$

G = generatsiooni aeg

k = trendijoonest tõus

Iga katse puhul arvutati IC₅₀ väärtused eraldi. Seejärel koondati sama tüve ja antibiootikumi kohta saadud tulemused ühele suhteliste kasvukiiruste graafikule. Suhtelise kasvukiiruse arvutamiseks jagati vastava antibiootikumikontsentratsiooni juures kasvanud rakkudele arvutatud keskmine generatsiooniaeg, antibiootikumita tingimuses kasvanud rakkudele arvutatud keskmise generatsiooniajaga.

$$\text{suhteline kasvukiirus} = \frac{G_0}{G_c} * 100$$

G_0 = antibiootikumita tingimustes määratud keskmine generatsiooniaeg

G_c = vastava antibiootikumikonsentratsiooni juures saadud keskmine generatsiooniaeg

Saadud suhtelised kasvukiirused kanti graafikule antibiootikumi konsentratsiooni funktsioonina. IC_{50} väärtus määrati trendijoone võrrandi põhjal kui antibiootikumi konsentratsioon, mille juures suhteline kasvukiirus oli 50 % ilma antibiootikumita söötmes kasvanud kontrollist.

2.2.4 Transformatsioon

Rakud kasvatati YPD söötmes kuni $OD_{600} = 0.6 - 0.8$. Seejärel koguti rakud 50 ml rakukultuurist tsentrifuugimise teel 2 min jooksul kiirusel 3200 rpm toatemperatuuril. Rakkude pesemiseks eemaldati supernatant ning rakkudele lisati 25 ml MQ vett. Rakud resuspendeeriti, tsentrifuugiti 2 min 3200 rpm toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Seejärel lisati rakkudele 12,5 ml 1x LiOAc-TE (100mM liitiumatsetaat, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) lahust, rakud resuspendeeriti, koguti tsentrifuugimise teel 2 min 3200 rpm toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Pärast pesuetappe eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti 300 µl 1x LiOAc-TE lahuses. Transformatsioonisegule lisati 50 µl kuumdenatureeritud kandja-DNA-d ning 50 µl kompetentsetele rakkudele lisati 1,5 µl 882,2 ng/ml plasmiidset DNA-d ja segu inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Peale inkubatsiooni lisati 300 µl PEG-LiOAc-TE (40% PEG 4000, 100mM liitiumatsetaat, 10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA) lahust, segati vorteksiga ning inkubeeriti toatemperatuuril 15 min. Pärast inkubeerimist lisati segule 30 µl DMSO-t, segati vorteksiga ning inkubeeriti 10 min temperatuuril 42 °C. Rakud koguti kokku tsentrifuugimise teel tingimustel 3 min, 3000 rpm. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 100-200 µl steriilses MQ vees, ning külvati SC -His agar söötme plaadile.

2.2.5 AI kasutus

Käesolevas töös kasutati *Chat-GPT 5.5 OpenAI* abi keelelise kontrolli ja lausete sõnastuse parendamise eesmärgil.

2.3 Tulemused ja arutelu

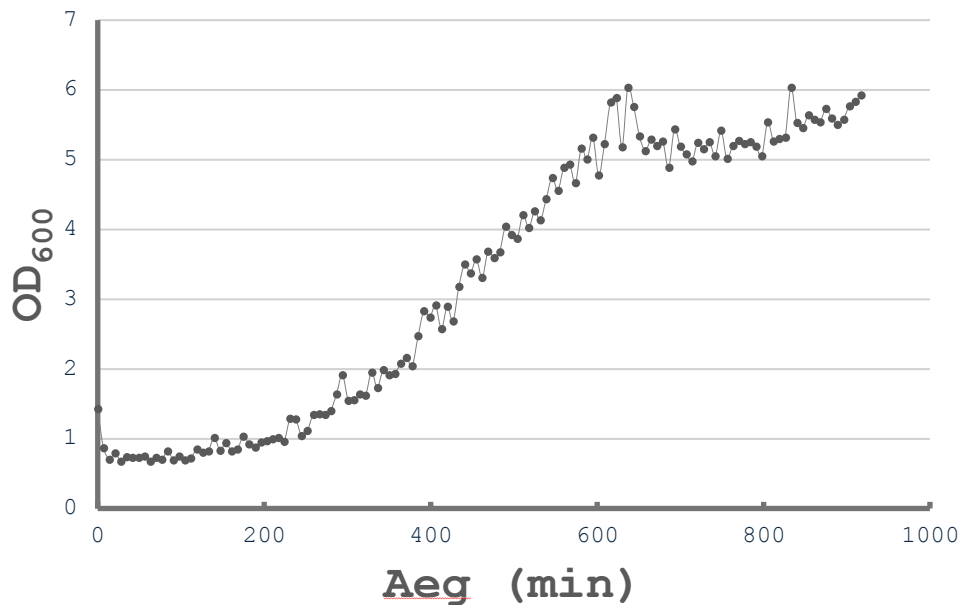
Traditsiooniliselt kasutatavad rakkude kasvuinhibiitorite hindamiseks kasutatav plaatimismeetodite peamine puudus on andmete hinnangulisus. Inhibiitorite mõju rakkude kasvule hinnatakse silma järgi kas koloonia arvu või koloonia suuruse põhjal. Selliseid hinnanguid on keeruline objektiivselt omavahel võrrelda. Rakukultuuride OD₆₀₀ mõõtmine annab numbrilised tulemused, mida saab objektiivselt omavahel võrrelda. Käesoleva töö peamine eesmärk oli optimeerida *S. cerevisiae* kasvutingimusi 96-süvendiga mikrotiiterplaadil, et oleks võimalik hinnata erinevate tüvede antibiootikumitundlikkust vedelkultuuris.

Püstitatud eesmärgi täitmiseks alustati kasvutingimuste optimeerimist *Saccharomyces cerevisiae* TYSC309 (WT) (Tabel 2) tüvega YPD söötmes (Tabel 3). YPD sööde on *S. cerevisiae* jaoks toitaineerikas ja standardne sööde, milles kasvab *S. cerevisiae* kiiresti tulemused hästi reprodutseeruvad. WT tüvi valiti, sest varasemastest uuringutest oli meie töögrupil teada tüve generatsiooniaeg YPD söötmes ($91,0 \pm 6,2$ min) (Leppik et al., 2024), millega katse tulemusi võrrelda.

Kasvutingimuste optimeerimist alustati varasemalt töögrupis *BMG Labtech POLARstar Omega* mikroplaadilugeja standardse mõõtmisprogrammiga (Tabel 4). Käesoleva töö raames tehtud eelkatset näitasid, et standardprogrammi kasutamisel esinesid andmetes suured mõõteväärtuste vahelised kõikumised, mis raskendasid kasvukõverate üheselt tõlgendamist (Joonis 3). Sellest tulenevalt varieerusid märgatavalt ka nende andmete põhjal arvutatud generatsiooniajad. Eelkatsete põhjal arvutati keskmiseks generatsiooniajaks $149,82 \pm 46,51$ min ($n=76$), mis on eeldatavast generatsiooniajast $91,0 \pm 6,2$ min märkimisväärselt aeglasem.

