

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Maarja Matsoo

**Ribosoomi biogeneesi metüültransferaas WBSCR22 on rakus reguleeritud
TRMT112 poolt**

Magistritöö

Juhendajad: *Ph D* Reet Kurg

M Sc Kadri Õunap

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Williams-Beureni sündroom.....	6
1.2. 7q11.23 genoomipiirkond.....	7
1.3. Valk WBSCR22	10
1.4. Bud23 ja Rid2 – WBSCR22 homologid pärmis <i>S. cerevisiae</i> ja müürloogas <i>A. thaliana</i>	12
1.5. Trm112 valk, inimese TRMT112 valgu homolog pärmis <i>S. cerevisiae</i>	13
1.6. Ribosoomide biogenees	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Plasmiidid	20
2.2.2. Eukarüootsed rakud	20
2.2.3. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel.....	21
2.2.4. Konfokaalmikroskoopia	21
2.2.5. Proteaasi inhibiitori MG-132 lisamine eukarüootsetele rakkudele	21
2.2.6. Läbivoolutsütomeetria	22
2.2.7. Rakutsükli analüüs kasutades läbivoolutsütomeetriat	22
2.2.8. <i>Western blot</i>	23
2.3. Tulemused	24
2.3.1. WBSCR22 valk muudab TRMT112 lokaliseerimise rakus	24
2.3.2. <i>Wild-type</i> WBSCR22 valgu stabiilsus rakus erineb mutantsetest WBSCR22 valkudest.....	27
2.3.3. WBSCR22 valgu hulk rakus on kontrollitud 26S proteasoomi raja poolt	33
2.4. Arutelu	37
KOKKUVÕTE	42

SUMMARY.....	43
TÄNUSÕNAD	44
KASUTATUD KIRJANDUS.....	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	56
LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

ADHD – tähelepanu puudulikkuse ja hüperaktiivsuse häire (*attention deficit hyperactivity disorder*)

CTD – karboksü-terminaalne domeen (*C-terminal domain*)

FACS – läbivoolutsütomeetria (*fluorescence activated cell sorter*)

FITC – fluoresteiin isotiotsüanaat (*fluorescein isothiocyanate*)

FCS – vasika loote seerum (*fetal calf serum*)

IMDM – Isove'i muudetud Dulbecco sööde (*Iscove's modified Dulbecco's medium*)

LCR – madalakoopiaarvuline kordus (*low copy repeat*)

MTD – metüültransferaasne domeen (*methyltransferase domain*)

NAHR – mittealleelne homoloogiline rekombinatsioon (*non-allelic homologous recombination*)

NoRS – tuumakese lokalisatsiooni/kinnihoidmise signaaljärjestus (*nucleolus–nucleolar localization/retention signal*)

PBS – fostaadiga puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PI – propiidiumjodiid (*propidium iodide*)

PVDF – polüvinülideendifloriid (*polyvinylidene difluoride*)

SAM – S-adenosüül-L-metioniin (*S-adenosyl-L-methionine*)

SILAC – aminohapete märgistamine stabiilsete isotoopidega rakukultuuris (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*)

siRNA – lühike vaigistav RNA (*short interfering RNA*)

SSU – ribosoomi väike subühik (*small subunit*)

Trm112 – tRNA metüültransferaas 11-2 (*tRNA methyltransferase 11-2*)

TRMT112 – tRNA metüültransferaas 11-2 (*tRNA methyltransferase 11-2*)

WBS – Williams-Beureni sündroom

WBSCR22 – Williams-Beureni sündroomi kromosomaalne regioon 22 (*Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22*)

SISSEJUHATUS

Williams-Beureni sündroomi (WBS) on multisüsteemne arenguhäire, mis on põhjustatud 7. kromosoomi pikast õlast umbes 28 valku kodeeriv ala deletsioonist. Patsientidel esineb laiaskaalalisi fenotüübilisi muutusi, millede hulka kuuluvad muuhulgas erinevaid kardiovaskulaarsed, neuroloogilised, endokrinoloogilised ja gastrointestinaalsed probleemid. Samas on pole siiani kõikide WBS puhul deleteeruvate geenide funktsioonid täielikult teada ning seetõttu puudub selge arusaamine Williams-Beureni sündroomi haigusfenotüübi tekke põhjustest.

WBS puhul deleteerivas regioonis asub ka WBSCR22 (Williams-Beureni sündroomi kromosomaalne regioon 22, *Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22*) valku kodeeriv ala. WBSCR22 valku ekspresseerivad mitmed normaalse fenotüübiga keharakud, kuid nimetatud valgu kõrgemat ekspressioonitaset on tähendatud ka mitmetes kasvajarakkudes. Hiljuti näidati, et WBSCR22 on seotud ribosoomide biogeneesiga, mõjutades just 18S rRNA hilist maturatsiooni. Seega on WBSCR22 vajalik rakkude normaalseks kasvuks. Pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) mudelis on näidatud WBSCR22 homoloogi Bud23 valku interaktsiooni Trm112 (tRNA metüültransferaas 11-2, *tRNA methyltransferase 11-2*) valguga. Trm112 on väike tsinksõrm domeene omav valk, mis interakteerub paljude erinevate valkudega, mõjutades nii ribosoomi suure kui ka väikese subühiku sünteesi. Trm112 valgu imetajarakkudes leiduva homoloogi TRMT112 (tRNA metüültransferaas 11-2, *tRNA methyltransferase 11-2*) kohta on vähem andmeid, nagu ka WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelise interaktsiooni kohta.

Magistritöö eesmärgiks on anda ülevaade andmebaaside ja senise kirjanduse põhjal Williams-Beureni sündroomist ja selle puhul tekkivatest geneetilistest ümberkorraldustest, ribosoomide biogeneesist ning WBSCR22 ja TRMT112 valkudest. Eksperimentaalses osas uuritakse WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelise interaktsiooni ning WBSCR22 valgu stabiilsust.

Töö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: proteoomika, metüültransferaas, ribosoomi biogenees.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Williams-Beureni sündroom

Williams-Beureni sündroom (WBS) on haruldane geneetiline haigus (1:7500 – 1:20000), mis on põhjustatud 26 kuni 28 geeni (1,5-1,8 Mb) deletsioonist 7. kromosoomi pikast õlast (Francke 1999; Merla *et al.* 2002). WBS patsiendid omavad sagedasti sidelihaskoe, kilpnäärme, veresoonkonna, urinaartrakti ja gastrointestinaalseid arenguhäireid, lisaks esineb neil haigusele iseloomulik nägu, lühike kasv ning vaimse arengu häireid (Schubert 2009).

WBS puhul on tavalisteks fenotüübilisteks tunnusteks suurte või keskmise suurusega arterite ahenemine (kõige enam on levinud supravulvaarne aordistenoos), hüpertensioon ehk püsivalt kõrge arteriaalne vererõhk ning sidekoe anomaaliad (Francke 1999; Morris and Mervis 2000). Patsientidel esineb sageli ka kõrge või keskmise sagedusega toonide kuulmise kaotust, glükoositalumatust või *diabetes mellitus*-t ehk suhkruhaigust ning erinevaid gastrointestinaalseid, neuroloogilisi, optamoloogilisi, endokriinseid, genitouriaal-, naha- ja kaaluprobleeme (Tassabehji 2003; Henrichsen *et al.* 2011). Samuti on Williams-Beureni sündroomiga isikutel mõõdukas kuni keskmine intellektuaalne alaareng, väga sotsiaalne ja sõbralik isiksus, tihti esineb ka tähelepanu puudulikkuse ja hüperaktiivsuse häiret (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) ning teisi psüühilisi häireid (Morris and Mervis 2000; Pober 2010). Haiguse eripäraks on kognitiivsete võimete suur lõhe – enamikel patsientidel on väga hästi arenenud kuulmis- ja keelilised võimed, kuid visuopaatilised (võime nähtut ära tunda ja analüüsida) ülesanded valmistavad WBS patsientidele raskusi (Ewart *et al.* 1993; Henrichsen *et al.* 2011). Väikelastel esineb sageli hüperkaltsseemiat, mis taandub D-vitamiini manustamisel ning kaltsiumivaese toidu tarbimisel (Morris and Mervis 2000). Williams-Beureni sündroomiga patsientide eluiga on tervete indiviididega võrreldes lühem ning enamasti on WBS patsientide surma põhjuseks erinevad kardiovaskulaarsed komplikatsioonid (Tassabehji 2003).

Enamike WBS haigusjuhtude puhul on tegemist *de novo* deletsiooniga, kuid esineb ka autosomaalset dominantset päritavust (Ewart *et al.* 1993; Merla *et al.* 2002; Hobart *et al.* 2010). Hetkel pole veel täpselt teada, kuidas 7. kromosoomi pikas õlas aset leidvad deletsioonid viivad haigusega seotud fenotüübi tekkeni (Pober 2010).

1.2. 7q11.23 genoomipiirkond

7q11.23 positsioonis olevat ala nimetatakse WBS kriitiliseks regiooniks (Francke 1999; Merla *et al.* 2002). WBS lookuse geneetiline arhitektuur on unikaalne – seal on kõrge homoloogiaga geenide ja pseudogeenide kogumikud, mis on organiseeritud 3 madala koopiaarvuga kordusjärjestusse (*low copy repeats*, LCR), mida nimetatakse ka duplikonideks (Osborne *et al.* 2001; Schubert 2009; Pober 2010). Need LCR regioonid jagunevad kolmeks LCR blokiks: A, B ja C, mida on omakorda kolmes korduses. Blokid A_c (*centromeric*), B_c ja C_c asuvad tsentromeerses, A_m (*middle*) B_m ja C_m mediaalses ning A_t (*telomeric*) B_t ja C_t telomeerses piirkonnas (lookuse skeem on välja toodud joonisel 1; Cuscó *et al.* 2008; Schubert 2009; Merla *et al.* 2010). Tsentromeersed ja mediaalsed lookuse kontrollregioonid on teineteisega samas orientatsioonis, kuid telomeerne LCR on eelnevatega võrreldes vastassuunaliselt orienteeritud (Bayés *et al.* 2003). Nende LCR järjestuste vaheline homoloogia on üle 95% (Scherer *et al.* 2003). LCR blokkide otstes ja mõnede duplitseerinud blokkide sees asuvad peamiselt Alu S alamperekonda kuuluvad Alu elemendid – kordusjärjestused, mis on olulised kromosomaalsete ümberkorralduste tekkel (Antonell *et al.* 2005). On oletatud, et WBS geeniregiooni LCR-d tekkisid umbes 25 miljonit aastat tagasi ajal, kui makaagid lahknesid teistest hominoididest (DeSilva *et al.* 1999; Antonell *et al.* 2005).

Kõrge järjestuste homoloogia tõttu on 7. kromosoomi LCR regioonide rikkad osad vähese stabiilsusega ning LCR blokkide vahel võib toimuda mittealleelne homoloogiline rekombinatsioon (*nonallelic homologous recombination*, NAHR). See protsess võib toimuda kas homoloogiliste kromosoomide (interkromosomaalne) või ühe kromosoomi erinevate kromatiidide vahel (intrakromosomaalne; Howald *et al.* 2006; Cuscó *et al.* 2008). Interkromatiidne NAHR esineb ligi kahel kolmandlikul WBS patsientidest (Osborne *et al.* 2001; Cuscó *et al.* 2008). B blokkides asuvad n-ö kromosoomi katkemise tulipunktid ehk järjestused, kust saab alguse NAHR kahe homoloogilise bloki vahel ning need asuvad enamasti B_c ja B_m blokkide proksimaalsemal poolel (Bayés *et al.* 2003).

Ligikaudu 95% WBS diagnoosiga patsientide puhul on tähendatud umbes 1,5 Mb suurust deletsiooni tsentromeerse B_c ja mediaalse B_m bloki vahel (joonis 1, Bayés *et al.* 2003; Hobart *et al.* 2010). Osadel patsientidel esineb ka suuremaid, kuni 1,8 Mb deletsioone, samuti esineb osalise suurusega deletsioone, suurusega 0,1-1 Mb (Schubert 2009). Suuremad deletsioonid on tekkinud A_c ja A_m blokkide vahelisel rekombinatsioonil, mida esineb umbes 5% WBS patsientidel (Bayés *et al.* 2003). Patsientidel, kellel esineb atüüpiline deletsioon WBS

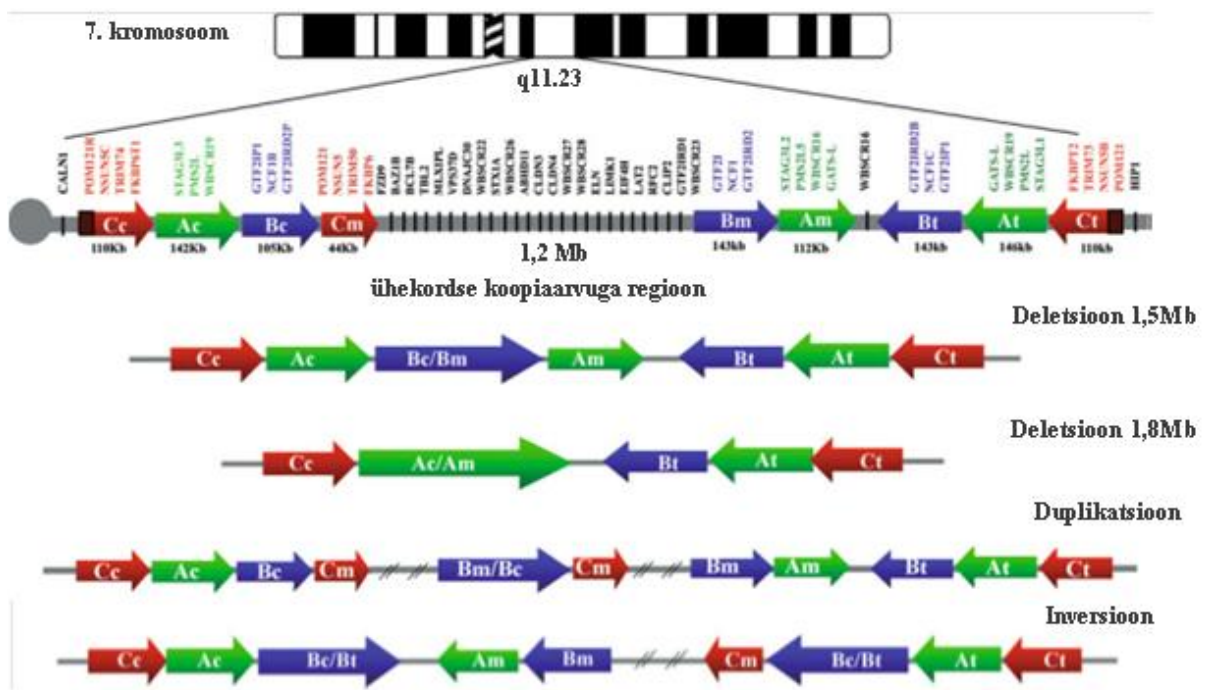
kromosomaalse regiooni telomeerses osas, omavad tavaliselt WBS sündroomiga kaasnevaid fenotüübilisi muutusi, kuid patsiendid, kelle atüüpiline deletsioon ei hõlma telomeerset osa, omavad väiksemal hulgal ja kergekujulisi WBS haigustunnuseid (Morris and Mervis 2000; Howald *et al.* 2006; Tam *et al.* 2008).

Duplikatsioonid 7q11.23 genoomipiirkonnas toimuvad kromosoomide vahelise rekombinatsiooni tulemusena (Schubert 2009). Patsiendid, kellel on WBS regioonis duplikatsioon, ning kes omavad seetõttu 7q11.23 regioonis kõikidest seal olevatest geenidest 3 koopiat, ei meenuta välimuselt ega kognitiivselt Williams-Beureni sündroomiga patsiente, kuid neil võib olla teatud WBS patsientidele iseloomulikke jooni nagu keeleliste oskuste hiline areng ja neonataalne hüpotoonia ehk vastsündinu madal vererõhk ning mõningatel juhtudel ka autismile sarnased sümptomid ja epilepsia (Van der Aa *et al.* 2009). Lisaks teistele haigussümptomitele võidakse omada ka tähelepanu puudulikkuse ja hüperaktiivsuse häiret (ADHD) või autismi (Schubert 2009), kuigi nende põhjuseks võivad olla ka muud geneetilised ja/või keskkonnafaktorid (Morris and Mervis 2000; Berg *et al.* 2007). Arvatavasti on duplikatsioonid sama sagedased kui deletsioonid, kuid duplikatsioonid jäävad sageli diagnoosimata, sest patsientide haigusfenotüüp on leebem ja varieeruvam võrreldes WBS patsientidega (Van der Aa *et al.* 2009). Tihti on duplikatsioonidega lastel ainsaks sümptomiks hilisem rääkimaõppimine võrreldes normaalse fenotüübiga eakaaslastega (Van der Aa *et al.* 2009).

Lisaks esineb 7q11.23 piirkonnas ka paratsentrilisi inversioone, suurusega 1,8-2,9 Mb, mille põhjuseks on NAHR kahe paadunud LCR bloki vahel (Schubert 2009). Tsentromeerne A, B või C LCR blokk valepaardub telomeerse A, B või C LCR blokiga (skemaatiliselt kujutatud joonisel 1; Osborne *et al.* 2001; Bayés *et al.* 2003). WBS kromosomaalse regiooni inversiooni peetakse n-õ healoomuliseks polümorfismiks, sest inversiooni kandjad ei oma fenotüübilisi muutusi (Osborne *et al.* 2001; Tam *et al.* 2008). Samas, kui vanem kannab enda 7q11.23 piirkonnas inversiooni, suurendab see oluliselt riski saada Williams-Beureni sündroomiga last (meioosis kromosoomide paardumisraskuste tõttu tekivad mikroleletsioonid; Osborne *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2006). WBS kromosomaalse ala inversioonid on ligikaudu kolmandikul Williams-Beureni sündroomiga patsientide vanematest (Bayés *et al.* 2003; Scherer *et al.* 2005).

Williams-Beureni sündroomile iseloomuliku fenotüübi tekkel on oluliseks elastiini (ELN) geeni alleeli deletsioon, mis on seotud vaskulaarse stenoosi tekkega, lisaks on pakutud ka

teiste geenide rolli konkreetsete fenotüüpide kujunemisel, kuid need seosed pole nii selged (Pober 2010). Samuti võivad haiguse tekkel olla oluliseks ka deleteeruva alaga külgnevad regioonid, millede ekspressioon võib väheneda nende muutunud positsiooni tõttu (Morris and Mervis 2000; Pober 2010). Senini pole hästi teada, kuidas Williams-Beureni sündroomini viivad geneetilised muutused tekitavad vastava haiguse fenotüübi, sest vähesed geenid WBS regioonis on haplopuudulikud ning geenidoosid võivad sõltuda geneetilisest taustast ja keskkonnast (Tassabehji 2003). Samuti pole andmeid, kas nimetatud haiguse korral on geneetilised efektid aditiivseid või mitte.



Joonis 1. 7q11.23 geenipiirkonna genomsete ümberkorralduste skemaatiline joonis (joonis ei ole skaalas). Tsentromeersed (*centromeric*, c), keskmised (*middle*, m) ja telomeersed (*telomeric*, t) LCR blokid (A, B ja C) on joonistatud värviliste nooltega, noole suund näitab bloki suhtelist orientatsiooni. Geenid, mis on blokkides mitme koopiana, on esitatud ainult ühekordsetena. On välja toodud Williams-Beureni sündroomi puhul sagedasemad 1,5 ja 1,8 Mb suurused deletsioonid, samuti duplikatsioon ja inversioon (Merla *et al.* 2010).

Williams-Beureni sündroomi uurimisel on peamiseks loomudeliks hiir *Mus musculus*, kuid inimese ja hiire kromosoomide vahelised erinevused tingivad selle, et kuigi hiirel on inimese 7q11.23 regioonile vastav ala 5C, siis selle 5C ala deletsiooni fenotüüp ei vasta täielikult

inimese WBS fenotüübile (Osborne 2010). Arvatavasti on 7q11.23 regioon välja kujunenud pärast hiire ja inimese eellaste lahknemist (Osborne 2010).

1.3. Valk WBSCR22

WBSCR22 (*Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22*, Williams-Beureni sündroomi kromosomaalne regioon 22) on üks 22 geenist, mis asub WBS regioonis ühe koopiana C_m ja B_m blokkide vahel (Merla *et al.* 2002). WBSCR22 valk on evolutsioonis kõrgelt konserveerunud *Caenorhabditis elegans*-st ja *Saccharomyces cerevisiae*-st kuni inimeseni (*Genecards*). Nimetatud geeni genoomi DNA on üle 45 kb, kuhu kuulub 12 eksonit, ja selle pealt toodetav transkripti on 843 bp (Doll and Grzeschik 2001). WBSCR22 valk koosneb 281 aminohapest, molekulmass on ligikaudu 31,8 kDa ja isoelektriline punkt 8,95 (Doll and Grzeschik 2001).

WBSCR22 valk omab kaheosalist tuuma lokalisatsiooni signaali, N-terminaalset S-adenostüül-L-metioniini (*S-adenosyl-L-metionine*, SAM) ehk ehk AdoMet seondavat domeeni, kus on metüültransferaasidele iseloomulik Rosman-*fold* struktuuriline kese – seitsmest β -lehest koosnev motiivi, mida esineb metüültransferaaside ubiE/COQ5 perekondades (Doll and Grzeschik 2001; Petrossian and Clarke 2011). Metüültransferaasid, mis omavad SAM-sõltuvat metüültransferaasid domeeni, reguleerivad tihti geenide transkriptsiooni läbi DNA või histoonide metüülatsiooni (Martin and McMillan 2002), kuid WBSCR22 valgul puuduvad sellistele ensüümidele iseloomulikud katalüütiline tšenter (Pro-Cys motiiv) ja DNA metüültransferaase seondav motiiv (Takebayashi *et al.* 2007). WBSCR22 valgu metüültransferaasne aktiivsus ei ole veel tõestust leidnud.

1,2kb suuruse WBSCR22 mRNA tase on kõrge nii testistes, südames, skeletilihastes, kopsudes, põrnas kui ka maksas (Doll and Grzeschik 2001; Merla *et al.* 2002). Nimetatud valku ekspresseeritakse suurel hulgal ka invasiivse rinnavähi ja hulгимüeloomi korral (Nakazawa *et al.* 2010; Tiedemann *et al.* 2012). Nakazawa *et al.* (2010) leidsid, et hiire WBSCR22 suurendab veresoontes kasvajakude ellujäämist ja seeläbi reguleerib metastaaside teket [seetõttu anti WBSCR22 valgule ka alternatiivne nimi Merm1 ehk metastaaside moodustumisega seotud metüültransferaas 1 (*metastasis-related methyltransferase 1*)], kusjuures viimaste tekkel on oluliseks just WBSCR22 valgu SAM-sõltuv metüültransferaasne domeen. Seega võib WBSCR22/Merm1 olla vähiteraapias

oluliseks sihtmärgiks, kuna nimetatud valgu mõju kasvajakudede proliferatsioonile ei ole organspetsiifiline.

WBSCR22/Merm1 metüleerib kas otse või kaudselt Zac1 geeni, mille pealt kodeeritav valk soodustab rakkude minekut apoptoosi, täpsemalt Zac1 promooteralas olevat H3 histooni positsioonis Lys⁹ ning selle tulemuseks on Zac1-p53-sõltuva apoptoosiraja inhibeerimine (Huang *et al.* 2001; Nakazawa *et al.* 2010). Ometi *in vitro* metülatsioonikatses puhastatud WBSCR22/Merm1 histooni H3 ei metüleerinud (Nakazawa *et al.* 2010; Jangani *et al.* 2014), mis tõenäoliselt tähendab, et WBSCR22/Merm1 valgul siiski puudub histoonide metüleerimise võime.

Arvatavasti on enamus WBSCR22 valgust rakutuumas vabalt või kompleksis mõne teise valguga (Õunap *et al.* 2013). On leitud, et mitmed WBSCR22-ga interakteeruvad valgud on seotud ribosoomide biogeneesiga ning WBSCR22 valgu interaktsioonipartneritena on leitud ka histoonide modifitseerimises ja ribosoomide biogeneesis osalevaid valke ning ubikvitiini ligaase, mis annab alust oletada, et WBSCR22/Merm1 valgu hulga regulatsioon võib toimuda läbi ubikvitinüleerimise ja 26S proteasoomi (Jangani *et al.* 2014). Vaigistatud WBSCR22 geeniga rakkudes on 18S-E pre-rRNA hulk suurem kui normaalse fenotüübiga rakkudes, seega on WBSCR22/Merm1 valgu olemasolu vajalik 18S pre-rRNA protsessinguks ja seeläbi 40S subühikute biogeneesiks, kuigi nimetatud valk ei assotsieeru ribosoomidega otse (Wild *et al.* 2010; Tafforeau *et al.* 2013; Õunap *et al.* 2013). Lisaks on siRNA-dega vaigistatud WBSCR22/Merm1 valgu korral on rakkude kasvufenotüüp normaalsest aeglasem, seega omab nimetatud valk olulist rolli rakkude kasvul (Õunap *et al.* 2013).

Jangani *et al.* (2014) leidsid, et WBSCR22/Merm1 reguleerib glükokortidi retseptorite koaktivatsiooni, kuigi ei seonu nendele otseselt. Glükokortikoidid on klass steroidhormoone, mis on seotud põletikuliste reaktsioonide mahasurumisega organismis. Inflamatoorsete ja neoplastiliste kopsupatoloogiate korral toimub bronhide epliteelis WBSCR22/Merm1 valgu ekspressiooni langus, mis süveneb haiguse progresseerudes (Jangani *et al.* 2014). Samuti on B- ja CD8⁺ T-lümfotsüütides väiksem WBSCR22/Merm1 ekspressioon, mis võib anda alust arvata, et nimetatud valk on seotud põletikuliste signaalide ülekande toetamisega (Jangani *et al.* 2014).

1.4. Bud23 ja Rid2 – WBSCR22 homoloogid pärmis *S. cerevisiae* ja müürloogas *A. thaliana*

Praeguseks on iseloomustatud kaks WBSCR22 homoloogi – pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valk Bud23 ja müürlooga (*Arabidopsis thaliana*) valk Rid2 (*root initiation defective 2*). WBSCR22 valk suudab komplementeerida Bud23 valgu funktsiooni (Õunap *et al.* 2013). Bud23 ortoloogid on läbi eukarüootide domeeni konserveerunud, kuid arhede ja bakterite seas selle perekonna liikmeid ei leidu (White *et al.* 2008).

Bud23 valk on 18S rRNA metüültransferaas, tema metüültransferaasne domeeni (aminohapped 1-219) deletsioon toob kaasa Bud23 valgu funktsionaalsuse vähenemise (White *et al.* 2008). Bud23 poolt läbiviidav 18S rRNA G1575 metülatsioon on eukarüootides evolutsiooniliselt konserveerunud, kuid G1575 metülatsiooni puudumine avaldab pärmirakkudele vähest mõju (McCloskey and Rozenski 2005; White *et al.* 2008). See annab aluse oletada, et Bud23 valgu metüültransferaasse aktiivsuse olemasolu ei ole vajalik ribosoomi väikese subühiku biogeneesiks (White *et al.* 2008).

Bud23 ei ole pärmi elutegevuseks essentsiaalne valk, kuid teda kodeeriva geeni deletsioon viib aeglase kasvuga fenotüübi ja rRNA protsessingu häirete tekkimiseni (Niewmierzycka and Clarke 1999; White *et al.* 2008). Defektse *BUD23* geeniga pärmitüves on 40S subühikute biogeneesi defektid, mis viivad subühikute tasakaalu nihkeni – vaba 40S peaaegu puudub, samas kui 60S subühikute hulk on suurenenud (White *et al.* 2008; Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012). Lisaks on näidatud, et pre-40S ribosoomi sünteesil on olulisemaks Bud23 enda olemasolu, mitte tema katalüütiline aktiivsus rRNA modifikatsioonide tekitamiseks (White *et al.* 2008).

Bud23 valk omab pärmirakus mitmeid interaktsioonipartnereid. Sardana *et al.* (2013) leidsid, et Bud23 valk interakteerub väikese subühiku protsessiooni varaseima valkude subkompleksi (UTP-A kompleksi), 40S subühiku biogeneesi keskmise staadiumi valkude, RNAas MRP ribonukleoproteiinkompleksi valkude ning mitmete teiste nii väikese subühiku biosünteesist osavõtvate valkudega kui ka valkudega, mis ei ole seotud 40S biogeneesiga. Hiljuti leidsid Sardana *et al.* (2014), et Bud23 interakteerub Ecm16/Dhr1 valguga ning see interaktsioon on vajalik 18S rRNA sünteesiks. Ecm16/Dhr1 on U3 snoRNA-le spetsiifilise ATP-sõltuva DEAD/D-box RNA helikaas, mida on vaja 18S rRNA sünteesiks (Colley *et al.* 2000). Kuna Bud23 ja Ecm16/Dhr1 valkude vahel toimub füüsiline interaktsioon, oletati, et Bud23 on selles kompleksis Ecm16/Dhr1 valgu aktivaatoriks (Sardana *et al.* 2014).

Rid 2 on müürloogas Bud23 valgu homoloog, mis omab samuti SAM-sõltuvat metüültransferaasset domeeni ja tuuma lokalisatsiooni signaali (Ohbayashi *et al.* 2011). Rid2 on seotud tuumakeste vakualisatsiooni, pre-rRNA protsessingu ja rRNA sünteesiga ning rakkude jagunemise reaktivatsiooniga, mõjutades rakkude proliferatsioonilise kompetentsuse omandamist ja aidates seda säilitada (Ohbayashi *et al.* 2011). *Knock-out* mutantide analüüsimisega on näidatud, et Rid2 on müürloogas essentsiaalseks valguks (Ohbayashi *et al.* 2011). Erinevalt Bud23 valgust Rid2 metüülatsioonilise aktiivsuse kohta seni andmed puuduvad. Bud23 ja Rid2 valk lokaliseeruvad rakus WBSCR22 valgust erinevalt – WBSCR22 asetseb difuusselt tuumas (Nakazawa *et al.* 2010; Õunap *et al.* 2013), samas kui Bud23 ja Rid2 valgud kogunevad tuumakesse (White *et al.* 2008; Ohbayashi *et al.* 2011).

1.5. Trm112 valk, inimese TRMT112 valgu homoloog pärmis *S. cerevisiae*

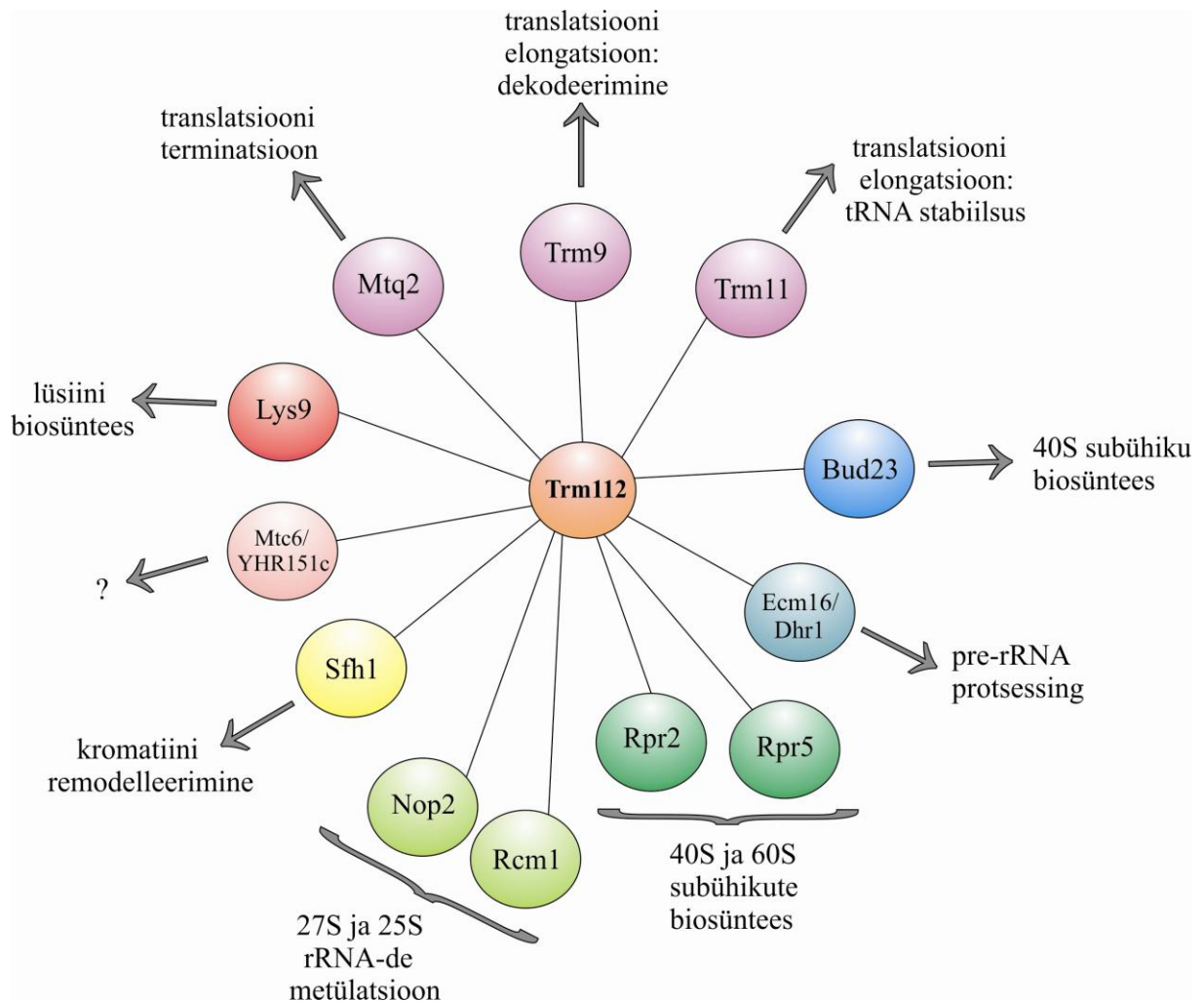
Pagaripärmi Trm112 (*tRNA methyltransferase 11-2*, tRNA metüültransferaas 11-2, süstemaatilise nimega YNR046W) on väike tsinksõrm domeeni omav valk suurusega 15 kDa (Purushothaman *et al.* 2005; Mazauric *et al.* 2006). Trm112 koosneb 135 aminohappest ning valgu isoelektriline punkt on 4,45 (*Saccharomyces Genome Database*). Trm112 valk koosneb kahest domeenist, tema n-ö tsinksõrmed asuvad N- ja C-terminaalsetes osades (aminohapped 1-30 ja 107-135; Purushothaman *et al.* 2005). Tsinksõrm domeenid koosnevad neljast tsüsteiinijäägist ja nende vahel olevatest kindla suurusega vahejärjestustest ning nad on oma nime saanud sõrme meenutava sekundaarstruktuuri tõttu (Purushothaman *et al.* 2005; Mazauric *et al.* 2006). Nimetatud regioonid on konserveerunud nii eukarüootides, arhedes ja bakterites (Purushothaman *et al.* 2005). Teine, tsentraalne helikaalne domeen (aminohapped 31-106) on konserveerunud ainult eukarüootides (Purushothaman *et al.* 2005; Heurgué-Hamard *et al.* 2006).

Kuna pärmirakud, milles Trm112 geen on defektne, on küll eluvõimelised, kuid väga aeglase kasvufenotüübiga, on tegemist pagaripärmi jaoks essentsiaalse geeniga (*Saccharomyces Genome Database*, Mazauric *et al.* 2006). Praeguseks on teada, et Trm112 on oluline nii ribosoomi väikese kui ka suure subühiku biogeneesil, omades mitmeid interaktsioonipartnereid (vt joonis 2; Purushothaman *et al.* 2005; Heurgué-Hamard *et al.* 2006; Mazauric *et al.* 2006; Liger *et al.* 2011; Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012).

Trm9-Trm112 kompleks katalüüsib metüülrühma liitmist mõnede tRNA-de (tRNA^{ARG(UCU)} ja tRNA^{GLU(UUC)}) *wobble* paardumises olevale uridiinjäägile positsioonis 34 (tekib 5-metoksükarbonüülmetüül-uridiin, mcm⁵U34), mis on vajalik translatsiooni elongatsioonil aset leidvaks koodonite dekodeerimiseks (Kalhor and Clarke 2003; Mazauric *et al.* 2006; Studte *et al.* 2008; Torres *et al.* 2014). Need modifitseeritud tRNA-d on spetsiifiliseks sihtmärgiks *Kluyveromyces lactis*-e poolt toodetavale spetsiifilisele tRNA toksiinile zümotsiinile (*zymocin*; Studte *et al.* 2008), seega võtab U34 modifikatsiooni osa pärmiraku stressivastuse tekkest.

Trm11-Trm112 kompleks metüleerib nii *in vivo* kui *in vitro* tRNA-des guanosiini positsioonis 10 (m²G10) ning nimetatud modifikatsioon suurendab tRNA-de stabiilsust (Purushothaman *et al.* 2005; Mazauric *et al.* 2006). *In vivo* ja *in vitro* moodustub Bud23-Trm112 kompleks, mis võtab osa 40S subühikute biogeneesist ning sarnaselt Bud23 deletsioonile on ka Trm112 deletsioonil on häiritud ka G1575 metülatsiooni teke (Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012). Mtq2-Trm112 kompleks on vajalik eRF1-eRF3-GTP (pärmis Sup45-Sup35-GTP) kompleksi tekkeks (Stansfield *et al.* 1995; Heurgué-Hamard *et al.* 2005; Polevoda *et al.* 2006). Mtq2 on essentsiaalne tsütoplasmaatilise eRF1 valgu konserveerunud GGQ motiivi glutamiinjäägi metülatsiooniks (Heurgué-Hamard *et al.* 2005; Heurgué-Hamard *et al.* 2006; Polevoda *et al.* 2006).