Tabel 4. Standardtingimustega mikroplaadilugeja mõõtmisprogramm

Etapp	Tegevus	Kestvus
1	Loksutamine (orbitaalne, 500 rpm, 30 °C)	60 sek
2	Inkubeerimine ilma loksutamiset (30 °C)	60 sek
3	Etappide 1-2 kordamine ühe korra	-
4	OD ₆₀₀ mõõtmine (30 °C)	60 sek



Joonis 3. Standard mõõtmisprogrammiga saadud mõõtetulemused. Joonisel on näidatud WT rakukultuuri OD₆₀₀ mõõtetulemustest koostatud kasvukõver YPD söötmes. Joonis esindab 30 korduskatse mõõtmistulemusi.

Kuna esmaste kasvutingimustega saadud kasvukõverates esines suur mõõtetulemuste vaheline varieeruvus ja samuti mõõtmisväärtuste katsesisesed kõikumised, ei olnud sellest tulenevalt võimalik arvutada usaldusväärset keskmist generatsiooniaega, hakati esmalt arendama mõõtmisprogrammi, mis mikrotiiterplaadilugeja kasvatamistingimused määrab. Mõõtmisprogrammi parendamisel võeti aluseks Warringer ja Blomberg, 2003 kirjeldatud mikrotiiterplaadil kasvatamise meetoodika. Selles töös näidati, et pidev rakukultuuri loksutamine ilma piisavate pausideta võib mõjutada rakkude jaotumist mikroplaadi süvendis. Rakud võivad koguneda süvendi servadesse või keskele. Kui rakud ei jõua enne mõõtmist ühtlaselt suspendeeruda, võivad OD väärtused punktide lõikes kõikuda ning seega ei pruugi mõõtetulemused peegeldada rakkude tegelikku kasvu. Käesoleva töö eelkatsete andmed viitavad, et probleemiks võib just olla nende poolt kirjeldatud fenomen. Warringer ja Blomberg, 2003 kirjeldasid, et probleemi lahendas vahelduv loksutamine, kus 60 sekundilisele loksutamisele järgnes 60 sekundit ilma loksutamata inkubeerimine ning OD₆₀₀ mõõtmine toimus iga 20 minuti järel. Selle põhjal kohandati kasvutingimusi muutes mõõtmisprogrammi. Muudeti loksutamise muster orbitaalselt topelt orbitaalseks ning loksutamise kiirus 500 rpm-lt 700 rpm-le. Ilma loksutamiseteta inkubeerimise aeg vähendati 60 sekundilt 55 sekundile ning mõõtmise tihedus muudeti iga tsükli tagant iga kümne tsükli järele.

BMG Labtech POLARstar Omega mikroplaadilugeja OMEGA programmi kasutajaliides omab väga limiteeritud võimalusi ja selliseid kasvatustingimusi rakendada ei võimalda. Siiski, on võimalik määrata oluliselt rohkem mõõtmisprogrammi parameetreid kui programmeerida masinat otse. Selleks tuleb kasutada spetsiaalset *Script mode*-i. *Script mode*'is tuleb käsitsi kirjutada programm, kus defineeritakse täpselt kõik mõõtmisparameetrid (Lisa 1 ja 2). *Script mode* programmid kirjutab Margus Leppik.

Kohandatud plaadilugeja kasvutingimuste sobivust kontrolliti esmalt WT tüvega YPD söötmes, et saaks eristada muudetud mõõtmisprogrammi mõju mõõtetulemustele. Kohandatud kasvutingimustega mõõdetud mõõtetulemused WT tüvele YPD söötmes olid stabiilsed (joonis 4A). Mõõtmisprogrammi muutmine vähendas oluliselt OD₆₀₀ mõõtetulemuste varieeruvust. Mõõdetud tulemuste põhjal arvutati WT tüve generatsiooniajaks YPD söötmes $86,23 \pm 4,13$ min ($n = 84$), mis oli lähedane varasemalt töögrupis määratud generatsiooniajale $91,0 \pm 6,2$ min. Väike veapiir ($\pm 4,13$ min) viitab sellele, et selliste kasvutingimuste kasutamine annab usaldusväärseid, vähem varieeruvaid tulemusi. Kuna kasvutingimused andsid kontrolltingimustes ootuspärased tulemused, liiguti edasi programmi testimisega SC -His söötmes.

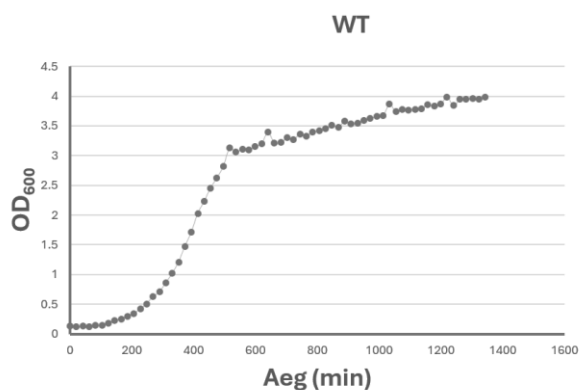
Programmi testiti s SC -His selektiivsöötmes (Tabel 2), sest tulevastes antibiootikumi tundlikkuse määramise katsetes on vaja kasutada selektiivsusmarkereid tüvede selekteerimiseks. Kuna töös kasutatud WT kontrolltüvi ei ole SC -His söötmes elujõuline *his3* geeni puudumise tõttu, viidi WT tüvesse *his3* selektiivsusmarkeriga plasmiid *pRS413*. TYSC309 + *pRS413* tüve kasutades kontrolliti, kas kohandatud kasvutingimused on sobilikud ka SC -His söötmes mõõtmiseks. Erinevalt YPD söötmes läbi viidud katsetest olid TYSC309 + *pRS413* tüve mõõtetulemused väga varieeruvad ning mõõtetulemuste põhjal loodud kasvukõvera tulemused väga ebastabiilsed (Joonis 4B). Kasvukõverat vaadates paistab, et rakud ei saanud korralikult kasvama hakata, sest tundub, et rakukultuuri mõõdetud OD₆₀₀ ei ületanud väärtust 0,8 ning isegi hüppeid arvesse võttes, ei ületanud väärtused mõõtmise vältel 1,2 piiri (Joonis 4B). Tulemustele tuginedes saab pakkuda hüpoteesi, et SC -His söötme madalama viskoossuse ja raskemate kasvutingimuste (madalam toitainete kontsentratsioon) tõttu ei ole rakud nii eluvõimelised, kui YPD söötmes, mille tagajärjel vajuvad rakud süvendi põhja. SC söötme ja YPD söötme viskoossuste erinevuse kohta ei leitud teaduskirjandusest andmeid. Katsetulemuste alusel tekkis hüpotees, et kui rakud vajuvad kasvatamise käigus süvendi põhja ning moodustavad agregate, ei saa nad enam piisavalt toitaineid ja hapnikku. Sellest ja

rakkude ebaühtlasest jagunemisest rakukultuuris, tuleneb rakkude halvenenud kasv ja suuresti varieeruvad mõõtetulemused. Varieeruvate mõõtetulemuste tõttu ei olnud andmete põhjal võimalik usaldusväärseid generatsiooniaegu arvutada.

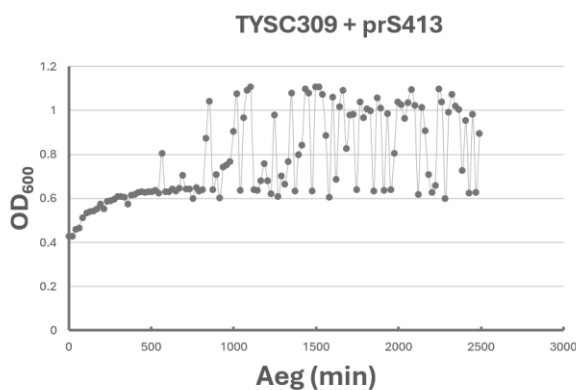
Tabel 5. Esimesed kohandatud kasvatamistingimused mikroplaadilugejas.

Etapp	Tegevus	Kestus
1	Loksutamine (topelt orbitaalne, 700 rpm, 30 °C)	60 sek
2	Inkubeerimine ilma loksutamiset (30 °C)	55 sek
3	Etappide 1-2 kordamine 10 korda	-
4	OD ₆₀₀ mõõtmine (30 °C)	60 sek

A



B



Joonis 4. Esimeste kohandatud kasvutingimustega saadud mõõtetulemused. (A) on näidatud WT rakukultuuri OD₆₀₀ mõõtetulemustest koostatud kasvukõver YPD söötmes, joonis esindab 84 korduskatse tulemusi, (B) on näidatud TYSC309 + prS413 rakukultuuri OD₆₀₀ mõõtetulemustest koostatud kasvukõver SC -His söötmes, joonis esindab 168 korduskatse tulemusi.

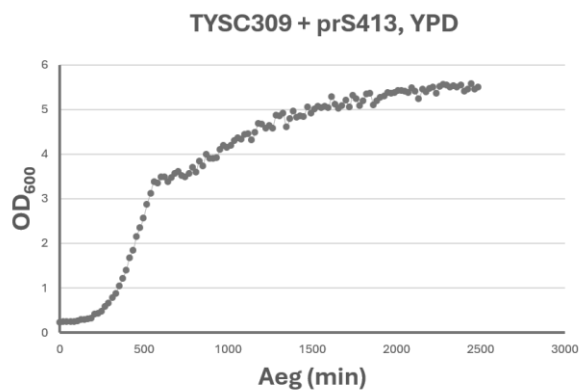
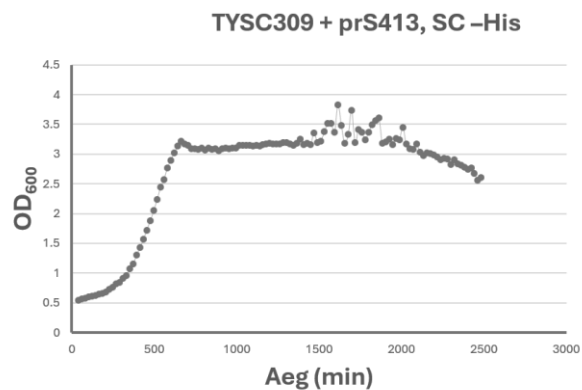
Rakkude süvendi põhja vajumise ära hoidmiseks kohandati kasvutingimusi uuesti. Selleks muudeti mõõtmisprogrammi loksutamise aeg 60 sekundilt 85 sekundini ning vähendati seismise aega 60 sekundilt 25 sekundini (Tabel 6). Esmalt kontrolliti uuesti kasvutingimuste sobivust YPD söötmes. Kohandatud kasvutingimusi kasutades saadi TYSC309 + prS413 tüvele YPD söötmes stabiilsed mõõtetulemused (Joonis 5A), mõõtetulemuste põhjal arvutati generatsiooniajaks $83,62 \pm 5,16$ min ($n = 72$), mis on 8 minutit kiirem, kui varasemalt töögrupis

määratud WT tüve generatsiooniaeg YPD söötmes ($91,0 \pm 6,2$ min) ja 3 minutit kiirem, kui eelmistes kasvutingimustes määratud WT tüve generatsiooniaeg ($86,23 \pm 4,13$), mis viitab sellele, et kasvutingimustest sõltuvalt võib muutuda rakkude generatsiooniaeg. Selle põhjal järeldati, et teise kohandatud mõõtmisprogrammi pikem loksutamisetapp ja lühem seismisaeg ei põhjustanud YPD söötmes märkimisväärseid muutuseid mõõtetulemuste varieeruvuses ja arvutatud keskmises generatsiooniajas. See viitab sellele, et YPD söötmes ei olnud enam rakkude suspensioonis püsimine mõõtmist piiravaks teguriks. Seetõttu mindi edasi programmi testimisega SC -His söötmes. Selleks mõõdeti teiste kohandatud kasvutingimustega TYSC309 + pRS413 tüve SC -His söötmes. Uutes kasvutingimustes mõõdetud mõõtetulemuste katsesisene varieeruvus oli madal ning mõõtetulemuste põhjal arvutati keskmiseks generatsiooniajaks $157,31 \pm 10,65$ min ($n = 144$)(Joonis 5B).

Tabel 6. Teine kohandatud mikroplaadilugeja mõõtmisprogramm

Etapp	Tegevus	Kestus
1	Loksutamine (topelt orbitaalne, 700 rpm, 30 °C)	85 sek
2	Inkubeerimine ilma loksutamiseteta (30 °C)	25 sek
3	Etappide 1-2 kordamine 10 korda	-
4	OD ₆₀₀ mõõtmine	60 sek

SC -His söötmes kasvanud TYSC309 + pRS413 tüve oluliselt aeglasem generatsiooniaeg ($157,31 \pm 10,65$ min) ($n=144$) võrreldes YPD söötmes kasvanud WT tüve generatsiooniajaga ($83,62 \pm 5,16$ min) oli oodatav tulemus, sest SC -His söötmes on vähem toitaineid võrreldes YPD söötmega. Seetõttu sai tulemuste tõlgendamisel tugineda vaid käesoleva töö raames läbi viidud katsetele. Kuna SC -His söötmes saadi usaldusväärsed tulemused, mindi edasi kasvutingimuste testimisega tingimustele, kus söötmele lisati veel antibiootikum.

A**B**

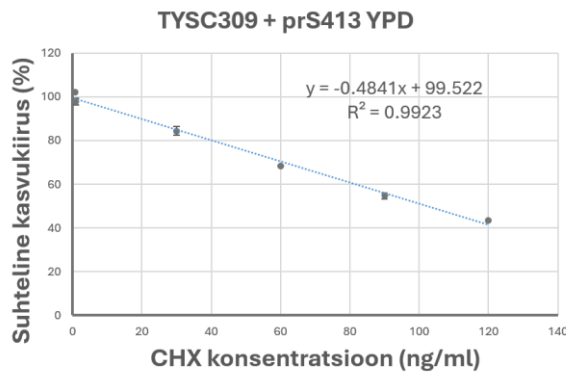
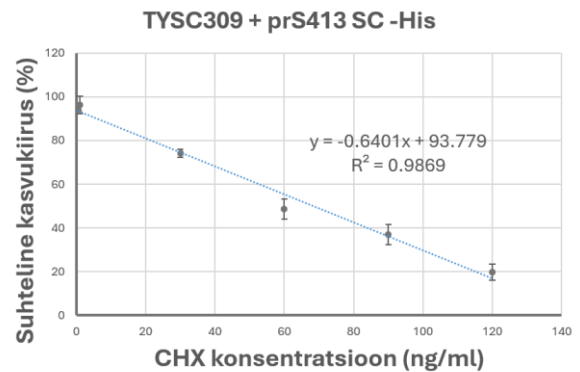
Joonis 5. Teiste kohandatud kasvutingimustega saadud mõõtetulemused. (A) on näidatud YPD söötmes kasvanud TYSC309 + prS413 tüve mõõtetulemustest koostatud kasvukõver, kasvukõver esindab 72 korduskatse tulemusi. (B) on näidatud SC -His söötmes kasvanud TYSC309 + prS413 tüve mõõtetulemustest koostatud kasvukõver, kasvukõver esindab 144 korduskatse tulemusi.