Trm112 valk on nii Trm9-Trm112, Trm11-Trm112 ja Mtq2-Trm112 valkude kompleksides katalüütiliseks subühikuks (Liu *et al.* 2010; Liger *et al.* 2011). Trm112 vastutab enda interkatsioonipartnerite õige voltumise ja stabiilsuse ning seeläbi ka metüültransferaasse aktiivsuse eest (Purushothaman *et al.* 2005; Heurgué-Hamard *et al.* 2006; Mazauric *et al.* 2006; Figaro *et al.* 2008; Graille *et al.* 2012). Erinevad interaktsioonipartnerid konkureerivad Trm112 valguga seondumise pärast ning nimetatud valk interakteerub kõikide oma eelpool nimetatud interaktsioonipartneritega eraldi, mitte ei teki pentameerset Trm112-Trm11-Trm9-Mtq2-Bud23 valkkompleksi (Purushothaman *et al.* 2005; Studte *et al.* 2008). Seetõttu ei saa Trm112 tekitada rakus ka pikaajalisi stabiilseid komplekse, kuna Trm112 valku on ühes rakus umbes 4800 molekuli, samas kui Mtq2, Bud23, Trm9 ja Trm11 molekule kokku on umbes 8900 (Ghaemmaghani *et al.* 2003). Lisaks on Trm112 interaktsioonipartnerite hulk kas või osaliselt sõltuv rakus oleva Trm112 valgu hulgast (Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012).



Joonis 2. Trm112 valgu interaktsioonipartnerid. Metüültransferaasid Mtq2, Trm9 ja Trm11 võtavad osa translatsiooni eri aspektidest ning Trm112 valk stabiliseerib neid interaktsioone. Trm112 omab rolle nii 40S kui ka 60S subühikute biosünteesis, interakteerudes Bud23, Ecm16/Dhr1, Rpr2, Rpr5, Nop2 ja Rcm1 valkudega. Lisaks võtab Trm112 osa kromatiini remodelleerimisest mitoosis ja lüsiini biosünteesirajast, interakteerudes vastavalt Sfh1 ja Lys9 valkudega. On tähendatud ka interaktsiooni metüültransferaasiga Mtc6/YHR151c, kuid viimase funktsioon rakus on teadmata.

Trm112 valk interakteerub *in vivo* Nop2 ja Rcm1 valkudega, mis mõlemad on seotud 60S subühikute biogeneesiga (Sardana and Johnson 2012; Sharma *et al.* 2013). Nop2 on tuumakese metüültransferaas, mida on vaja 60S subühikul 27S pre-rRNA protsessinguks, Rcm1 (YNL022C) on arvatavasti rRNA metüültransferaas, mis on lähedases suguluses Nop2 valguga (Sharma *et al.* 2013). Trm112 interakteerub ka väikese subühiku (*small subunit*, SSU) protsessoomiga assotsieerunud DEAH-box RNA helikaasi Dhr1/Ecm16 valguga, mis asub tuumakeses ning on vajalik 18S rRNA sünteesiks (Krogan *et al.* 2004; Krogan *et al.*

2006; Graille *et al.* 2012). Dhr1 valk on seotud pre-rRNA restruktureerimisega (Lüking *et al.* 1998; Colley *et al.* 2000). Trm112 interakteerub ka *trans*-faktoritega, mis on seotud nii väikese kui ka suure subühiku sünteesiga, nt Rpr5 ja Rpr2 (Figaro *et al.* 2012).

Lisaks on näidatud, et Trm112 interakteerub Lys9, Sfh1 ja Mtc6 (süsteemaatilise nimega YHR151c) valkudega (Ramos *et al.* 1988; Yu *et al.* 2008). Lys9 on sahharopiini dehüdrogenaas, mis võtab osa lüsiini biosünteesi rajast (Storts and Bhattacharjee 1987; Studte *et al.* 2008). Sfh1 on kromatiini struktuuri remodelleerimisega tegelev valk, mis on seega vajalik nii transkriptsioonil kui ka normaalse mitoosi toimumiseks ning on näidatud, et Trm112 on Sfh1 valgu positiivne regulaator (Hsu *et al.* 2003; Mazauric *et al.* 2006). Mtc6/YHR151c omab metüültransferaasset domeeni, kuid nimetatud valgu funktsiooni kohta rakus andmed puuduvad (Ramos *et al.* 1988; Purushothaman *et al.* 2005).

Trm112 valgu homolooge on leitud kõikidest eukarüootsetest mudelorganismidest, sh riisist (*Oryza sativa*) kuni inimeseni (Hu *et al.* 2010). Inimeses kodeerib pärmi Trm112 valgu homoloogi TRMT112 valku 11q13.1 geenipiirkond (*Genecards*). Gu *et al.* (2012) leidsid, et TRMT112 valk võib olla hiire embrüonaalses arengus essentsiaalseks geeniks, mis ekspresseerub paljudes eri organites, omades rolle nii aju, närvisüsteemi ja erinevate organite kudede arengus.

Trm112 valgu funktsionaalne homoloog müürloogas (*Arabidopsis thaliana*) on valk SMO2 (*small organ 2*), mida on vaja taimeorganite kasvuks. Defektse SMO2 geeniga mutandil on vähenenud rakkude jagunemine lehtede ja juurte kasvu ajal, kuid rakkude diferentseerumisvõime ei ole mõjutatud (Hu *et al.* 2010). See on tingitud sellest, et SMO2 on vajalik organogeneesi ajal rakkude G₂-M faasi progressiooniks (Hu *et al.* 2010). SMO2 valgu ekspressioon pärmis komplementeerib vigast Trm12 geeni, kompenseerides mõnevõrra Trm112 geeni vaigistamisel tekkivat kasvudefekti (Hu *et al.* 2010).

1.6. Ribosoomide biogenees

Ribosoomide biogenees on kompleksne protsess, mis eukarüootses rakus saab alguse rakutuuma sees asuvas kompartmendis, tuumakeses. Ribosoomide süntees algab polütsistronse pre-rRNA sünteesiga rDNA tandeemsetelt kordusjärjestustelt (Zemp and Kutay 2007; Wild *et al.* 2010). Ribosoomide valmimine algab tuumakeses

kotranskriptsiooniliselt ja ribosoomide sünteesist võtab osa üle 200 ribosoomi koostisesse mittekuuluva valgu ehk *trans*-faktori (Fatica and Tollervey 2002; Panse and Johnson 2010; Thiry *et al.* 2011). Pre-ribosoomid eksporditakse läbi tuuma poori komplekside ning alles tsütoplasmas saavutavad nad funktsionaalsuse (Thiry *et al.* 2011).

Tuumakeses transkribeerib RNA polümeraas I ribosomaalsele RNA-le vastavaid geene nii, et tekivad pikad prekursorimolekulid – pre-rRNA-d (Schäfer *et al.* 2003; Thiry *et al.* 2011). Äsjasünteesitud pre-rRNA moodustab koos *trans*-faktorite ja ribosomaalsete valkudega 90S pre-ribosoomi, mis lõigatakse pre-60S ja pre-40S partikliteks (Vanrobays *et al.* 2001; Zemp and Kutay 2007; Phipps *et al.* 2011). RNA polümeraas I produtseerib 35S/47S (vastavalt pärmis ja inimeses) primaarse transkripti, mida protsessitakse läbi keerulise ekso- ja endoribonukleotüütilise kaskaadi, luues kolm funktsionaalset rRNA-d: 18S (40S subühiku osa) ning 5.8S ja 25S/28S rRNAs (60S subühiku osad; Udem and Warner 1973; Brand *et al.* 1977; Lafontaine *et al.* 1995; White *et al.* 2008). Neljas rRNA – 5S rRNA – transkribeeritakse RNA polümeraas III poolt (Lafontaine *et al.* 1995; Thiry *et al.* 2011).

Tekkinud pre-rRNA molekulid läbivad mitmeid keerulisi nukleosiidide modifikatsioone enne, kui ekso- ja endonukleasid lõikavad rRNA suureks ja väikeseks subühikuks (Bachellerie *et al.* 2002). Nendest levinumad on 2'-*O*-riboosi metülatsioon ja pseudouridülatsioon ning nimetatud modifikatsioonide tekkekohad korreleeruvad ribosoomi funktsionaalsaitidega (Bachellerie *et al.* 2002; Decatur and Fournier 2002). Pseudouridiin ehk 5-ribosüüluratsiili moodustavad uridiini isomerisatsioonil spetsiifilised pseudouridiini süntaasid. Metülatsioonireaktsioonil on metüülrühma doonoriks tavaliselt S-adenosüülmetioniin (SAM; Martin and McMillan 2002).

Nukleoplasmat läbivate pre-40S partiklitega toimub suhteliselt vähe struktuurseid ümberkorraldusi ja nende eksport tsütoplasmasse toimub kiiremini, võrreldes pre-60S partiklitega (Udem and Warner 1973; Strunk and Karbstein 2009). Tuumast eksporditav pre-40S subühik koosneb 20S rRNA-st, väikese subühikuga seotud valkudest ja vähesel hulgal *trans*-faktoritest (Brand *et al.* 1977). 20S subühiku protsessimiseks funktsionaalseks 18S subühikuks on vaja Rrp10 (ribosomaalse RNA protsessingu valk number 10, *ribosomal RNA processing #10*, vanema nimega Rio1) valku ja dimetüültransferaasi Dim1 (Vanrobays *et al.* 2001; Gavin *et al.* 2002; Schäfer *et al.* 2003). Dim1 on lämmastikaluseid metüleeriv metüültransferaas, mille poolt teostatav dimetülatsioon pole hädavajalik ribosoomide

biogeneesi ega funktsiooni omandamiseks, kuid see võib olla vajalik translatsiooni täpsemaks toimumiseks (Lafontaine *et al.* 1998).

Pre-rRNA-de protsessimine funktsionaalseteks 18S rRNA-deks leiab aset peamiselt rakutuumas, kuid viimane 18S rRNA lõikamine 3' otsast toimub tsütoplasmas. Imetajarakkudes nimetatakse tsütoplasmasse viidud 18S rRNA prekursorit 18S-E pre-rRNA-ks (Rouquette *et al.* 2005).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Alates 2009. aastast on Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis käinud uuringud, et selgitada välja WBSCR22 funktsioon ja ülesanne rakus. Mõistmaks täielikult valguga rolli rakus, on vaja uurida ka tema interaktsioone teiste rakus paiknevate molekulidega. Lähtudes varasemalt tehtud teadusartiklitest ning meie laboris saadud katsetulemustest (Õunap, avaldamata andmed), leiti, et WBSCR22 interakteerub TRMT112 valguga – mitmete metüültransferaaside aktiivsust kontrolliva *chaperon*-valguga, mis omab translatsiooni eri aspektide reguleerimises olulist rolli.

Töö eesmärgiks oli uurida WBSCR22 ja tema mutantsete valkude ning TRMT112 valguga vahelist interaktsiooni imetajarakus. Töö hüpoteesiks oli, et WBSCR22 ja TRMT112 valgud on rakus stabiilses kompleksis ning TRMT112 ülesandeks on kontrollida WBSCR22 valguga aktiivsust rakus. Töö hüpotees tulenes varasemalt pärmis WBSCR22 ja TRMT112 homologidega (vastavalt Bud23 ja Trm112) tehtud uuringutest ja meie laboris saadud proteoomika katsete (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*, SILAC) tulemustest.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Plasmiidid

WBSCR22 valgu uurimiseks kasutati kahte tüüpi ekspresiooniplasmiide – ühed põhinevad pCG vektoril, teised pEGFP vektoril. Plasmiidilt pQM-NTag-WB22 (Õunap *et al.* 2013) ekspresseeritakse WBSCR22 valgu N-terminaalses osas on BPV1 E2 valgust pärinevat epitoopi E2Tag (aminohappeline järjestus on SSTSSDFRDR). See võimaldab WBSCR22 valgu detekteerimist kasutades E2 epitoop-*tag*-i vastast antikeha 5E11 (Kurg *et al.* 1999). EGFP vektoril põhinevad plasmiidid kodeerivad uuritava järjestuse N-terminuses EGFP-d (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) ehk võimendatud roheliselt fluorestseeruvat valku.

Töös kasutati lisaks pQM-NTag-WB22-le veel Kadri Õunapi poolt konstrueeritud pQM-E2Tag-WBSCR22-K112T115AA, pQM-E2Tag-WBSCR22-D117A, pEGFP-WBSCR22, pEGFP-WBSCR22-K112T115AA, pEGFP-WBSCR22-D117A ning Lilian Leetsi poolt konstrueeritud pEGFP-WBSCR22-38CTD konstrukte. Lisaks kasutati kontrollidena plasmide pEGFP-C1 (*Clontech*) ja pQM-mCherry (konstrueeritud Reet Kure poolt).

TRMT112 valgu uurimiseks kasutati Kadri Õunapi poolt konstrueeritud ekspresiooniplasmiidi pQM-TRMT112-mCherry, millelt ekspresseeritakse punaselt fluorestseeruvat liitvalku TRMT112-mCherry.

2.2.2. Eukariootsed rakud

Antud töös on kasutatud inimese emakakaelavähi rakuliini HeLa, mida kasvatati IMDM (Iscove-i muudetud Dulbecco sööde, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Naxo OÜ*) söötmes, kuhu oli eelnevalt lisatud L-glutamiin ja 25 mM HEPES. IMDM söötmele lisati 10% veise loote seerumit (*fetal calf serum, FCS*) ning antibiootikumid penitsilliin (lõppkontsentratsioon 100 U/ml) ja streptomütsiin (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Rakke inkubeeriti inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas (*Sanyo CO₂ incubator*).

2.2.3. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni teel

HeLa rakkude transfektsiooniks kasutati elektroporatsiooni meetodit. Umbes 80% konfluentseid HeLa plaate pesti PBS-ga (fostaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate buffered saline*) ning seejärel eemaldati rakud plaadilt trüpsiiniga. Rakususpensioon kanti tsentrifuugitopsi, kuhu oli eelnevalt lisatud trüpsiiniga võrdses koguses söödet. Rakke tsentrifuugiti 1000 rpm 5 minutit 20°C juures (*Eppendorf Centrifuge 5810R*) ja seejärel resuspendeeriti söötmes, mis sisaldas 5 mM BesNa puhvrit (pH 7,5). Elektroporatsioonil kasutatavatesse küvettidesse pipeteeriti 50 µg *salmon sperm carrier* DNA-d, sobivas koguses plasmiidset DNA-d ning 250 µl rakususpensiooni. Transfekterimiseks kasutati elektroporaatorit *Bio-Rad GenePulser Xcell*, mis oli seadistatud järgnevatele tingimustele: pinge 220 V, mahtuvus 975 µF ja küvett 4 mm. Pärast poratsiooni inkubeeriti elektroporatsiooniküvettides olevaid rakke 15 minutit inkubaatoris (37°C, 5% CO₂ keskkond). Seejärel kanti rakud tsentrifuugituubidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 3 ml söödet, ning tsentrifuugiti 1000 rpm 5 minutit 20°C juures. Supernatant aspireeriti, rakud suspendeeriti sobivas koguses söötmes ning kanti 60 mm või 6-well koekultuuri plaatidele. HeLa rakke kasvatati pärast transfektsiooni 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

2.2.4. Konfokaalmikroskoopia

Rakkude uurimiseks konfokaalmikroskoobiga tehti HeLa rakkudele transfektsioon elektroporatsiooni teel vastavalt eelkirjeldatud protokollile. Pärast viimast tsentrifuugimist võeti rakud üles 1 ml IMDM söötmes, millest 20 µl rakususpensiooni külvati 8-kambrilisele alusklaasile *Lab-Tek™ Chambered Coverglass w/cvr 8 well (Thermo Scientific)* ning ülejäänud rakud kanti 60 mm koekultuuri plaatidele. Rakke kasvatati inkubaatoris 37°C 5% CO₂ keskkonnas. 24 ja 48 tunni pärast analüüsiti uuritavate valkude lokaliseerimiseks rakkudes, kasutades konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM710 (*ZEISS*) ja 63x vesimikroskoopiaobjektiiviga.

2.2.5. Proteaasi inhibiitori MG-132 lisamine eukarüootsetele rakkudele

24 tundi pärast HeLa rakkude transfektsiooni elektroporatsiooni teel (transfekteriti 500 ng DNA, pEGFP-C1 plasmidi puhul 250 ng), pipeteeriti rakkude peal olevasse söötmesse proteaasi inhibiitorit MG-132 nii, et ühel plaadil oli MG-132 lõppkontsentratsiooniks 2 µM ja

teisel plaadil 5µM. Järgnevalt asetati plaadid inkubaatorisse 37°C 5% CO₂ keskkonda 16 tunniks, pärast mida analüüsiti rakke kasutades läbivoolutsütomeetria analüsaatorit.

2.2.6. Läbivoolutsütomeetria

Rakkude kogumiseks pesti plaate PBS-ga ning koguti rakud PBS/3 mM EDTA-ga. Seejärel kanti rakud 1,5 ml tsentrifuugitopsidesse ja tsentrifuugiti 4000 rpm 5 minutit lauatsentrifuugis Sigma 1-14 (*Sigma*). Rakkude sade suspendeeriti PBS-s ning tsentrifuugiti uuesti lauatsentrifuugis samadel tingimustel. Rakusade suspendeeriti PBS-s ning pipeteeriti läbivoolutsütomeetria analüüsituubi. Rakkude analüüsimiseks kasutati läbivoolutsütomeetrit (FACS – *fluorescence activated cell sorter*) BD LSRII (*BD Biosciences*) ning tarkvara FACSDiva (*BD Biosciences*).

2.2.7. Rakutsükli analüüs kasutades läbivoolutsütomeetria

Eelneval päeval transfekteeriti elektroporatsiooni teel rakkudesse 500 ng uuritavat DNA-d (pEGFP-C1 plasmidi puhul 250 ng) ning 24 tunni pärast koguti rakud kokku pestes plaate PBS-ga ning seejärel lisati plaatidele PBS/3mM EDTA lahust, millega rakud plaadilt lahti tulid. Rakususpensioon viidi puhtasse 1,5 ml tsentrifuugi tuubi ning tsentrifuugiti 5 minutit 300 *xg* (*Sigma 4K15*). Rakud pesti taaskord PBS-ga ning tsentrifuugiti samadel tingimustel. Seejärel suspendeeriti rakud 100 µl PBS-s ning rakkude fikseerimiseks lisati suspensioonile aeglastel vorteksi pööretel tilkhaaval 900 µl külma 80% etanooli. Rakke inkubeeriti 30 minutit jääl ning tsentrifuugiti 5 minutit 300 *xg*. Rakud pesti PBS-ga ning tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Rakusade võeti üles 500 µl PBS lahuses, millele oli lisatud RNAas A (lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml) ja propiidiumjodiid (PI, lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml), ning rakke inkubeeriti 40 minuti jooksul pimedas ja toatemperatuuril. HeLa rakkude analüüsiks kasutati läbivoolutsütomeetrit BD LSRII ning tarkvara FACSDiva. Propiidiumjodiidile vastab läbivoolutsütomeetria analüsaatoril 7-amino-aktinomütsiin D (7AAD).

2.2.8. Western blot

Rakkude kogumiseks pesti plaate PBS-ga ning suspendeeriti rakud lahti PBS/3 mM EDTA-ga. Seejärel koguti rakud 1,5 ml tsentrifuugitopsidesse ja tsentrifuugiti 4000 rpm 5 minutit lauatsentrifuugis Sigma 1-14. Rakusade suspendeeriti PBS-s, seejärel kanti 10 µl rakususpensiooni uude 1,5 ml tsentrifuugituubi ning mõõdeti rakkude arv lahuses, lisades 10 µl 0,4% *Trypan Blue stain* värvi (*Life Technologies*) ning rakkude loendamiseks kasutati *Invitrogen CountessTM automated cell counter* rakulugejat. Ülejäänud rakkusadet tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Seejärel suspendeeriti rakud PBS-s ja lüüsi lisades PBS-ga võrdses mahus 2x Laemmli puhvrit (4% SDS; 20% glütserool; 120 mM Tris pH 6,8; 0,01% broomfenoolsinine, 100 mM DTT) nii, et rakke oleks 15000 rakku/µl. Valgüsaatide denatureerimiseks kuumutati proove 10 minutit 100°C juures.

Valgud lahutati SDS – polüakrüülamiid geelelektroforeesil (*SDS-Page*) kasutades 12% polüakrüülamiidgeeli ja 1xSDS puhvrit (125 mM Tris; 960 mM glütsiin; 0,5% SDS) ning kanti üle PVDF (polüvinülideendifloriid, *polyvinylidene difluoride*) membraanile (*Immobilon-P Millipore 0,45µm*) *semy-dry blotting* meetodil 25 minutit 15 V pingel juures (*Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*). Pärast ülekannet asetati membraan üleöö 4°C juurde blokeerimislahusesse (5% lõssipulber; 1x TBS; 0,05% Tween 20). Järgneval päeval inkubeeriti membraani 1 tund 5E11 antikeha (*Icosagen*; lahjendus 1:10000) sisaldavas lahuses (1% lõssipulber; 1xTBS; 0,05% Tween 20) loksutil ning pesti 3 korda 10 minutit Westerni pesulahusega (100 mM Tris pH 7,5; 170 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Seejärel lisati sekundaarne antikeha *goat anti-mouse HRP* (*LabAs AS*; lahjendus 1:10000) ning pesti 3 korda 10 minutit Westerni pesulahusega. Antikehade signaal detekteeriti ECLTM kit-ga (*GE Healthcare*), kasutades tootjapoolset protokollit ning ilmutati röntgenfilmile.

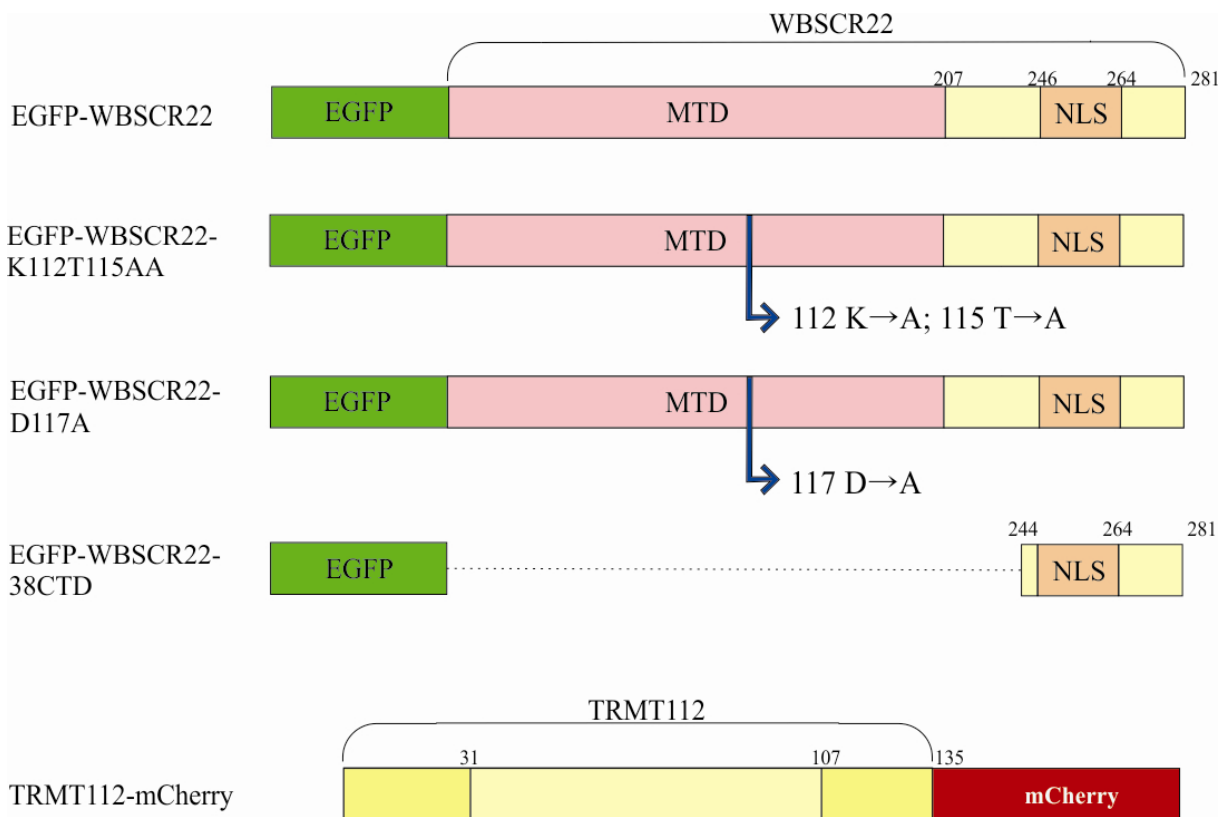
2.3. Tulemused

2.3.1. WBSCR22 valk muudab TRMT112 lokalisatsiooni rakus

Varasemalt on näidatud, et enamus rakus olevast WBSCR22 valgust lokaliseerub difuusselt raku tuumas (Nakazawa *et al.* 2010; Õunap *et al.* 2013). TRMT112 valgu paiknemise kohta imetajarakus andmed puuduvad, kuid pagaripärmis on näidatud, et 51% kogu rakus olevast Trm112 valgust paikneb tsütoplasmas (Towns and Begley 2012). Töö eesmärgiks oli uurida WBSCR22 valgu ekspressiooni ja lokalisatsiooni koos TRMT112 valguga. Selleks konstrueeriti erinevad plasmiidid nii, et WBSCR22 valgu suhtes N-terminaalselt asuks EGFP valku kodeeriv ala ning TRMT112 valku sisaldavasse plasmidi viidi C-terminaalselt sisse mCherry valku kodeeriv järjestus (konstruktide skeemid joonisel 3). EGFP on roheliselt fluorestseeruv valk, mida ergastab lainepikkus 489 nm ja emissioonispektri tipuks on 511 nm (*Fluorophores*). mCherry on seevastu punaselt fluorestseeruv valk, mis ergastub lainepikkusel 587 nm ja kiirgab 610 nm (*Fluorophores*). Eeldusel, et liitvalkude fluorestsentsispekter on ligikaudu sama, kui fluorestseeruvatel valkudel üksi, sai uurida liitvalkude EGFP-WBSCR22 ja TRMT112-mCherry ekspressiooni ja lokalisatsiooni elusrakus, kasutades konfokaalmikroskoopiat.

WBSCR22 ja TRMT112 valkude lokalisatsiooni uurimiseks kasutati HeLa rakke, milledesse transfekteeriti elektroporatsiooni teel 1 µg uuritavaid ekspressiooniplasmiide. pEGFP-C1 plasmiid transfekteeriti 500 ng, sest varasemalt on tähendatud EGFP valgu väga kõrget ekspressioonitaset ka väikeste DNA koguste korral. 24 tunni pärast elektroporatsiooni uuriti rakke konfokaalmikroskoobis, tulemused on välja toodud joonisel 4.

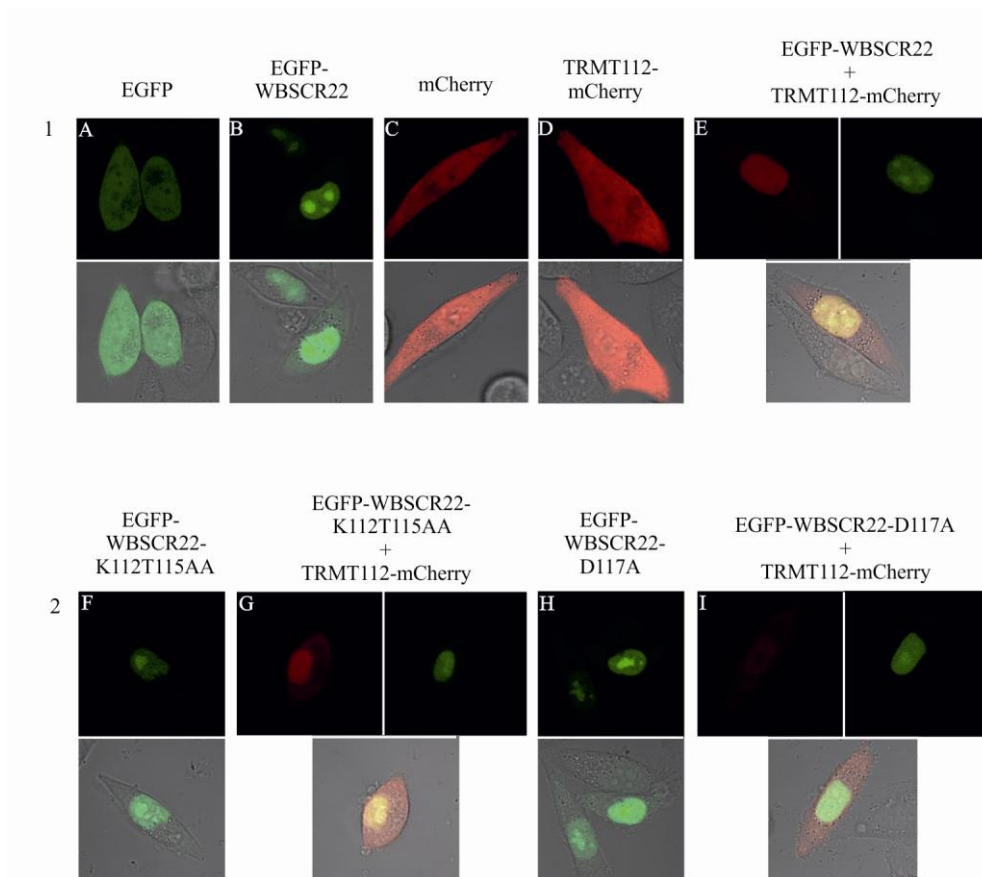
Joonis 4 näitab, et EGFP valk lokaliseerus üle terve raku, samas kui EGFP-WBSCR22 kogunes peamiselt rakutuuma ning osades rakkudes tähendati ka akumulatsiooni tuumakesse. mCherry valk üksinda lokaliseerus üle kogu raku nagu ka TRMT112-mCherry liitvalk. Ekspresseerides koos EGFP-WBSCR22 ja TRMT112-mCherry valke, relokaliseerus TRMT112 valk raku tuuma. Sellest võib järeldada, et need kaks valku interakteeruvad omavahel ja WBSCR22-TRMT112 valkude kompleks paikneb raku tuumas, kusjuures WBSCR22 relokaliseerib TRMT112 valgu raku tuuma.



Joonis 3. Töös kasutatud valkude skemaatilised joonised. Joonisel on välja toodud EGFP-WBSR22, EGFP-WBSR22-K112T115AA, EGFP-WBSR22-D117A, EGFP-WBSR22-38CTD ja TRMT112-mCherry ekspressiooniskeemid. MTD – metüültransferaase domeen (*methyltransferase domain*). CTD – karboksü-terminaalne domeen (*C-terminal domain*). NLS – tuuma lokaliseerimis signaal (*nuclear localisation signal*). EGFP – *enhanced green fluorescent protein*-i kodeeriv ala, mis lisati WBSR22 valku kodeeriva ala N-terminaalsesse osasse. Noolega on tähistatud EGFP-WBSR22-K112T115AA ja EGFP-WBSR22-D117A mutantidel muudetud aminohapped, vastavalt 112. positsioonis olev Lys (K) ja 115. positsioonis olev Thr (T) muudetudalaniinideks (Ala, A) ning 117. positsioonis olev Asp (D) samuti Ala-ks. TRMT112 valku kodeeriva ala C-terminaalsesse otsa lisati mCherry valku kodeeriv ala.

WBSR22 ja TRMT112 vahelise interaktsiooni uurimiseks loodi kaks mutanti Sardana and Johnson (2012) poolt kirjeldatud Bud23RSD mutandi alusel, kus positsioonides 107, 110 ja 112 asuvad aminohapped olid muteeritud (vastavalt Arg, Ser ja Asp olid muudetud aminohapeteks Leu, Ala, Glu). Nimetatud aminohapetele vastavad inimese WBSR22 valgus positsioonides 112, 115 ja 117 asuvad Lys, Thr ja Asp (Käsper 2010). Käesolevas töös kasutati kahte erinevat mutantset WBSR22 valku: WBSR22-K112T115AA, kus 112. positsioonis olev Lys (K) ja 115. positsioonis olev Thr (T) olid muudetudalaniinideks (Ala,

A), ning WBSR22-D117A, kus 117. positsioonis olev Asp (D) oli muudetud samuti Ala-ks. Inimese *WBSR22* valgu 117. positsioonis olev Asp on evolutsiooniliselt väga tugevalt konserveerunud, samas kui 112. ja 115. positsioonides olevad Lys ja Thr on veidi vähem konserveerunud.



Joonis 4. EGFP-WBSR22 ja WBSR22 valgu mutantide (EGFP-WBSR22-K112T115AA ja EGFP-WBSR22-D117A) ekspressioon üksi ning koos TRMT112-mCherry liitvalguga HeLa rakuliinis. EGFP on roheliselt fluorestseeriv valg, mCherry punaselt fluorestseeriv valg. Paneelil 1 on välja toodud EGFP (A), EGFP-WBSR22 (B), mCherry (C) ja TRMT112-mCherry (D) valkude ekspressioonid üksi ning EGFP-WBSR22 lokaliseatsioon koos TRMT112-mCherry liitvalguga (E). Paneelil 2 on esitatud EGFP-WBSR22-K112T115AA (F) ja EGFP-WBSR22-D117A (H) ekspressioon üksi ja koos TRMT112-mCherry valguga (vastavalt G ja I). Analüüsi tegemiseks kasutati konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM710.

Jooniselt 4 on näha, et EGFP-WBSR22-K112T115AA ja EGFP-WBSR22-D117A liitvalgud lokaliseerusid mõlemad valdavalt raku tuuma. Ekspresseerides mutantsete

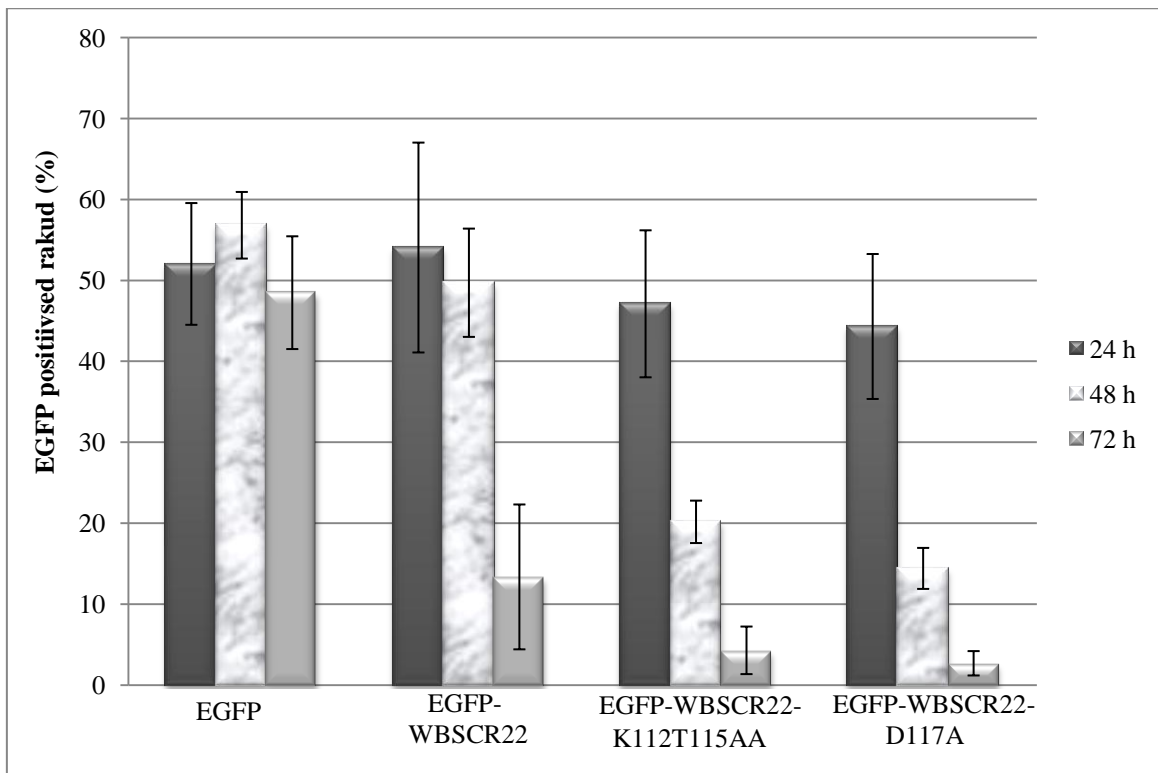
WBSCR22 valkudega koos TRMT112-mCherry konstrukti, relokaliseerus ikkagi enamuse tsütoplasmas paiknevast TRMT112 valgust ümber raku tuuma. Seega on isegi mutantsetel WBSCR22 valkudel olemas võime interakteeruda TRMT112 valguga.