Antibiootikumi tundlikkuse määramise katsetes kasutati nelja tüve: käesolevas töös valmistatud TYSC309 + prS413 ja varasemalt Ronald Variku 2025 aasta magistritöös valmistatud pärmitüved TYSC960, TYSC962 ja TYSC964. Tüved on konstrueeritud 25S rRNA modifikatsioonide defektse *S.cerevisiae* tüve TYSC906 (3ΔsnR, *nop2** (C424A/C478A), *spb1** (D52A/E679K)) põhjal (Leppik et al., 2024). TYSC906 tüves on puudu seitse 25S rRNA modifikatsiooni: m5C2870, Um2921, Gm2922, Um2724, Gm2619, Ψ2880 ja Ψ2826 ning üks 18S rRNA modifikatsioon – Am420 (Leppik et al., 2024). Kolm snoRNA geeni *snR34*, *snR52* ja *snR67* juhivad kolme evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsiooni Gm2619, Um2921 ja Ψ2826 sünteesimist ja kolme mitte konserveerunud modifikatsiooni Ψ2880, Am420 ja Um2724 sünteesimist (Leppik et al., 2024). Metüültransferaasid NOP2 ja SPB1 on genoomist deleteeritud ning asendatud plasmiidilt kodeerivate katalüütiliselt inaktiivsete versioonidega (*prS314-spb1D52A/E679K*; *prS315-nop2 C424A/C478A*) (Leppik et al., 2024). Tüve TYSC906 põhjal on tehtud tüvi TYSC960, millesse on lisatud *his3* markergeeniga plasmiid prS413-3snR(WT), *his3*, plasmiid kompenseerib 3snR geenid ja toob tagasi kõik nende snoRNA-de juhitud rRNA modifikatsioonid. TYSC962 on tüvi, millesse on lisatud *his3* markergeeniga plasmiid prS413-3snR(MUT)*his3*, plasmiid kodeerib *snR34*, *snR52* ja *snR67* snoRNA-de mutantseid versioone. Mutantsed *snR34*, *snR52* ja *snR67* snoRNA-d juhivad kolme mittekonserveerunud modifikatsiooni Ψ2880, Am420 ja Um2724 sünteesimist, aga ei juhi kolme evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsiooni Gm2619, Um2921 ja Ψ2826

sünteesimist. TYSC964 on tüvi, millesse on lisatud tühi his3 markergeeniga pRS413-his3 plasmiid.

Antibiootikumi tundlikkust määrati tsükloheksimiidi (CHX) suhtes IC_{50} väärtuse määramise kaudu. Kuna eelnev mõõtmisprogrammi optimeerimine näitas, et kasvutingimustel on suur roll OD_{600} mõõtmistulemuste kvaliteedile, testiti esmalt CHX lisamise mõju TYSC309 + pRS413 tüvele YPD söötmes. Lisaks, oli oluline määrata CHX IC_{50} väärtus TYSC309 + pRS413 tüve puhul YPD söötmes, et saada võrdlusväärtus tsükloheksimiidi tundlikkusele standardsetes tingimustes, mida hiljem võrreldi sama tüve IC_{50} väärtusega SC -His söötmel. Iga testitud tüvega tehti sobiva antibiootikumikontsentratsiooni vahemiku välja selgitamiseks eelkatse, kus kasutati laia CHX kontsentratsioonide vahemikku (500 ng/ml – 500 pg/ml), . Eelkatseks kasutatud CHX kontsentratsioonide esmane vahemik valiti (Warringer ja Blomberg, 2003b) uuringutes kasutatud CHX kontsentratsioonide põhjal.

TYSC309 + pRS413 tüve testiti kuue erineva CHX kontsentratsiooni juures, nii et CHX kontsentratsioonid kataks vahemiku, mis võimaldaks kasvuinhibitsiooni mõõta, kontrollina kasutati antibiootikumita söödet. Kõikides CHX tundlikkuse katsetes oli iga CHX kontsentratsiooni puhul oli katses 14 tehnilist kordust ja kontrolltingimustes 24 tehnilist kordust. Kõikidele CHX kontsentratsiooni juures kasvanud rakkudele arvutati keskmine generatsiooniaeg. Seejärel määrati iga CHX kontsentratsiooni puhul suhteline kasvukiirus võrreldes kontrolltingimustega nagu selgitatud andmetöötlusmeetodite peatükis. Kolme katse põhjal arvutatud keskmised suhtelised kasvukiirused kanti ühele graafikule (Joonis 6A). CHX kontsentratsiooni, mille juures antibiootikum inhibeeris 50% rakkude kasvukiirusest (IC_{50}) arvutati suhteliste kasvukiiruste trendijoone valemi põhjal (Joonis 6A). Kolme katse põhjal koostatud keskmiste suhteliste kasvukiiruste graafiku tõusu põhjal arvutati TYSC309 +pRS413 tüvele YPD söötmes IC_{50} väärtuseks 102,3 ng/ml.

A**B**

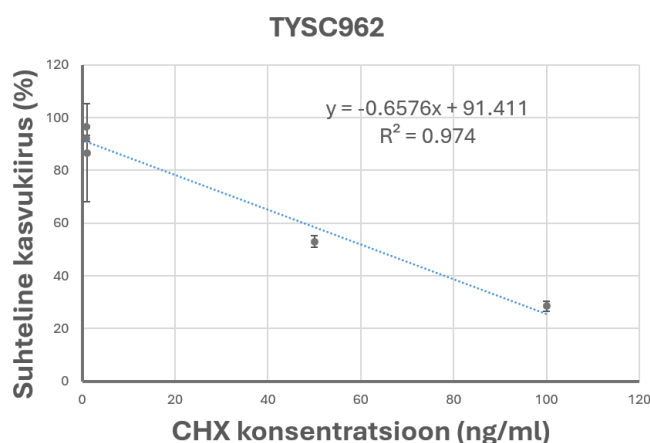
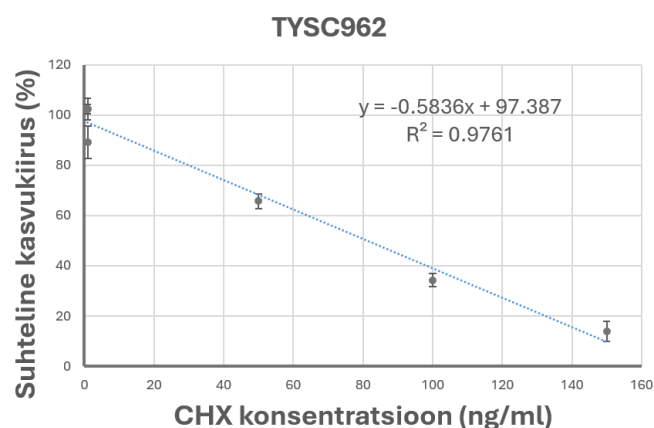
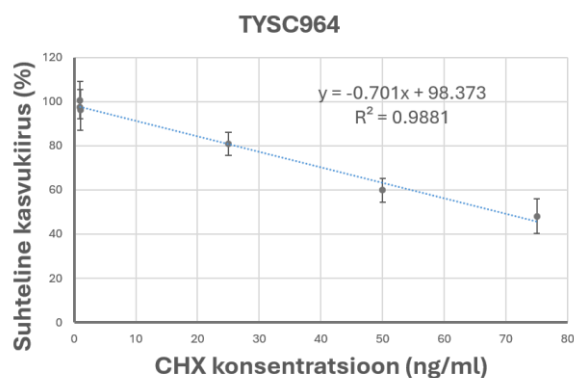
Joonis 6. TYSC + prS413 tüve suhteliste kasvukiiruste graafikud YPD ja SC -His söötmetes. (A) on näidatud TYSC309 + prS413 tüvele YPD söötmes mõõdetud keskmised suhtelised generatsiooniajad ($n=3$) CHX konsentratsioonide 120 ng/ml, 90 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 1 ng/ml ja 0,7 ng/ml juures. (B) on näidatud TYSC309 + prS413 tüvele SC -His söötmes mõõdetud keskmised suhtelised generatsiooniajad ($n=3$) CHX konsentratsioonide 120 ng/ml, 90 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 1 ng/ml ja 0,7 ng/ml juures.