2.3.2. *Wild-type* WBSCR22 valgu stabiilsus raku erinev mutantsetest WBSCR22 valkudest

Konfokaalmikroskoobiga saadud tulemusi analüüsidest pandi tähele, et WBSCR22 valgu mutantide ekspressioon oli nõrgem kui EGFP-WBSCR22 valgul. Uurimaks edasi nende valkude ekspressiooni, transfekteriti HeLa rakkudesse elektroporatsiooni teel 500 ng DNA-d (pEGFP-C1 plasmidi puhul 250 ng) ning 24, 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni analüüsiti rakkudes valgu EGFP-liitvalkude ekspressioonitaset, kasutades läbivoolutsütomeetria. Negatiivse kontrollina kasutati pEGFP-C1 plasmidiga transfekteritud HeLa rakke.

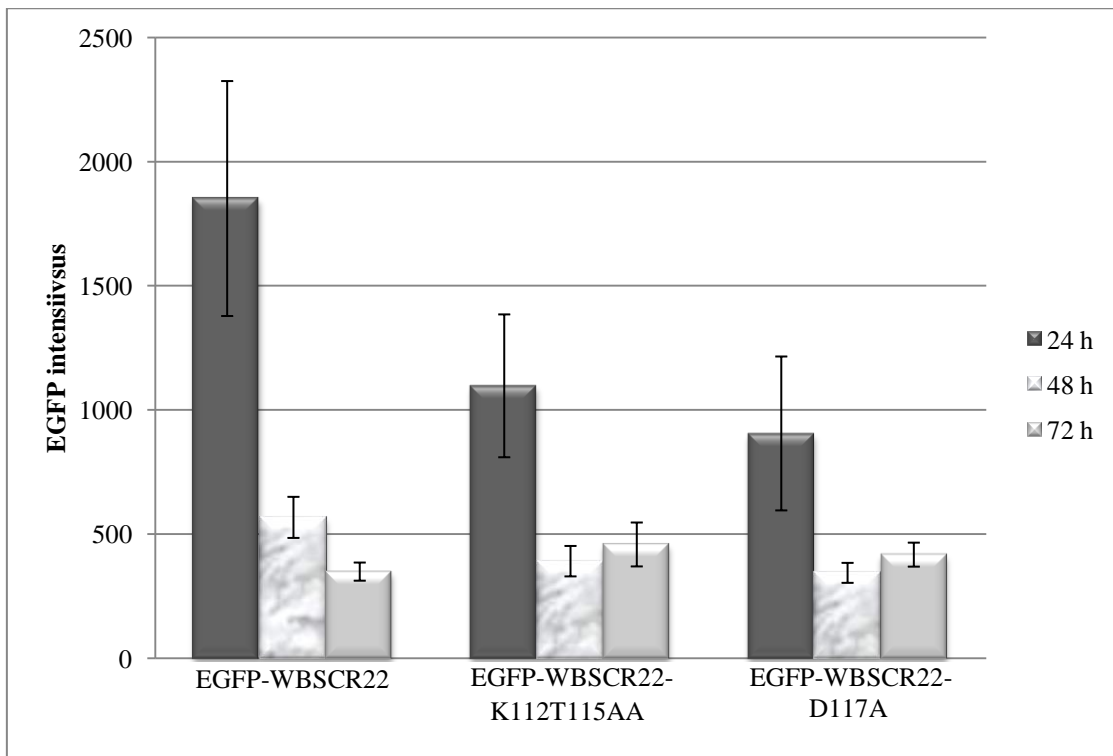
Jooniselt 5 on näha, et EGFP-WBSCR22 ja WBSCR22 mutantsete valkude ekspressioonimaksimum oli 24 tundi pärast transfektsiooni. Mutantseid EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valke ekspresseerivate rakkude hulk langes järsult – 48 tunni möödudes oli mutantseid WBSCR22 valke ekspresseerivate rakkude hulk langenud üle kahe korra ning 72 tunni möödudes oli neid rakke kõigest ligikaudu 10% algsest rakkude arvust. Seevastu EGFP-WBSCR22 liitvalgu ekspressioon 48 tundi pärast transfektsiooni näitas vaid kerget langustrendi, kuid 72 tundi pärast transfektsiooni on EGFP positiivsete rakkude hulk vähenenud ligi kolm korda. Seega vähenes mutantseid WBSCR22 valke ekspresseerivate EGFP positiivsete rakkude hulk ajas kiiremini kui EGFP-WBSCR22 valku ekspresseerivate rakkude hulk, mis näitab nende valkude ekspressioonitasemete erinevust.

Uurimaks, kuidas muutub EGFP intensiivsus nii *wild-type* WBSCR22 kui mutantsetel valkudel ajas, transfekteriti HeLa rakkudesse 500 ng uuritavaid plasmide. Negatiivse kontrollina kasutati pEGFP-C1 plasmidi, mida transfekteriti 250 ng. 24, 48 ja 72 tunni pärast mõõdeti läbivoolutsütomeetria analüsaatoriga rakkude EGFP intensiivsust. Katsete tulemused on toodud joonisel 6.



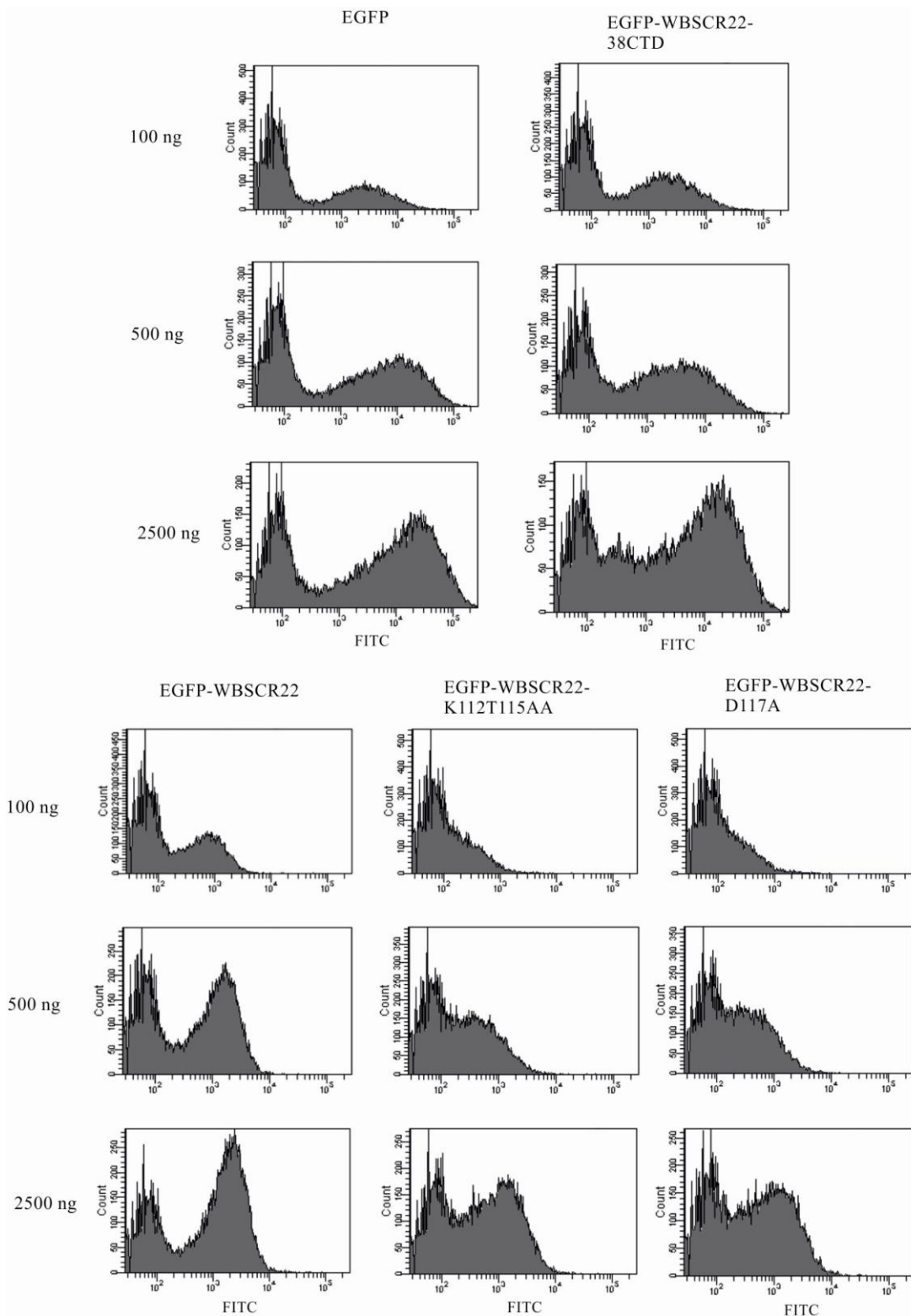
Joonis 5. EGFP-WBSCR22 ja WBSCR22 mutantide (EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A) positiivsete rakkude hulga muutus ajas (24-72 h). EGFP on võetud negatiivseks kontrolliks ning graafikul on toodud läbivoolutsütomeetriga sooritatud analüüsist saadud EGFP positiivsete rakkude keskmised protsendid võrreldes valitud populatsiooniga. Veapiiridena on näidatud arvutatud standardhälve.

EGFP-WBSCR22 valgule toimus 24 ja 48 tunni ajapunktide vahel ligikaudu kolmekordne EGFP intensiivsuse langus, mis 48 ja 72 tunni ajapunktide vahel langes veelgi (joonis 6). Mutantsete EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude EGFP intensiivsused langesid ka 24 ja 48 tundi pärast transfektsiooni, olles madalamad kui EGFP-WBSCR22 valgul, kuid 72 tunni ajapunkti saabudes toimus mõlematel mutantidel EGFP intensiivsuse väike tõus, mida ei saa pidada aga statistiliselt oluliseks. Saadud tulemused annavad aluse järeledada, et mutante ekspresseeritakse rakus vähem kui EGFP-WBSCR22 valku. Samas ei ole teatud kogusest mutantsete WBSCR22 valkude rakus hoidmine rakule kahjulik ning neid ei lagundata enam nii aktiivselt kui EGFP-WBSCR22 valku.



Joonis 6. EGFP-WBSCR22 ja WBSCR22 mutantide (EGFP-WBSCR22-K112T115AA, EGFP-WBSCR22-D117A) EGFP intensiivsuste muutus ajas (24-72 tundi pärast transfektsiooni). Veapiiridena on esitatud arvatud standardhälved.

Uurimaks, kas ja kuidas eelnevate katsete tulemused on seotud transfektsiooni teel sisse viidava DNA hulgaga, viidi transfektsiooni teel HeLa rakkudesse 100, 500 ja 2500 ng uuritavaid plasmide. Negatiivse kontrollina kasutati EGFP ja EGFP-WBSCR22-38CTD valke kodeerivaid plasmide. EGFP-WBSCR22-38CTD on mutantne liitvalk, mille puhul on WBSCR22 valgu 38 karboksü-terminaalset aminohapet kodeeriv ala on kloonitud EGFP valku kodeeriva ala järele (skeem joonisel 3). Nimetatud valk lokaliseerub raku tuumas, akumulereerudes raku tuumakestesse, kuid ei relokaliseeri TRMT112 valku raku tuuma (esitamata andmed). 24 tunni möödudes analüüsiti rakke läbivoolutsütomeetria analüsaatoriga ning katse tulemused on välja toodud joonisel 7.

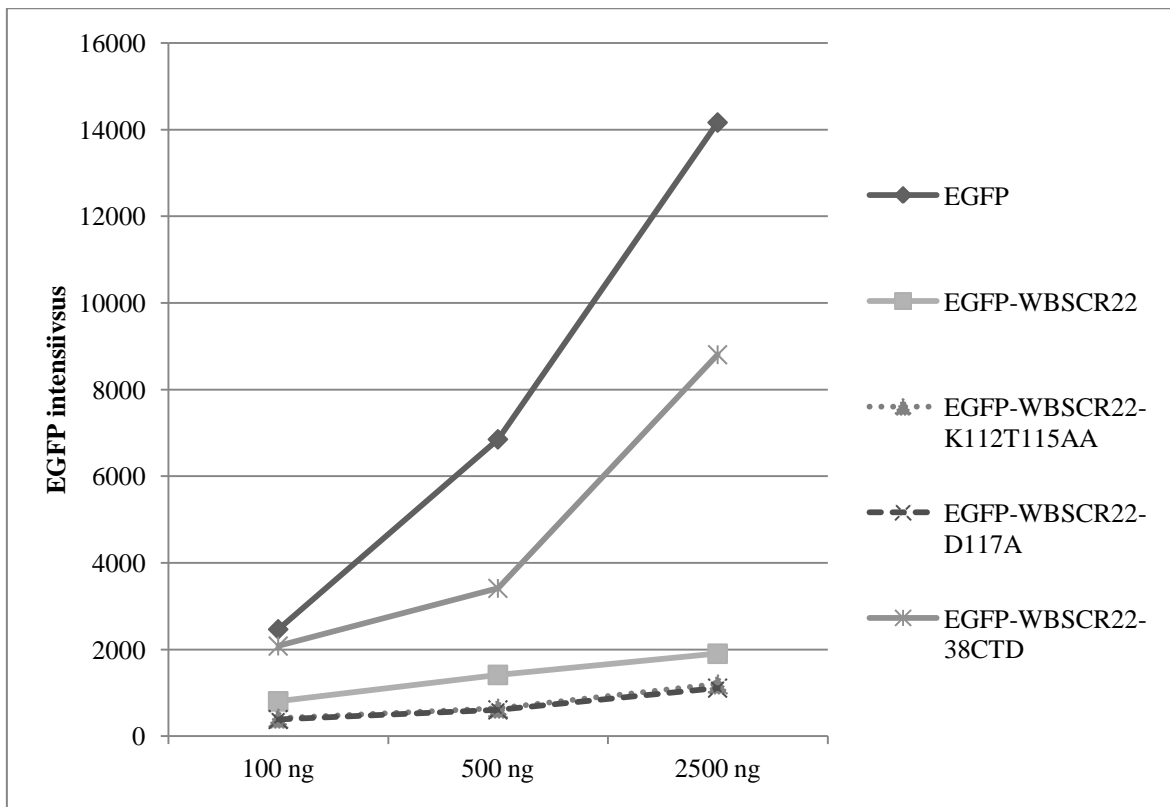


Joonis 7. Keskmine EGFP intensiivsus raku kohta sõltub rakkudesse transfekteritava DNA hulgast (100, 500, 2500 ng). Esitatud on EGFP, EGFP-WBSCR22, EGFP-WBSCR22-K112T115AA, EGFP-WBSCR22-D117A ja EGFP-WBSCR22-38CTD konstruktide graafikud, kus y teljel on rakkude arv (*count*) ja x teljel rakkude EGFP (joonisel tähistatud kui FITC ehk fluoresteiin isotiotsüanaat, *fluorescein isothiocyanate*) intensiivsus logaritmilises skaalas.

EGFP-WBSCR22 valgu puhul oli näha, et juba 100 ng transfekteeritud DNA juures oli teatud populatsioon rakke, mis ekspresseeris transfekteeritud konstrukti pealt kodeeritavaid valke suurema intensiivsusega kui EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A (joonisel on kaks piiki, joonis 7). EGFP ja EGFP-WBSCR22-38CTD valke ekspresseerivate rakkudel eristus samuti kaks EGFP intensiivsusega rakupopulatsiooni juba 100 ng DNA koguse juures. EGFP, EGFP-WBSCR22 ja EGFP-WBSCR22-38CTD valke kodeerivate plasmiidide hulga suurenedes parempoolne EGFP intensiivsuse piik aina kasvas, mis tähendab, et üha suurem kogus rakke ekspresseeris EGFP-tag-ga valku väga intensiivselt. Mutantsete EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude puhul tekkisid kaks üksteisest selgelt eristatavat intensiivsuspiiki alles 2500 ng plasmidi koguse juures. Lisaks oli EGFP-WBSCR22 ja mutantsete WBSCR22 valkude intensiivsus ligikaudu 10 korda madalam kui EGFP ja EGFP-WBSCR22-38CTD valkudel.

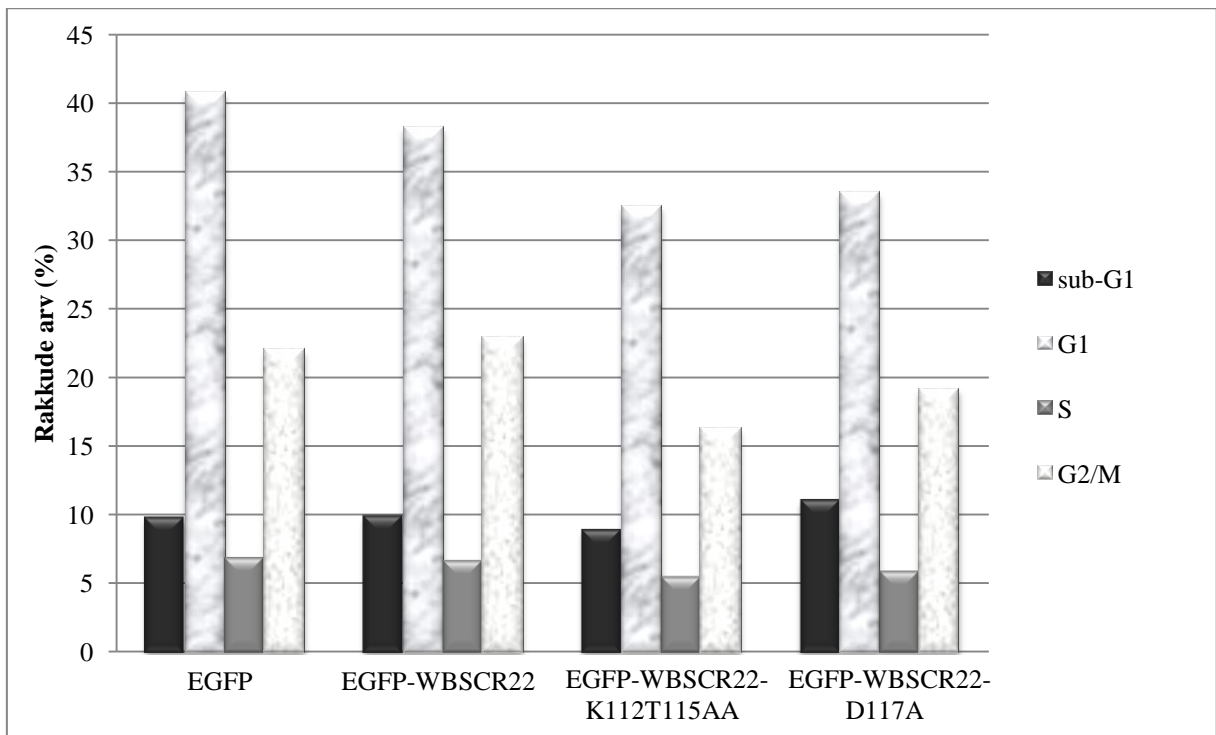
Uurides sama katse raames rakkude EGFP intensiivsusi, oli näha, et EGFP-WBSCR22 valk omas kõikidel DNA hulkadel kõrgemat EGFP positiivsete rakkude intensiivsust, kui seda oli mutantsetel WBSCR22 valkudel ning nad kõik järgisid sama tõusutrendi (joonis 8). EGFP ja EGFP-WBSCR22-38CTD valkude intensiivsused olid kõikidel DNA hulkadel kõrgemad kui EGFP-WBSCR22 valgul. Sellest võib järeldada, et kõikide uuritud konstruktide puhul on olemas ekspresseeritava valgu hulk DNA kogusest – kõrgematel ekspressiooniplasmidi hulkadel ekspresseeritakse selle pealt ka rohkem valku. Sellegipoolest oli mutantsete EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude ekspressioonitase kõikidel plasmidi kogustel madalam kui EGFP-WBSCR22 valgul. Seega mutantseid WBSCR22 valke ekspresseeritakse alati väiksemal hulgal ning eelnevate katsete tulemused ei olenenud transfekteeritava DNA kogusest.