Järgmisena määrati TYSC309 + prS413 tüve IC_{50} väärtus tsükloheksimiidi suhtes SC -His söötmes. Tüve testiti kuuel erineval CHX konsentratsioonil, nii et CHX konsentratsioonid kataks vahemiku, mis võimaldaks mõõta kasvuinhibitsiooni, kontrollina kasutati antibiootikumita söödet. Katset korrati kolm korda. Erinevatel CHX konsentratsioonidel kasvanud rakkude kolme katse põhjal arvatud keskmised suhtelised kasvukiiruste väärtused kanti graafikule ning keskmiste suhteliste kasvukiiruste trendijoone põhjal arvutati IC_{50} väärtus. SC -His söötmes arvutati TYSC309 + prS413 tüve IC_{50} väärtuseks 68,39 ng/ml, mis on madalam kui YPD söötmes määratud TYSC309 + prS413 tüve CHX IC_{50} väärtus 102,3 ng/ml. Mis näitab, et YPD söötmes on TYSC + prS413 tüve rakud tundetumad CHX-i suhtes ja viitab sellele, et söötme koostis võib mõjutada antibiootikumi tundlikkust.

Järgmisena määrati TYSC960 tüve tsükloheksimiidi IC_{50} väärtus SC -His söötmes, et hinnata, kas 3snR (WT) geenide ekspressioon genoomi asemel plasmiidilt mõjutab rakkude tundlikkust tsükloheksimiidi suhtes. Selleks kasutati võrdluseks TYSC309 + prS413 tüvele samas söötmes määratud CHX IC_{50} väärtust. TYSC960 tüve tsükloheksimiidi tundlikkust mõõdeti kolmes katses erinevate CHX konsentratsioonide juures, kus kasutati viit erinevat CHX konsentratsiooni nii, et need kataks vahemiku, mis võimaldaks kasvuinhibitsiooni mõõta, kontrollina kasutati antibiootikumita söödet. Kolme katse põhjal arvatud suhtelised kasvukiirused kanti graafikule ning CHX IC_{50} väärtus arvutati suhteliste kasvukiiruste graafiku trendijoone põhjal (Joonis 7A). TYSC960 tüve CHX IC_{50} väärtuseks SC -His söötmes arvutati 62.97 ng/ml.

SC -His söötmes on TYSC960 tüvele arvatud CHX IC_{50} väärtus 62,97 ng/ml, mis on sarnane TYSC309 + pRS413 tüvele arvatud CHX IC_{50} (68,39 ng/ml) väärtusega, viidates sellele, et 3snR geenide asukoha muutus genoomist plasmidi ei mõjuta olulisel määral rakkude CHX tundlikkust tsükloheksimiidi suhtes. Kuigi TYSC960 IC_{50} väärtus tuli sarnane TYSC309 + pRS413 TYSC960 IC_{50} väärtusega, on TYSC960 tüve katsetes suhteliste kasvukiiruste veapiirid üsna kõrged (Joonis 7A), selle tõttu tuleks kindla järelduse tegemiseks läbi viia korduskatseid.

Järgmisena määrati TYSC962 tüve tsükloheksimiidi IC_{50} väärtus SC -His söötmes, et teada saada kas evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonide kadu mõjutab rakkude tundlikkust tsükloheksimiidi suhtes. TYSC962 tüve tundlikkust CHX suhtes mõõdeti kolmes katses, kus kasutati kuut erinevat CHX kontsentratsiooni nii, et need kataks vahemiku, mis võimaldaks kasvuinhibitsiooni mõõta, kontrollina kasutati antibiootikumita söödet. Mõõtetulemuste põhjal arvutati suhtelised kasvukiirused, mis kanti ühisele graafikule ning IC_{50} arvutati suhteliste kasvukiiruste graafiku trendijoone põhjal (Joonis 7C). Tüve TYSC962 CHX IC_{50} väärtuseks SC -His söötmes arvutati 81,2 ng/ml. See on natuke ootamatu tulemus, aga viitab sellele, et evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonide Gm2619, Um2921 ja Ψ 2826 ja mitte evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonide Ψ 2880, Am420 ja Um2724 interaktsioonid mõjutavad rakkude tundlikkust tsükloheksimiidi suhtes, aga kindlate järelduste tegemiseks tuleks läbi viia korduskatseid. Järgmisena määrati TYSC964 tüve tsükloheksimiidi IC_{50} väärtus SC -His söötmes, et uurida kas nii evolutsiooniliste konserveerunud modifikatsioonide Gm2619, Um2921, Ψ 2826 ja evolutsiooniliselt mittekonserveerunud modifikatsioonide Ψ 2880, Am420 ja Um2724 samaaegsel puudumisel on mõju tsükloheksimiidi tundlikkusele. TYSC964 tüve tundlikkust CHX suhtes mõõdeti kolmes katses, kus kasutati kuut erinevat CHX kontsentratsiooni nii, et need kataks vahemiku, mis võimaldaks kasvuinhibitsiooni mõõta, kontrollina kasutati antibiootikumita söödet. Mõõtetulemuste põhjal arvutati suhtelised kasvukiirused, mis kanti ühisele graafikule ning IC_{50} arvutati suhteliste kasvukiiruste graafiku trendijoone põhjal (Joonis 7B). Tüve TYSC964 CHX IC_{50} väärtuseks SC -His söötmes arvutati 69,01 ng/ml. Saadud IC_{50} väärtus on lähedane söötmes mõõdetud TYSC960 ja TYSC309 + pRS413 tüvele samas IC_{50} väärtustele (vastavalt 62,97 ng/ml ja 68,39 ng/ml). See viitab sellele, et evolutsiooniliselt konserveerunud Gm2619, Um2921, Ψ 2826 ja evolutsiooniliselt mittekonserveerunud modifikatsioonide Ψ 2880, Am420 ja Um2724 samaaegsel puudumisel ei ole mõju tsükloheksimiidi tundlikkusele.

A**B****C**

Joonis 7. Tüvede TYSC960, TYSC962 ja TYSC964 suhteliste kasvukiiruste graafikud SC -His söötmetes. (A) on näidatud SC -His söötmes TYSC960 tüvele mõõdetud suhtelised kasvukiirused (n=3) võrreldes kontrolliga CHX konsentratsioonide, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 1 ng/ml, 0,95 ng/ml ja 0,9 ng/ml juures. (B) on näidatud TYSC962 tüvele SC -His söötmes mõõdetud keskmised suhtelised generatsiooniajad (n=3) võrreldes kontrolliga CHX konsentratsioonide 150 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 1 ng/ml, 0,95 ng/ml ja 0,9 ng/ml juures. (C) on näidatud tüve TYSC964 mõõdetud suhtelised kasvukiirused (n=3) võrreldes kontrolliga CHX konsentratsioonide 75 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 1 ng/ml, 0,975 ng/ml ja 0,95 ng/ml juures.

Kokkuvõtlikult täideti uurimistöö eesmärgid, töötati välja meetod, mille kasvutingimused on, esialgsete katsetulemuste põhjal, *Saccharomyces cerevisiae* erinevate tüvede antibiootikumi tundlikkuse uurimiseks sobivad. Tüvedele TYSC309 + pRS413, TYSC960, TYSC962 ja TYSC964 mõõdetud IC_{50} väärtused viitavad sellele, et evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonidel Gm2619, Um2921, Ψ 2826 on mõju rakkude CHX tundlikkusele, kuid see on seotud evolutsiooniliselt mittekonserveerunud modifikatsioonide Ψ 2880, Am420 ja Um2724, aga kindlate järeltsete tegemiseks oleks vaja läbi viia täiendavaid uuringuid.

Kokkuvõte

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on laialdaselt kasutatav mudelorganism ribosoomi funktsioneerimise ja translatsiooni uurimiseks. Ribosoomi talitlust mõjutavad ribosomaalse RNA modifikatsioonid, mis paiknevad sageli ribosoomi funktsionaalselt olulistes piirkondades. Selliste modifikatsioonide puudumine võib mõjutada ribosoomi struktuuri, translatsiooni efektiivsust ja tundlikkust translatsiooni inhibeervate ühendite suhtes.

Antibiootikumitundlikkuse hindamine võimaldab hinnata ribosoomi funktsionaalseid muutusi. Traditsioonilised plaatimismeetodid on töömahukad ja ressursikulukad, mistõttu on vaja odavamaid ja kiiremaid vedelkultuuril põhinevaid meetodeid. Pärmirakkude kasvukiiruse ja antibiootikumitundlikkuse hindamisel sõltub tulemuste usaldusväärsus suurel määral kasutatavatest kasvutingimustest ja mõõtmismetoodikast. Vedelkultuuris mikrotiiterplaadil tehtavad katsed võimaldavad jälgida rakkude kasvu ajas ning saada kvantitatiivseid andmeid, kuid usaldusväärsete tulemuste saamiseks peavad rakud olema süvendites ühtlaselt suspendeeritud ja rakukultuuri kasv ei tohi olla kasvutingimustest tingitult inhibeeringitud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimeerida *S. cerevisiae* kasvutingimusi 96-süvendiga mikrotiiterplaadil, et need oleksid kasutatavad erinevate tüvede antibiootikumitundlikkuse hindamiseks vedelkultuuris, ning testida optimeeritud katsetingimusi tsükloheksimiidi näitel erinevate *S. cerevisiae* tüvede IC₅₀ määramiseks.

Käesoleva töö käigus selgus, et rakkude kasvutingimused on usaldusväärsete ja reprodutseeritavate mõõtetulemuste saamiseks kriitilise tähtsusega. Töös optimeeriti *Saccharomyces cerevisiae* rakkude kasvutingimused toitaineterikkas komplekssöötmes YPD ja sünteetilises selektiivsöötmes SC -His. Optimeeritud kasvutingimusi kasutati erinevate *Saccharomyces cerevisiae* tüvede tsükloheksimiiditundlikkuse määramiseks IC₅₀ väärtuste kaudu. Katsetulemused viitasid sellele, et evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsioonide Gm2619, Um2921, Ψ2826 ja evolutsiooniliselt mittekonserveerunud modifikatsioonide Ψ2880, Am420 ja Um2724 interaktsioonid võivad mõjutada rakkude tundlikkust tsükloheksimiidi, aga kindlate järelduste tegemiseks oleks vaja läbi viia täiendavaid uuringuid

Optimization of growth Conditions of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the assessment of antibiotic sensitivity

Taavi Tamm

SUMMARY

Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is widely used as a model organism for studying eukaryotic translation and ribosome function. Ribosomal RNA modifications are important for proper ribosome activity, as they are often located in functionally significant regions of the ribosome. The absence of these modifications may affect ribosome structure, translation efficiency and sensitivity to translation-inhibiting compounds. Therefore, antibiotic sensitivity testing can be used to assess functional changes in the ribosome. Traditional plating methods for studying yeast sensitivity to antibiotics are labor intensive and provide limited quantitative information. In contrast, liquid-culture based measurements in microtiter plates make it possible to follow cell growth over time and obtain quantitative data. However, reliable use of this method requires stable growth conditions and a suitable measurement program, as uneven cell suspension or unstable optical density measurements can affect the results.

The aim of this bachelor's thesis was to optimize the growth conditions of *S. cerevisiae* in liquid culture on a microtiter plate and to test the optimized conditions by assessing cycloheximide sensitivity in different yeast strains. Cycloheximide was used as an inhibitor of eukaryotic translation. During the study, it was found that the initially used measurement program did not produce sufficiently stable growth curves. Therefore, the shaking and standing conditions of the microplate reader program were modified. The optimized program improved the stability and reproducibility of growth measurements in both nutrient-rich YPD medium and synthetic selective SC -His medium. This showed that growth conditions and measurement parameters are critical for reliable microtiter plate-based analysis of yeast growth.

In the course of this study, it became clear that cell growth conditions are critically important for obtaining reliable and reproducible measurement results. In this work, the growth conditions of *Saccharomyces cerevisiae* cells were optimized in the nutrient-rich complex medium YPD and in the synthetic selective medium SC -His. The optimized growth conditions were used to determine the cycloheximide sensitivity of different *Saccharomyces cerevisiae* strains through IC₅₀ values. The experimental results suggested that interactions between the

evolutionarily conserved modifications Gm2619, Um2921, Ψ 2826 and the evolutionarily non-conserved modifications Ψ 2880, Am420 and Um2724 may affect cellular sensitivity to cycloheximide; however, further studies would be needed to draw definitive conclusions.

Kasutatud kirjandus

- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., ja Hinnebusch, A. G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA^{Met} is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes ja Development*, 14(19), 2534–2546. <https://doi.org/10.1101/gad.831800>
- Baxter-Roshek, J. L., Petrov, A. N., ja Dinman, J. D. (2007). Optimization of Ribosome Structure and Function by rRNA Base Modification. *PLoS ONE*, 2(1), e174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000174>
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., ja Yusupov, M. (2010). Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science*, 330(6008), 1203–1209. <https://doi.org/10.1126/science.1194294>
- Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strøm, A. R., Valla, S., ja Zotchev, S. B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry ja Biology*, 7(6), 395–403. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00120-4)
- Hellen, C. U. T. (2018). Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Holtkamp, W., Kokic, G., Jäger, M., Mittelstaet, J., Komar, A. A., ja Rodnina, M. V. (2015). Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time. *Science*, 350(6264), 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.aad0344>