Mutantsed valgud ei pruugi tekitada rakus mingeid fenotüübilisi muutusi, kuid samas võivad tekkida ka rakutsükli defektid, mille tõttu suunatakse rakud kiiresti apoptoosi. Uurimaks, kas mutantsete EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude madalam ekspressioonitase seotud uuritavates rakkudes tekkivate rakutsükli defektidega, transfekteeriti HeLa rakkudesse elektroporatsiooni teel 500 ng uuritavaid plasmide. Negatiivse kontrollina kasutati EGFP valku. 24 tundi pärast transfektsiooni fikseeriti uuritavad rakud ja analüüsiti, kasutades läbivoolutsütomeetria analüsaatorit. Katse tulemused on kujutatud joonisel 9.



Joonis 8. EGFP intensiivsuse sõltuvus transfekteeeritud DNA hulgast (100-2500 ng). Kujutatud on EGFP, EGFP-WBSCR22, EGFP-WBSCR22-K112T115AA, EGFP-WBSCR22-D117A ja EGFP-WBSCR22-38CTD valgud. Mutantsete EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude EGFP positiivsete rakkude intensiivsused erinevatel DNA kogustel on kujutatud punktiirjoontega.

Joonis 9 näitab, et sub-G1 ja S faasides oli EGFP, EGFP-WBSCR22, EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valke ekspresseerivad rakke ligikaudu võrdsel hulgal. Ka polüploidsete rakkude faasis ei esinenud eri konstrukte ekspresseerivate rakkude vahel rakkude hulga erinevusi (esitamata andmed). G1 ja G2/M faasides oli mutantseid WBSCR22 valke ekspresseerivate elusrakkude arv veidi vähenenud, mis viitab sellele, et mutantsed WBSCR22 rakud võivad pärssida rakkude elutegevust. Samas pole EGFP-WBSCR22 ning WBSCR22 mutantseid valke ekspresseerivate rakkude rakutsükli erinevused piisavalt suured, et saaks järeldada rakutsükli bloki teket. Pigem on tegemist mutantide ekspressioonist tuleneva mõnevõrra suurenenud rakkude suremusega.



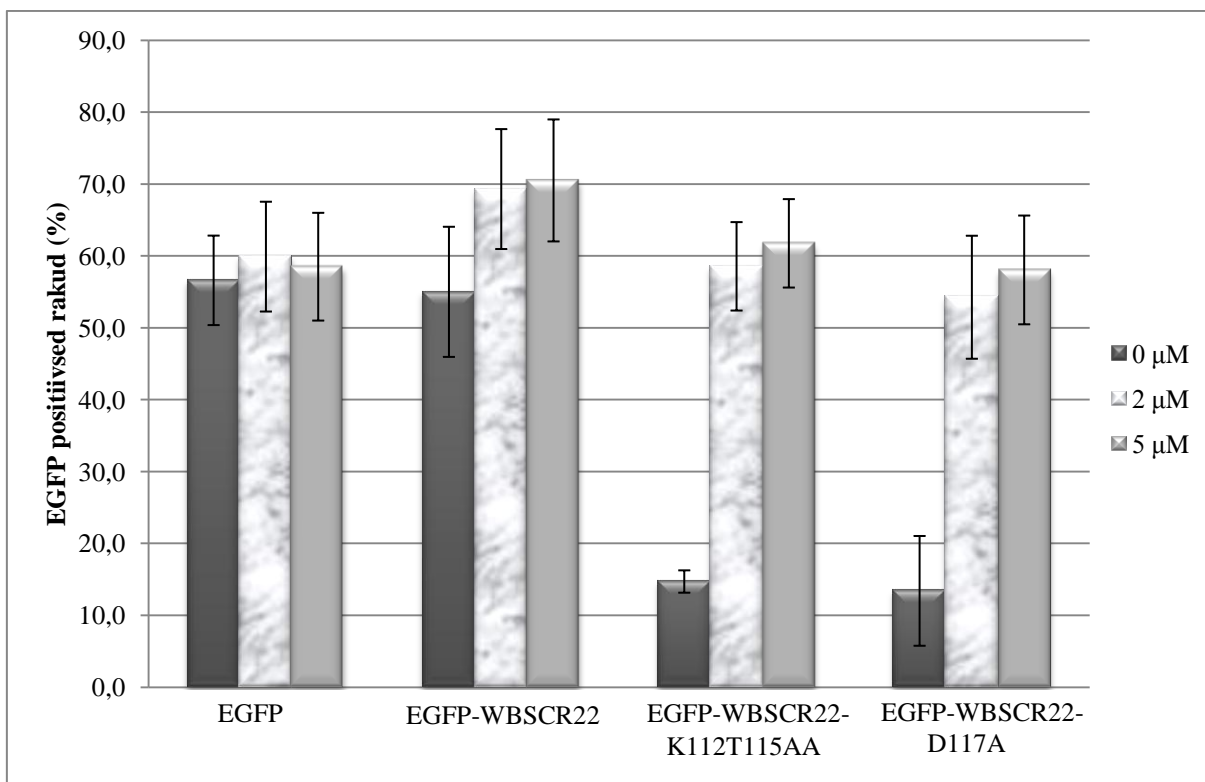
Joonis 9. EGFP-WBSCR22 ja mutantsete WBSCR22 valkude (WBSCR22-K112T115AA ja WBSCR22-D117A) rakutsükli analüüs. Välja on toodud sub-G1, G1, S ja G2/M faasid. Polüploidsete rakkude faas välja jäetud, sest selles polnud eri konstrukte ekspresseerivate rakkude vahel erinevusi (esitamata andmed).

2.3.3. WBSCR22 valgu hulk rakus on kontrollitud 26S proteasoomi raja poolt

Enamus rakusisestest valkudest lagundatakse ubikvitiinist sõltuva proteasoomi raja kaudu (Rock *et al.* 1994). Lagundamisele määratud valgule seotakse kovalentselt külge mitu ubikvitiini molekuli ning ubikvitinüleeritud valk lagundatakse 26S proteasoomi poolt (Rock *et al.* 1994; Glickman and Ciechanover 2002; Shabek and Ciechanover 2010). Uurimaks, kas WBSCR22 ja tema mutantsete valkude hulk rakus on mõjutatud 26S proteasoomi poolt, lisati uuritavate plasmiididega transfekteeritud HeLa rakkudele 24 tundi pärast transfektsiooni proteasoomi inhibiitorit MG-132 kahes erinevas lõppkontsentratsioonis – 2 μM ja 5 μM . 16 tundi pärast inhibiitori lisamist analüüsiti rakke läbivoolutsütomeetria analüsaatoriga ja katse tulemused on välja toodud joonisel 10.

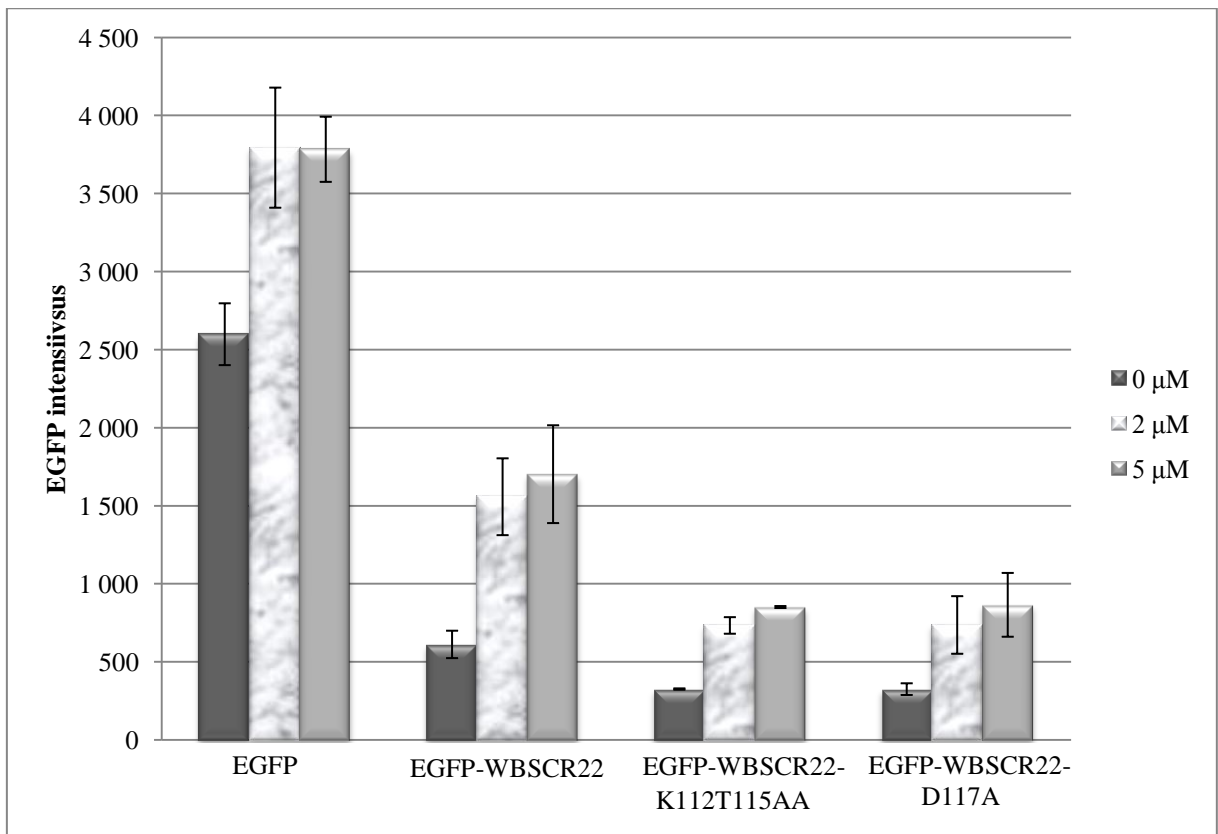
Joonisel 10 on näha, et nii EGFP-WBSCR22 valku kui ka mutantseid EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valke ekspresseerivate rakkude arv suurenes MG-132 kontsentratsiooni kasvamisega. Seevastu EGFP valgu hulk rakus ei olnud mõjutatud MG-

132 poolt. Mutantsetele WBSR22 valkudele proteasoomi inhibiitori lisamisel saavutas EGFP positiivsete rakkude arv peaaegu sama taseme, kui seda oli EGFP-WBSR22 valgu puhul.



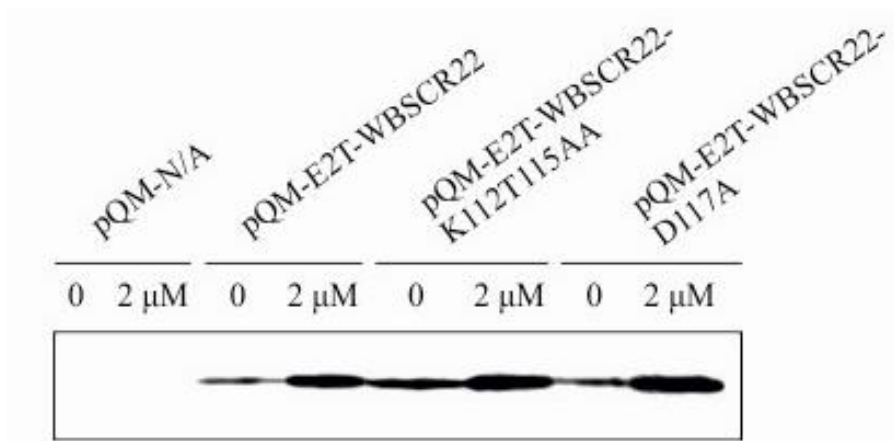
Joonis 10. EGFP positiivsete rakkude arvu sõltuvus proteasoomi inhibiitori MG-132 kontsentratsioonist (0, 2 ja 5 μM). Joonisel on näidatud EGFP, EGFP-WBSR22, EGFP-WBSR22-K112T115AA ja EGFP-WBSR22-D117A valgud 24+16 tundi pärast transfektsiooni. Veapiiridena on välja toodud arvutatud standardhälved.

Sama katse raames vaadeldi ka EGFP positiivsete rakkude EGFP intensiivsust. EGFP-WBSR22 ja tema mutantsete valkude intensiivsus rakus tõusis MG-132 lisamisel (joonis 11). EGFP puhul leidis aset ligikaudu 1,5 kordne EGFP intensiivsuse tõus, kuid nii EGFP-WBSR22 kui ka mutantsetel WBSR22 rakkudel oli umbes kolmekordne EGFP intensiivsuse tõus. Võrreldes EGFP-WBSR22 valguga olid EGFP intensiivsused mutantsete WBSR22 konstruktide puhul madalamad ka proteasoomi inhibiitori juuresolekul ning MG-132 kontsentratsiooni suurenemisel 2 μM-st 5 μM-ni EGFP intensiivsused uuritavates rakkudes oluliselt ei suurenud.



Joonis 11. EGFP positiivsete rakkude EGFP intensiivsuse sõltuvus proteasoomi inhibiitori MG-132 kontsentratsioonist (0-5 μM). Joonisel on toodud EGFP, EGFP-WBSCR22, EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valgud. Joonega on välja toodud arvatud standardhälved.

Siiani on töös kasutatud EGFP liitvalke. Kontrollimaks läbivoolutsütomeetria analüsaatoriga saadud tulemusi, transfekteriti elektroporatsiooni teel rakkudesse 500 μg E2Tag-ga märgistatud WBSCR22 ja tema mutantseid valke kodeerivad plasmide. 24 tundi pärast transfektsiooni lisati rakkudele proteaasi inhibiitorit MG-132 lõppkontsentratsiooniga 2 μM ning 16 tunni pärast koguti rakud ja mõõdeti nendes proovides olevate rakkude arv *Western blot*-i tegemiseks. Joonisel 12 toodud *Western blot*-i tulemused näitavad, et proteaasi inhibiitori MG-132 juuresolekul ekspresseeriti nii E2Tag-WBSCR22 kui ka mutantseid WBSCR22 valke suuremal hulgal. Nendest tulemustest võib järeldada, et *wild-type* WBSCR22 valk ja tema mutantsed valgud lagundatakse läbi 26S proteasoomi raja.



Joonis 12. E2Tag-WBSCR22 ja mutantsed WBSCR22 valgud MG-132 juuresolekul (0 ja 2 μM).

Joonisel on kujutatud pQM-N/A, pQM-E2Tag-WBSCR22, pQM-E2Tag-WBSCR22-K112T115AA ja pQM-E2Tag-WBSCR22-D117A vektorite poolt kodeeritud E2Tag-ga (joonisel tähistatud kui E2T) produktid. Primaarse antikehana kasutati E2Tag vastast antikeha 5E11, sekundaarse antikehana *goat anti-mouse HRP* antikeha.

2.4. Arutelu

Inimese WBSCR22 on vajalik 40S ribosoomi biosünteesiks (Õunap *et al.* 2013). Pärms leiduv Bud23 on WBSCR22 valgus homoloog ning on näidatud, et Bud23 ja Trm112 valgud interakteeruvad ribosoomide biosünteesil omavahel (Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012). Pärmi Trm112 valgul on tähendatud palju erinevaid interaktsioonipartnereid, milledest paljud, kuid mitte kõik on seotud 40S ja 60S ribosoomide biosünteesiga (Heurgué-Hamard *et al.* 2005; Purushothaman *et al.* 2005; Mazauric *et al.* 2006; Figaro *et al.* 2008; Collinet *et al.* 2011; Liger *et al.* 2011). Kuna ribosoomi uurimisel on üheks põhiliseks mudelorganismiks pagaripärm, on imetajarakkudes leiduva Trm112 homoloogi TRMT112 interaktsioonipartnerite kohta vähem andmeid. Kirjandusest on teada, et TRMT112 interaktsioon HemK2 α /N6AMT1 valguga katalüüsib eRF1 valgus N5-metülatsiooni (Heurgué-Hamard *et al.* 2006; Figaro *et al.* 2008) ning TRMT112 ja ALKBH8 valkude poolt moodustatud heterodimeer katalüüsib mõnede tRNA-de *wobble* paardumises asuva uridiinjäägi metüleerimist (Songe-Møller *et al.* 2010), mis sarnaneb Trm9-Trm112 valkude interaktsioonile pagaripärms, kuna ALKBH8 ja Trm9 on ortoloogid (*Genecards*). Pärmirakus on Trm112 valku vähem kui temaga interakteeruvaid valke, seega arvatakse, et Trm112 ei saa moodustada oma interaktsioonipartneritega stabiilseid komplekse (Ghaemmaghami *et al.* 2003). Seevastu hiire (*Mus musculus*) rakkudes arvatakse TRMT112 valke olevat ligikaudu 20 korda rohkem (Schwanhäusser *et al.* 2011) ning inimese osteosarkoomi rakuliinis U2OS umbes 10 korda rohkem kui WBSCR22 valku (Beck *et al.* 2011). Seega on tõenäoline, et imetajarakkudes käitub TRMT112 valk teistmoodi kui pagaripärms.