- Hung, C.-W., Martínez-Márquez, J. Y., Javed, F. T., ja Duncan, M. C. (2018). A simple and inexpensive quantitative technique for determining chemical sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 8(1), 11919. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30305-z>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., ja Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.-P., Caizergues-Ferrer, M., ja Kiss, T. (1996). Site-Specific Ribose Methylation of Preribosomal RNA: A Novel Function for Small Nucleolar RNAs. *Cell*, 85(7), 1077–1088. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81308-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81308-2)
- Kolář, M. H., McGrath, H., Nepomuceno, F. C., ja Černeková, M. (2024). Three Stages of Nascent Protein Translocation Through the Ribosome Exit Tunnel. *WIREs RNA*, 15(6), e1873. <https://doi.org/10.1002/wrna.1873>
- Koš, M., ja Tollervey, D. (2010). Yeast Pre-rRNA Processing and Modification Occur Cotranscriptionally. *Molecular Cell*, 37(6), 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.024>
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283–292. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
- Leppik, M., Pomerants, L., Pöldes, A., Mihkelson, P., Remme, J., ja 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>

- Lindqvist, L., Imataka, H., ja Pelletier, J. (2008). Cap-dependent eukaryotic initiation factor-mRNA interactions probed by cross-linking. *RNA*, 14(5), 960–969. <https://doi.org/10.1261/rna.971208>
- Lomakin, I. B., Kolupaeva, V. G., Marintchev, A., Wagner, G., ja Pestova, T. V. (2003). Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. *Genes ja Development*, 17(22), 2786–2797. <https://doi.org/10.1101/gad.1141803>
- Ni, J., Tien, A. L., ja Fournier, M. J. (1997). Small Nucleolar RNAs Direct Site-Specific Synthesis of Pseudouridine in Ribosomal RNA. *Cell*, 89(4), 565–573. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80238-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80238-X)
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., ja Steitz, T. A. (2000). The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*, 289(5481), 920–930. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., ja Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30 S Ribosomal Subunit. *Science*, 292(5518), 897–902. <https://doi.org/10.1126/science.1060612>
- O'Rourke, A., Beyhan, S., Choi, Y., Morales, P., Chan, A. P., Espinoza, J. L., Dupont, C. L., Meyer, K. J., Spoering, A., Lewis, K., Nierman, W. C., ja Nelson, K. E. (2020). Mechanism-of-Action Classification of Antibiotics by Global Transcriptome Profiling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3), e01207-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01207-19>
- Pestova, T. V., ja Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes ja Development*, 16(22), 2906–2922. <https://doi.org/10.1101/gad.1020902>

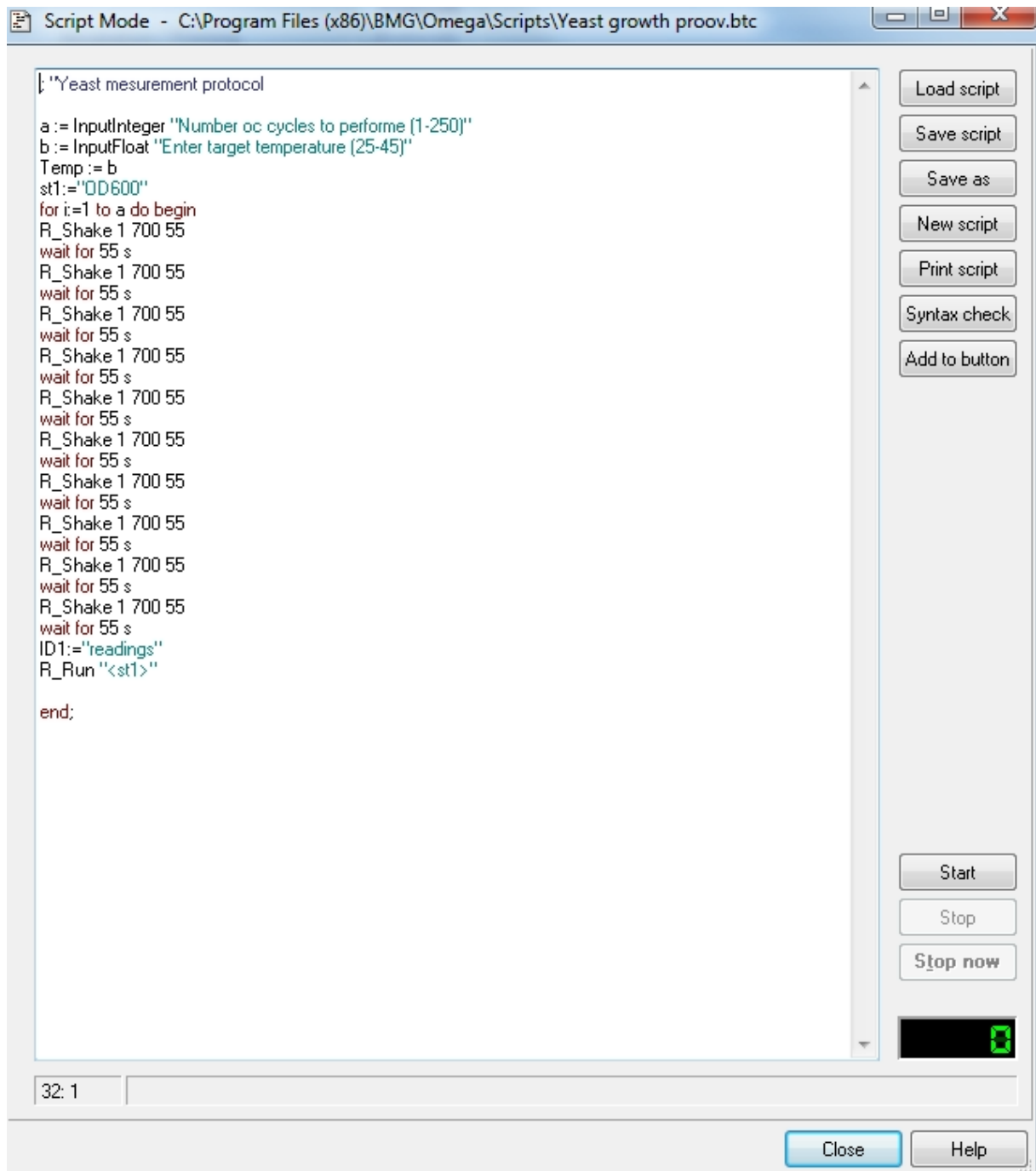
- Polacek, N., Gaynor, M., Yassin, A., ja Mankin, A. S. (2001). Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature*, 411(6836), 498–501. <https://doi.org/10.1038/35078113>
- Polacek, N., ja Mankin, A. S. (2005). The Ribosomal Peptidyl Transferase Center: Structure, Function, Evolution, Inhibition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 285–311. <https://doi.org/10.1080/10409230500326334>
- Sharma, S., ja Lafontaine, D. L. J. (2015). ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(10), 560–575. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.008>
- Sharma, S., Langhendries, J.-L., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K.-D., ja Lafontaine, D. L. J. (2015). Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMP1. *Nucleic Acids Research*, 43(4), 2242–2258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv075>
- Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kötter, P., ja Entian, K.-D. (2013). Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 9062–9076. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt679>
- Shen, L., Su, Z., Yang, K., Wu, C., Becker, T., Bell-Pedersen, D., Zhang, J., ja Sachs, M. S. (2021). Structure of the translating *Neurospora* ribosome arrested by cycloheximide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(48), e2111862118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111862118>
- Shin, B.-S., Kim, J.-R., Walker, S. E., Dong, J., Lorsch, J. R., ja Dever, T. E. (2011). Initiation factor eIF2 γ promotes eIF2–GTP–Met-tRNA^{Met} ternary complex binding to the 40S ribosome. *Nature Structural ja Molecular Biology*, 18(11), 1227–1234. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2133>