Immuunopretsipitatsiooni katsetest ja proteasoomika analüüsist saadud andmed on näidanud, et TRMT112 ja WBSCR22 valgud interakteeruvad omavahel (Õunap, avaldamata andmed). Selle töö üheks eesmärgiks oli uurida, kus leiab see interaktsioon aset imetajarakkudes. Konfokaalmikroskoobiga tehtud katsetest saadi kinnitust, et EGFP-WBSCR22 ja TRMT112-mCherry valgud interakteeruvad omavahel ja WBSCR22-TRMT112 valkude kompleks paikneb raku tuumas. Suur osa WBSCR22 valgust koguneb raku tuumakesse, samas kui TRMT112 paikneb difuusselt üle tuuma. EGFP-WBSCR22 koekspressioonil TRMT112-ga transpordib esimene TRMT112 valgus raku tuuma ning mõlema valgus üleekspressiooni tingimustes lokaliseerub väiksem osa WBSCR22 valgust rakkude tuumakestesse. Andmed puuduvad endogeense WBSCR22 valgus akumulatsioonile rakkude tuumakestesse, mis võib tähendada, et raku normaalses seisundis WBSCR22 sinna ei kogune. Antud tulemused ei ole ainult HeLa rakuliini spetsiifilised, sest ka COS-7 rakkudes, mis on SV-40 viirusega

transfekteeritud Aafrika rohepärdiku neerurakud, tähendati EGFP-WBSCR22 akumulatsioonituumakestesse (esitamata andmed). Siiani pole täpselt teada, miks osad valgud akumulatuuruvad tuumakesse, kuigi see võib omada füsioloogilist tähtsust. Valgu akumulatsioon rakkude tuumakestesse võib olla mittespetsiifiline ning see ei pruugi olla seotud selle valgu funktsiooniga, kuid see võib olla põhjustatud ka spetsiifilise tuumakese lokalisatsiooni/kinnihoidmise signaaljärjestuse (*nucleolus–nucleolar localization/retention signal*, NoRS) olemasolust, mis põhjustab valgu kogunemise tuumakestesse (Speil and Kubitscheck 2010; Musinova *et al.* 2011). Senimaani aga pole suudetud identifitseerida NoRS-dele omast konsensusjärjestust ning andmed sellise järjestuse olemasolust WBSCR22 valgul puuduvad. Sellegipoolest on arvatavasti EGFP-WBSCR22 liitvalgu üleekspressiooni korral toimuv akumulatsioon spetsiifiline, sest meie töörühmas tehtud katsed on näidanud üleekspressiooni tingimustes WBSCR22 valgu akumulatsiooni tuumakesse kasutades nii EGFP-tag-i kui ka E2Tag-i (Õunap, avaldamata andmed). Seega käitub ekspressioonivektori pealt kodeeritav WBSCR22 teisiti kui raku endogeenne valk, mis lokaliseerub üle rakutuuma, kuid ei akumuleru silmnähtavalt tuumakestesse. On võimalik, et üleekspressiooni tingimustes interakteerub WBSCR22 valk tuumakestes rRNA-ga, kuid sellise interaktsiooni tekke kohta andmed puuduvad.

Lisaks uuriti ka WBSCR22 valgu mutante EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A, mis olid konstrueeritud vastavalt Sardana and Johnson (2012) poolt tehtud pagaripärmi Bud23 mutandile Bud23RSD. Pagaripärmi Bud23 ja imetaja WBSCR22 omavad aminohapete tasemel 47% homoloogiat ning Trm112 ja TRMT112 valkude vahel on see homoloogia veelgi väiksem (UniProt; White *et al.* 2008). Sellegipoolest oli Bud23RSD mutandi konstrueerimisel võetud aluseks aminohapped, millede puhul arvati olevat tähtsus Trm112 valguga interakteerumisel (Sardana and Johnson 2012). Konfokaalmikroskoobiga tehtud katsed näitasid, et EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valgud suutsid transportida TRMT112 valku difuusselt raku tuuma ning tähendati mutantsete WBSCR22 valkude akumulatsiooni tuumakesse. Sardana and Johnsoni (2012) uuringus aga ei käsitletud elusates pärmirakkudes mutantsete Bud23 ja Trm112 valkude vahelist interaktsiooni, seega puuduvad ka andmed, kas ja kuidas interakteerusid omavahel Bud23RSD ja Trm112 valgud. Sellegipoolest võib järeldada, et imetajarakkudes on TRMT112 valguga interakteerumiseks vajalikud ka teised WBSCR22 aminohapped lisaks antud töös ära muudetud 112., 115. ja 117. positsioonis asuvatele aminohapetele, kuigi

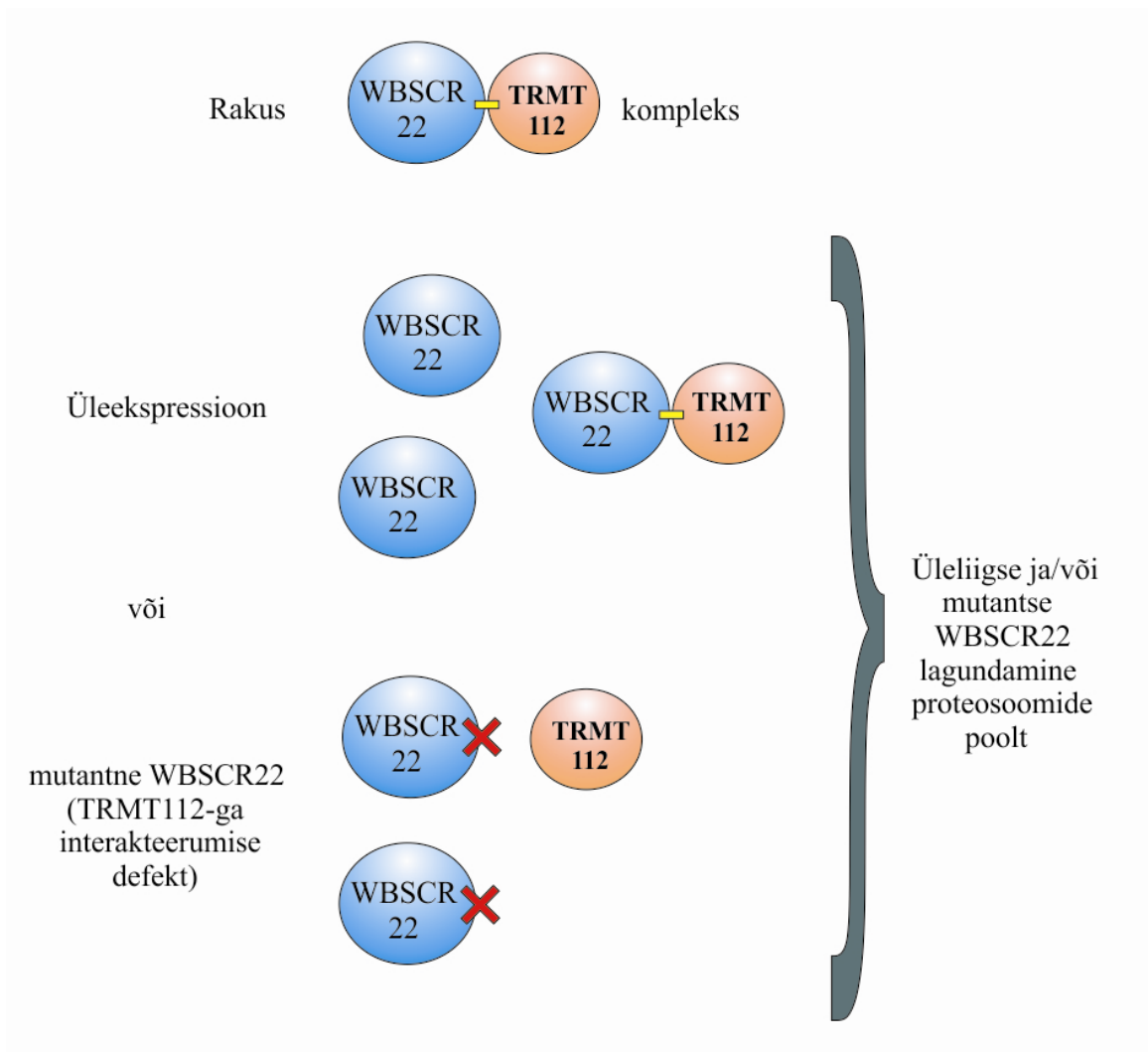
interaktsioon TRMT112 ja mutantsete WBSCR22 valkude vahel tundub olevat nõrgem kui TRMT112 ja *wild-type* WBSCR22 valgu vahel.

Konfokaalmikroskoobiga tehtud katsete tulemusel tähendati EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude nõrgemat ekspressioonitaset kui see oli EGFP-WBSCR22 valgul. Sellel võib olla kaks põhjust: esiteks mutantne valk on ebastabiilne või lagundatakse rakust kiiresti, või teiseks mõjutab mutantne valk rakkude elutegevust. Kuna töös kasutati pEGFP-C1 plasmidi pealt konstrueeritud plasmide, ei saa välistada EGFP valgu mõju katsetulemustele, kuigi varasemalt on leitud, et GFP ei tohiks mõjutada rakkude kasvu (Chalfie *et al.* 1994). Analüüsid EGFP-WBSCR22 ja tema mutantsete valkude muutust ajas, oli näha, et EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A lagundati tõepoolest rakkudest kiiremini ning ka nende ekspressioonitase oli madalam kui EGFP-WBSCR22 valgul, sõltumata transfekteeeritud DNA hulgast. Uurimaks, kas mutantsete WBSCR22 valkude väiksem ekspressioonitase on tingitud rakutsükli defektidest, sooritati rakutsükli analüüs, mille tulemused näitasid elusrakkude hulga kergest vähenemist mutantsete WBSCR22 valke ekspresseerivate rakkude puhul, kuid see erinevus polnud nii suur, et saaks järeldada EGFP-WBSCR22-K112T115AA ja EGFP-WBSCR22-D117A valkude toksilist või rakutsükli inhibeerivat toimet.

Rakutsükli analüüsist saadud tulemused ei seletanud mutantsete WBSCR22 valkude kiiremat rakkudest kadumist, seega suunati tähelepanu proteolüütilistele radadele, mis võiksid WBSCR22 lagundamisega tegeleda. Eukarüootsetes rakkudes on mitmeid proteolüütilisi süsteeme – lüsomaalsed proteaasid, kalpaiinid, ATP-ubikvitiin-sõltuv 26S proteasoom ja ATP-sõltumatud mittelüsosomaalsed rajad (Gronostajski *et al.* 1985). Enamikke raku valke lagundab 26S proteasoomkompleks, mis tunneb ära ubikvitiinüleeritud valke ning hüdrolüüsib neid (Rock *et al.* 1994; Lecker *et al.* 2006). Käesolevas töös kasutati 26S proteasoomi inhibiitorit MG-132, mille lisamisel suurenes EGFP-WBSCR22 ja tema mutantsete valkude hulk, samas kui EGFP valgu tase rakkudes oluliselt ei suurenenud. Hiljem sooritati ka katsed, mis näitasid, et WBSCR22 valku tõepoolest ubikvitiinüleeritakse (Õunap, avaldamata andmed) ning võttes arvesse MG-132 kasutamisel saadud tulemusi, on alust arvata, et nimetatud valgu taseme kontrolliks kasutatakse 26S proteasoomi rada. Sellest võib järeldada, et EGFP-WBSCR22 ja tema mutantide EGFP intensiivsused on paremini kontrollitud kui EGFP valgul. Seega on suure tõenäosusega WBSCR22 valgu hulk rakkudes range kontrolli all kuna tema hulga muutused põhjustavad rakkudel fenotüübilisi muutusi.

Varasemast on teada, et pagari pärmi suurendab Trm112 valk Bud23 valgustabiilsust (Figaro *et al.* 2012; Sardana and Johnson 2012). Käesolevas töös püstitati samuti hüpotees, et WBSCR22 interaktsioon TRMT112 valguga kontrollib WBSCR22 hulka rakus ja need valgud on omavahel dünaamilises kompleksis (joonis 16). Kui aga WBSCR22 valku on rakus ülehulgas või leidub mutantseid WBSCR22 valke, mis ei suuda piisavalt efektiivselt TRMT112 valguga interakteeruda, lagundatakse TRMT112-ga mitteseondunud WBSCR22 ja mutantsed valgud läbi ATP-ubikvitiin-sõltuva 26S proteasoomi. Samas ei saa välistada, et WBSCR22 ja TRMT112 vaheline interaktsioon on kompleksem kui käesolevas töös esitatud mudel seda kujutab. Üheks põhjuseks võib olla ka imetajarakkudes esinev rakusiseste süsteemide kompenseerimine üksteise poolt minimeerimaks tekkivaid vigu. Teiseks põhjuseks on vähesed teadmised imetajarakkudes toimuvate protsesside detailsete aspektide osas, mis võivad olla reguleeritud teiste mehhanismide poolt võrreldes analoogsete protsessidega pagari pärmi rakkudes (Conlon and Raff 2003). Seega on oluliseks uurida seda interaktsiooni põhjalikumalt, sest ei saa välistada, et WBSCR22-TRMT112 kompleksi tekkest võtavad osa ka teised valgud.

Käesolev magistritöö iseloomustab WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelist rakusisest interaktsiooni ja selle lokaliseerimist ning WBSCR22 valgustabiilsuse mõju rakkude fenotüübile. WBSCR22 ja TRMT112 rakkude vaheline interaktsioon tundub olevat kompleksem kui algsest arvati, seega on olnud keeruline teha selle interaktsiooni kohta rohkem järeldusi kui asjaolu, et nad interakteeruvad raku tuumas ning TRMT112 akumulatsioon sinna just WBSCR22 valgustabiilsuse tõttu. TRMT112 pagari pärmi homoloogi Trm112 kohta on ilmunud rohkelt kirjandust, kus käsitletakse tema erinevaid interaktsioonipartnerid. Seepärast oleks oluline uurida, kas rakus tekkival WBSCR22-TRMT112 kompleksil on juures ka teisi lisavalke, mis seda interaktsiooni komplementeerivad või tugevdavad. Samuti tuleks tähelepanu pöörata WBSCR22 valgule endale, et saada parem arusaam tema funktsioonist rakus.



Joonis 16. WBSR22 ja TRMT112 vahelise interaktsiooni mudel. WBSR22 on joonisel kujutatud sinise, TRMT112 oranži kerana. WBSR22 ja TRMT112 valkude kompleksi kujutab joonisel sinine ja oranž pall koos neid ühendava kollase blokiga, mutantset WBSR22 valku tähistab sinine kera punase ristiga.

KOKKUVÕTE

7q11.23 alas ekspresseeritakse WBSCR22 valku, mis omab metüültransferaasidele omast SAM-seondavat domeeni ning millel on näidatud olevat roll 40S subühikute biogeneesil. TRMT112 on inimese homoloog pagaripärmi Trm112 valgust, mis assotsieerub paljude metüültransferaasidega, muuhulgas ka WBSCR22 homoloogi Bud23 valguga. Varasemalt on näidatud pärmis Bud23 ja Trm112 vahelist interaktsiooni ning siinse töö tulemused näitavad, et WBSCR22 ja TRMT112 valkude vaheline interaktsioon leiab aset ka imetajarakkudes.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida WBSCR22 ja TRMT112 vahelist interaktsiooni ja selle interaktsiooni lokalisatsiooni elurakkudes. Konfokaalmikroskoopia katsetest oli näha, et WBSCR22 ja TRMT112 rakkude vaheline kompleks tekib raku tuumas, kusjuures WBSCR22 viib TRMT112 raku tuuma. Mutantsetel WBSCR22-K112T115AA ja WBSCR22-D117A valgud omasid hoolimata enda muteeritud aminohapetele võimet interakteeruda TRMT112 valguga, kuigi see interaktsioon oli nõrgem. See arvatavasti tähendab, et TRMT112 valguga interakteerumisel on oluliseks ka teised WBSCR22 aminohapped peale 112., 115. ja 117. positsioonis asuvatele.

Järgnevalt uuriti WBSCR22 ja tema mutantsete valkude ekspressiooni imetajarakkudes ajas ning leiti, et mutantsete WBSCR22 valgud lagundatakse rakkudest kiiremini kui *wild-type* valk ning need tulemused ei olnud sõltuvad transfekteeritud DNA hulgast. EGFP positiivsete rakkude hulga kiire languse tõttu lisati rakkudele 26S proteasoomi inhibiitorit MG-132, mille tulemusel suurenes nii EGFP-WBSCR22 kui ka mutantsete WBSCR22 positiivsete rakkude hulk märgatavalt. Sellest võib järeldada, et TRMT112 valguga mitteseondunud ja/või defektse WBSCR22 valgu rakust lagundamiseks kasutatakse ATP-ubikvitiin-sõltuvat 26S proteasoomi rada.

SUMMARY

Ribosome biogenesis methyltransferase WBSCR22 is controlled by TRMT112 in the cell

Williams-Beuren syndrome (WBS) is a complex multisystemic disorder that is caused by deletion of about 28 genes at the genomic region of 7q11.23. Patients with WBS have several clinical characteristics that include a variety of cardiovascular, neurological, gastrointestinal and endocrinological problems.

One of the deleted genes encoding WBSCR22 protein takes part of ribosome biogenesis and more specifically, the maturation of 18S rRNA. In addition, *WBSCR22* gene has been shown to be upregulated in cancer cells. Bud23, the homologue of WBSCR22 protein in budding yeast has been shown to interact with Trm112 protein which also takes part of the biogenesis of small and large subunits of the ribosome. Trm112 which homologue in mammal cells is TRMT112 interacts with many different proteins mostly to stabilize them.

The aim of this study was to detect whether WBSCR22 and TRMT112 proteins interact in live mammalian cells and where this interaction takes place. The experiments using confocal microscopy showed that they interact in the cell nucleus and WBSCR22 is responsible for accumulation of TRMT112 into cell nucleus. EGFP-WBSCR22-K112T115 and EGFP-WBSCR22-D177A, WBSCR22 mutant proteins used in this study also showed the ability to transport TRMT112 into the nucleus.

Furthermore, it is shown that the amount of WBSCR22 in cells is highly regulated and mutant WBSCR22 proteins are degraded more rapidly than EGFP-WBSCR22 protein. Using 26S proteasome inhibitor MG-132 it is shown that excess or mutated WBSCR22 proteins that are not covalently attached to TRMT112 are degraded via 26S proteasome pathway.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada enda suurepäraseid juhendajaid Reet Kurge ja Kadri Õunapit nende väärt õpetussõnade, rõõmsameelsuse ja kannatlikkuse eest. Samuti avaldan suurt tänu Liisi Võsale, Aare Abroile ja Lilian Leetsile, kes abistasid mind ikka ja jälle nõu ja jõuga, ning tervele Tehnoloogiainstituudi 4. korruse rahvale, kes muutsid töökeskkonna ääretult toredaks. Eriline tänu läheb minu elukaaslasele, sõpradele ja perekonnale, kes elasid mulle kaasa läbi tõusude ja mõõnade.

KASUTATUD KIRJANDUS

Antonell A., de Luis O., Domingo-Roura X. and Pérez-Jurado L.A. (2005). Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Research* 15: 1179-1188.

Bachellerie J.-P., Cavallé J. and Hüttenhofer A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84: 775-790.

Bayés M., Magano L.F., Rivera N., Flores R. and A. Pérez Jurado L. (2003). Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *American Journal of Human Genetics* 73: 131-151.

Beck M., Schmidt A., Malmstroem J., Claassen M., Ori A., Szymborska A., Herzog F., Rinner O., Ellenberg J. and Aebersold R. (2011). The quantitative proteome of a human cell line. *Molecular Systems Biology* 7.