- Spahn, C. M. T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., ja Frank, J. (2001). Structure of the 80S Ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-Ribosome and Subunit-Subunit Interactions. *Cell*, 107(3), 373–386. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00539-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00539-6)
- Steinberger, J., Shen, L., J. Kiniry, S., Nainen, S. K., Cencic, R., Amiri, M., Aboushawareb, S. A. E., Chu, J., Maïga, R. I., Yachnin, B. J., Robert, F., Sonenberg, N., Baranov, P. V., ja Pelletier, J. (2020). Identification and characterization of hippuristanol-resistant mutants reveals eIF4A1 dependencies within mRNA 5' leader regions. *Nucleic Acids Research*, 48(17), 9521–9537. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa662>
- Stojković, V., Noda-Garcia, L., Tawfik, D. S., ja Fujimori, D. G. (2016). Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8897–8907. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw699>
- Zhao, Y., Xu, C., Chen, X., Jin, H., ja Li, H. (2025). Structural basis for hygromycin B inhibition of yeast pseudouridine-deficient ribosomes. *Science Advances*, 11(14), eadu0151. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adu0151>
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Yamauchi, Y., Ishikawa, H., Takahashi, N., Nakayama, H., ja Isobe, T. (2016). The complete chemical structure of *Saccharomyces cerevisiae* rRNA: Partial pseudouridylation of U2345 in 25S rRNA by snoRNA snR9. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8951–8961. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw564>
- Wang, W., Zhu, Y., Abraham, N., Li, X.-Z., Kimber, M., ja Zhou, T. (2021). The Ribosome-Binding Mode of Trichothecene Mycotoxins Rationalizes Their Structure—Activity Relationships. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1604. <https://doi.org/10.3390/ijms22041604>

- Warringer, J., ja Blomberg, A. (2003a). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/yea.931>
- Warringer, J., ja Blomberg, A. (2003b). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/yea.931>
- Wilson, D. N., ja Doudna Cate, J. H. (2012). The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a011536–a011536. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wilson, D. N., ja Nierhaus, K. H. (2003). The Ribosome through the Looking Glass. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(30), 3464–3486. <https://doi.org/10.1002/anie.200200544>
- Xu, B., Liu, L., ja Song, G. (2022). Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 816398. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.816398>
- Yang, J., Sharma, S., Watzinger, P., Hartmann, J. D., Kötter, P., ja Entian, K.-D. (2017). Correction: Mapping of Complete Set of Ribose and Base Modifications of Yeast rRNA by RP-HPLC and Mung Bean Nuclease Assay. *PLOS ONE*, 12(3), e0173940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173940>
- Ronald Varik, Magistritöö 2025. Pagaripärmi ribosoomi peptidüültransferaasi keskuse piirkonnas paiknevate evolutsiooniliselt konserveerunud rRNA modifikatsioonide mõju temperatuuritundlikkusele. Molekulaar ja Rakubioloogia Instituut, Tartu

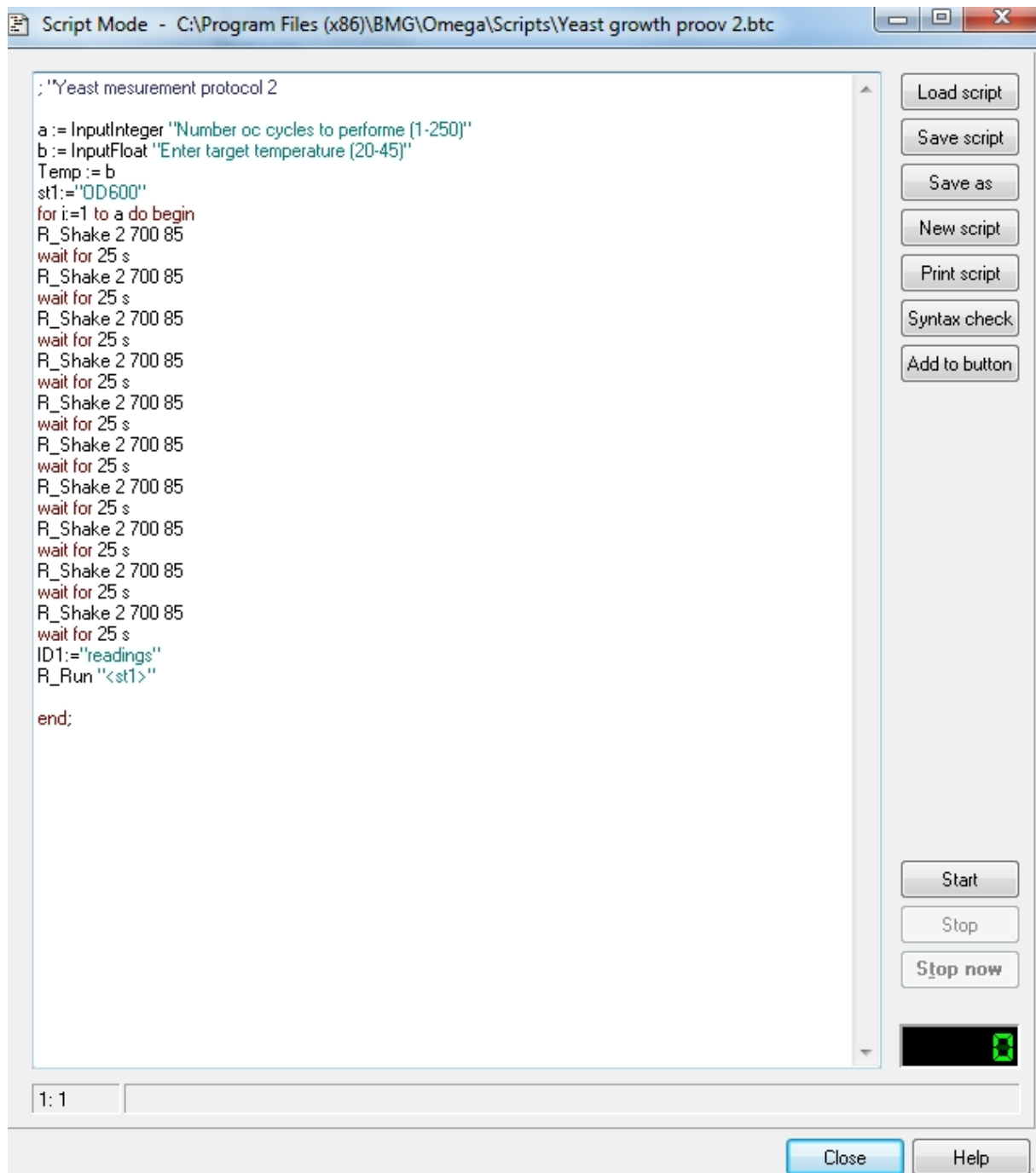
LISAD

Lisa 1.



Joonis 8. Esimene *script-mode*-ga kohandatud mõõtmisprogramm. Joonisel on näidatud esimest *script-mode*-ga kohandatud mõõtmis programmi.

Lisa 2.



Joonis 9. Teine *script-mode*-ga kohandatud mõõtmisprogramm. Joonisel on näidatud teist *script-mode*-ga kohandatud mõõtmis programmi.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Taavi Tamm,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
**Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* kasvutingimuste optimeerimine
antibiootikumitundlikkuse hindamiseks,**
mille juhendaja on Margus Leppik,
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.

Taavi Tamm

25.05.2026