Berg J.S., Brunetti-Pierri N., Peters S.U., Kang S.-H.L., Fong C.-T., Salamone J., Freedenberg D., Hannig V.L., Prock L.A., Miller D.T., Raffalli P., Harris D.J., Erickson R.P., Cunniff C., Clark G.D., Blazo M.A., Peiffer D.A., Gunderson K.L., Sahoo T., Patel A., Lupski J.R., Beaudet A.L. and Cheung S.W. (2007). Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genetics in Medicine* 9: 427-441.

Brand R.C., Klootwijk J., Van Steenberghe T.J.M., De Kok A.J. and Planta R.J. (1977). Secondary methylation of yeast ribosomal precursor RNA. *European Journal of Biochemistry* 75: 311-318.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. and Prasher D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

Colley A., Beggs J.D., Tollervey D. and Lafontaine D.L.J. (2000). Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the Box C+D snoRNP U3. *Molecular and Cellular Biology* 20: 7238-7246.

Collinet B., Friberg A., Brooks M.A., van den Elzen T., Henriot V., Dziembowski A., Graille M., Durand D., Leulliot N., Saint André C., Lazar N., Sattler M., Séraphin B. and van

- Tilbeurgh H. (2011). Strategies for the structural analysis of multi-protein complexes: Lessons from the 3D-repertoire project. *Journal of Structural Biology* 175: 147-158.
- Conlon I. and Raff M. (2003). Differences in the way a mammalian cell and yeast cells coordinate cell growth and cell-cycle progression. *Journal of Biology* 7 2: 1-10.
- Cuscó I., Corominas R., Bayés M., Flores R., Rivera-Brugués N., Campuzano V. and Pérez-Jurado L.A. (2008). Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Research* 18: 683-694.
- Decatur W.A. and Fournier M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 344-351.
- DeSilva U., Massa H., Trask B.J. and Green E.D. (1999). Comparative mapping of the region of human chromosome 7 deleted in Williams syndrome. *Genome Research* 9: 428-436.
- Doll A. and Grzeschik K.-H. (2001). Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenetic and Genome Research* 95: 20-27.
- Ewart A.K., Morris C.A., Atkinson D., Jin W., Sternes K., Spallone P., Stock A.D., Leppert M. and Keating M.T. (1993). Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genetics* 5: 11-16.
- Fatica A. and Tollervey D. (2002). Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 313-318.
- Figaro S., Scrima N., Buckingham R.H. and Heurgué-Hamard V. (2008). HemK2 protein, encoded on human chromosome 21, methylates translation termination factor eRF1. *FEBS Letters* 582: 2352-2356.
- Figaro S., Wacheul L., Schillewaert S., Graille M., Huvelle E., Mongeard R., Zorbas C., Lafontaine D.L. and Heurgué-Hamard V. (2012). Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Molecular and Cellular Biology*.
- Francke U. (1999). Williams-Beuren syndrome: Genes and mechanisms. *Human Molecular Genetics* 8: 1947-1954.

Gavin A.-C., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J.M., Michon A.-M., Cruciat C.-M., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M.-A., Copley R.R., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G. and Superti-Furga G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-147.

Ghaemmaghami S., Huh W.-K., Bower K., Howson R.W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E.K. and Weissman J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741.

Glickman M.H. and Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Journal Article* 82: 373-428.

Graille M., Figaro S., Kervestin S., Buckingham R.H., Liger D. and Heurgué-Hamard V. (2012). Methylation of class I translation termination factors: Structural and functional aspects. *Biochimie* 94: 1533-1543.

Gronostajski R.M., Pardee A.B. and Goldberg A.L. (1985). The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 260: 3344-3349.

Gu T., He H., Zhang Y., Han Z., Hou G., Zeng T., Liu Q. and Wu Q. (2012). *TRMT112* gene expression in mouse embryonic development. *ACTA Histochemica et Cytochemica* 45: 113-119.

Henrichsen C.N., Csárdi G., Zobot M.-T., Fusco C., Bergmann S., Merla G. and Reymond A. (2011). Using transcription modules to identify expression clusters perturbed in Williams-Beuren syndrome. *PLoS Computer Biology* 7: e1001054.

Heurgué-Hamard V., Champ S., Mora L., Merkoulova-Rainon T., Kisselev L.L. and Buckingham R.H. (2005). The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the YDR140w gene. *Journal of Biological Chemistry* 280: 2439-2445.

Heurgué-Hamard V., Graille M., Scrima N., Ulryck N., Champ S., van Tilbeurgh H. and Buckingham R.H. (2006). The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36140-36148.

Hobart H.H., Morris C.A., Mervis C.B., Pani A.M., Kistler D.J., Rios C.M., Kimberley K.W., Gregg R.G. and Bray-Ward P. (2010). Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 154C: 220-228.

Howald C., Merla G., Digilio M.C., Amenta S., Lyle R., Deutsch S., Choudhury U., Bottani A., Antonarakis S.E., Fryssira H., Dallapiccola B. and Reymond A. (2006). Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. *Journal of Medical Genetics* 43: 266-273.

Hsu J.-M., Huang J., Meluh P.B. and Laurent B.C. (2003). The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Molecular and Cellular Biology* 23: 3202-3215.

Hu Z., Qin Z., Wang M., Xu C., Feng G., Liu J., Meng Z. and Hu Y. (2010). The *Arabidopsis* SMO2, a homologue of yeast TRM112, modulates progression of cell division during organ growth. *The Plant Journal* 61: 600-610.

Huang S.-M., Schönthal A.H. and Stallcup M.R. (2001). Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Nature Oncogene* 20: 2134-2143.

Jangani M., Poolman T.M., Matthews L., Yang N., Farrow S.N., Berry A., Hanley N., Williamson A.J.K., Whetton A.D., Donn R. and Ray D.W. (2014). The methyltransferase WBSCR22/Merm1 enhances glucocorticoid receptor function and is regulated in lung inflammation and cancer. *Journal of Biological Chemistry*.

Kalhor H.R. and Clarke S. (2003). Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Molecular and Cellular Biology* 23: 9283-9292.

Krogan N.J., Cagney G., Yu H., Zhong G., Guo X., Ignatchenko A., Li J., Pu S., Datta N., Tikuisis A.P., Punna T., Peregrín-Alvarez J.M., Shales M., Zhang X., Davey M., Robinson M.D., Paccanaro A., Bray J.E., Sheung A., Beattie B., Richards D.P., Canadien V., Lalev A.,

Mena F., Wong P., Starostine A., Canete M.M., Vlasblom J., Wu S., Orsi C., Collins S.R., Chandran S., Haw R., Rilstone J.J., Gandi K., Thompson N.J., Musso G., St Onge P., Ghanny S., Lam M.H.Y., Butland G., Altaf-Ul A.M., Kanaya S., Shilatifard A., O'Shea E., Weissman J.S., Ingles C.J., Hughes T.R., Parkinson J., Gerstein M., Wodak S.J., Emili A. and Greenblatt J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637-643.

Krogan N.J., Peng W.-T., Cagney G., Robinson M.D., Haw R., Zhong G., Guo X., Zhang X., Canadien V., Richards D.P., Beattie B.K., Lalev A., Zhang W., Davierwala A.P., Mnaimneh S., Starostine A., Tikuisis A.P., Grigull J., Datta N., Bray J.E., Hughes T.R., Emili A. and Greenblatt J.F. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Molecular Cell* 13: 225-239.

Kurg R., Parik J., Juronen E., Sedman T., Abroi A., Liiv I., Langel Ü. and Ustav M. (1999). Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *Journal of Virology* 73: 4670-4677.

Käsper L. (2010). Inimese WBSCR22 valgu puhastamine ja oletatav funktsioon rakus. TÜMRI, Magistritöö.

Lafontaine D., Vandehaute J. and Tollervey D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes & Development* 9: 2470-2481.

Lafontaine D.L.J., Preiss T. and Tollervey D. (1998). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: A quality control mechanism in ribosome synthesis? *Molecular and Cellular Biology* 18: 2360-2370.

Lecker S.H., Goldberg A.L. and Mitch W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology* 17: 1807-1819.

Liger D., Mora L., Lazar N., Figaro S., Henri J., Scrima N., Buckingham R.H., van Tilbeurgh H., Heurgué-Hamard V. and Graille M. (2011). Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 'hub' protein. *Nucleic Acids Research* 39: 6249-6259.

- Liu P., Nie S., Li B., Yang Z.-Q., Xu Z.-M., Fei J., Lin C., Zeng R. and Xu G.-L. (2010). Deficiency in a glutamine-specific methyltransferase for release factor causes mouse embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology* 30: 4245-4253.
- Lüking A., Stahl U. and Schmidt U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33: 259-296.
- Martin J.L. and McMillan F.M. (2002). SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 783-793.
- Mazauric M.-H., Dirick L., Purushothaman S.K., Björk G.R. and Lapeyre B. (2006). Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 285: 18505-18515.
- McCloskey J.A. and Rozenski J. (2005). The small subunit rRNA modification database. *Nucleic Acids Research* 33: D135-D138.
- Merla G., Brunetti-Pierri N., Micale L. and Fusco C. (2010). Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Human Genetics* 128: 3-26.
- Merla G., Ucla C., Guipponi M. and Raymond A. (2002). Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Human Genetics* 110: 429-438.
- Morris C.A. and Mervis C.B. (2000). Williams syndrome and related disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1: 461-484.
- Musinova Y.R., Lisitsyna O.M., Golyshev S.A., Tuzhikov A.I., Polyakov V.Y. and Sheval E.V. (2011). Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813: 27-38.
- Nakazawa Y., Arai H. and Fujita N. (2010). The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. *Cancer Research* 71: 1146-1155.
- Niewmierzycka A. and Clarke S. (1999). S-adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 274: 814-824.

- Ohbayashi I., Konishi M., Ebine K. and Sugiyama M. (2011). Genetic identification of *Arabidopsis* RID2 as an essential factor involved in pre-rRNA processing. *The Plant Journal* 67: 49-60.
- Osborne L.R. (2010). Animal models of Williams syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 154C: 209-219.
- Osborne L.R., Li M., Pober B., Chitayat D., Bodurtha J., Mandel A., Costa T., Grebe T., Cox S., Tsui L.-C. and Scherer S.W. (2001). A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nature Genetics* 29: 321-325.
- Panse V.G. and Johnson A.W. (2010). Maturation of eukaryotic ribosomes: Acquisition of functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 35: 260-266.
- Petrossian T.C. and Clarke S.G. (2011). Uncovering the human methyltransferasome. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- Phipps K.R., Charette J.M. and Baserga S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis — progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2: 1-21.
- Pober B.R. (2010). Williams-Beuren syndrome. *New England Journal of Medicine* 362: 239-252.
- Polevoda B., Span L. and Sherman F. (2006). The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mfq1p and Mfq2p. *Journal of Biological Chemistry* 281: 2562-2571.
- Purushothaman S.K., Bujnicki J.M., Grosjean H. and Lapeyre B. (2005). Trm11p and Trm112p are both required for the formation of 2-methylguanosine at position 10 in yeast tRNA. *Molecular and Cellular Biology* 25: 4359-4370.
- Ramos F., Dubois E. and Piérard A. (1988). Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 171: 171-176.

Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D. and Goldberg A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771.

Rouquette J., Choismel V. and Gleizes P.-E. (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *The EMBO Journal* 24: 2862-2872.

Sardana R. and Johnson A.W. (2012). The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Molecular Biology of the Cell* 23: 4313-4322.

Sardana R., Zhu J., Gill M. and Johnson A.W. (2014). Physical and functional interaction between the methyltransferase Bud23 and the essential DEAH-box RNA helicase Ecm16. *Molecular and Cellular Biology* published ahead of print 7 April 2014.

Sardana R., White J.P. and Johnson A.W. (2013). The rRNA methyltransferase Bud23 shows functional interaction with components of the SSU processome and RNase MRP. *RNA* 19: 828-840.

Scherer S.W., Cheung J., MacDonald J.R., Osborne L.R., Nakabayashi K., Herbrick J.-A., Carson A.R., Parker-Katirae L., Skaug J., Khaja R., Zhang J., Hudek A.K., Li M., Haddad M., Duggan G.E., Fernandez B.A., Kanematsu E., Gentles S., Christopoulos C.C., Choufani S., Kwasnicka D., Zheng X.H., Lai Z., Nusskern D., Zhang Q., Gu Z., Lu F., Zeesman S., Nowaczyk M.J., Teshima I., Chitayat D., Shuman C., Weksberg R., Zackai E.H., Grebe T.A., Cox S.R., Kirkpatrick S.J., Rahman N., Friedman J.M., Heng H.H.Q., Pelicci P.G., Lo-Coco F., Belloni E., Shaffer L.G., Pober B., Morton C.C., Gusella J.F., Bruns G.A.P., Korf B.R., Quade B.J., Ligon A.H., Ferguson H., Higgins A.W., Leach N.T., Herrick S.R., Lemyre E., Farra C.G., Kim H.-G., Summers A.M., Gripp K.W., Roberts W., Szatmari P., Winsor E.J.T., Grzeschik K.-H., Teebi A., Minassian B.A., Kere J., Armengol L., Pujana M.A., Estivill X., Wilson M.D., Koop B.F., Tosi S., Moore G.E., Boright A.P., Zlotorynski E., Kerem B., Kroisel P.M., Petek E., Oscier D.G., Mould S.J., Döhner H., Döhner K., Rommens J.M., Vincent J.B., Venter J.C., Li P.W., Mural R.J., Adams M.D. and Tsui L.-C. (2003). Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 300: 767-772.

- Scherer S.W., Gripp K.W., Lucena J., Nicholson L., Bonnefont J.-P., Pérez-Jurado L.A. and Osborne L.R. (2005). Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Human Genetics* 117: 383-388.
- Schubert C. (2009). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1178-1197.
- Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W. and Selbach M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342.
- Schäfer T., Strauß D., Petfalski E., Tollervey D. and Hurt E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *The EMBO Journal* 22: 1370-1380.
- Shabek N. and Ciechanover A. (2010). Degradation of ubiquitin: The fate of the cellular reaper. *Cell Cycle* 9: 523-530.
- Sharma S., Yang J., Watzinger P., Kötter P. and Entian K.-D. (2013). Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic Acids Research* 41: 9062-9076.
- Songe-Møller L., van den Born E., Leihne V., Vågbø C.B., Kristoffersen T., Krokan H.E., Kirpekar F., Falnes P. and Klungland A. (2010). Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Molecular and Cellular Biology* 30: 1814-1827.
- Speil J. and Kubitscheck U. (2010). Single ovalbumin molecules exploring nucleoplasm and nucleoli of living cell nuclei. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803: 396-404.
- Stansfield I., Jones K.M., Kushnirov V.V., Dagkesamanskaya A.R., Poznyakovski A.I., Paushkin S.V., Nierras C.R., Cox B.S., Ter-Avanesyan M.D. and Tuite M.F. (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 14: 4365-4373.

Storts D.R. and Bhattacharjee J.K. (1987). Purification and properties of saccharopine dehydrogenase (glutamate forming) in the *Saccharomyces cerevisiae* lysine biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* 169: 416-418.

Strunk B.S. and Karbstein K. (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA* 15: 2083-2104.

Studte P., Zink S., Jablonowski D., Bär C., Von Der Haar T., Tuite M.F. and Schaffrath R. (2008). tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Molecular Microbiology* 69: 1266-1277.

Zemp I. and Kutay U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Letters* 581: 2783-2793.

Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J.-L., Mullineux S.-T., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L. and Lafontaine Denis L.J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Molecular Cell* 51: 539-551.

Takebayashi S., Tamura T., Matsuoka C. and Okano M. (2007). Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions. *Molecular and Cellular Biology* 27: 8243-8258.

Tam E., Young E.J., Morris C.A., Marshall C.R., Loo W., Scherer S.W., Mervis C.B. and Osborne L.R. (2008). The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A: 1797-1806.

Tassabehji M. (2003). Williams-Beuren syndrome: A challenge for genotype-phenotype correlations. *Human Molecular Genetics* 12: R229-R237.

Thiry M., Lamaye F.o. and Lafontaine D.L.J. (2011). The nucleolus: When 2 became 3. *Nucleus* 2: 289-293.

Thomas N.S., Durkie M., Potts G., Sandford R., Van Zyl B., Youings S., Dennis N.R. and Jacobs P.A. (2006). Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *European Journal of Human Genetics: EJHG* 14: 831-837.

Tiedemann R.E., Zhu Y.X., Schmidt J., Shi C.X., Sereduk C., Yin H., Mousses S. and Stewart A.K. (2012). Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome. *Cancer Research* 72: 757-768.

Torres A.G., Batlle E. and Ribas de Pouplana L. (2014). Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*.

Towns W.L. and Begley T.J. (2012). Transfer RNA methyltransferases and their corresponding modifications in budding yeast and humans: Activities, predications, and potential roles in human health. *DNA and cell biology* 31: 434-454.

Udem S.A. and Warner J.R. (1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 248: 1412-1416.

Van der Aa N., Rooms L., Vandeweyer G., van den Ende J., Reyniers E., Fichera M., Romano C., Delle Chiaie B., Mortier G., Menten B., Destrée A., Maystadt I., Männik K., Kurg A., Reimand T., McMullan D., Oley C., Brueton L., Bongers E.M.H.F., van Bon B.W.M., Pfund R., Jacquemont S., Ferrarini A., Martinet D., Schrandt-Stumpel C., Stegmann A.P.A., Frints S.G.M., de Vries B.B.A., Ceulemans B. and Kooy R.F. (2009). Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 52: 94-100.

Vanrobays E., Gleizes P.-E., Bousquet-Antonelli C., Noaillac-Depeyre J., Caizergues-Ferrer M. and Gélugne J.-P. (2001). Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *The EMBO Journal* 20: 4204-4213.

White J., Li Z., Sardana R., Bujnicki J.M., Marcotte E.M. and Johnson A.W. (2008). Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Molecular and Cellular Biology* 28: 3151-3161.

Wild T., Horvath P., Wyler E., Widmann B., Badertscher L., Zemp I., Kozak K., Csucs G., Lund E. and Kutay U. (2010). A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biol* 8: e1000522.

Öunap K., Käsper L., Kurg A. and Kurg R. (2013). The human WBSR22 protein is involved in the biogenesis of the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *PLoS ONE* 8: e75686.

Yu H., Braun P., Yıdırım M.A., Lemmens I., Venkatesan K., Sahalie J., Hirozane-Kishikawa T., Gebreab F., Li N., Simonis N., Hao T., Rual J.-F., Dricot A., Vazquez A., Murray R.R., Simon C., Tardivo L., Tam S., Svrzikapa N., Fan C., de Smet A.-S., Motyl A., Hudson M.E., Park J., Xin X., Cusick M.E., Moore T., Boone C., Snyder M., Roth F.P., Barabási A.-L., Tavernier J., Hill D.E. and Vidal M. (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322: 104-110.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/291>

<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/458>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALKBH8>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRMT112>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WBSCR22>

<http://www.uniprot.org/uniprot/P53738>

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UI30>

<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=trm112>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

1. Mina, Maarja Matsoo (11.05.1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Ribosoomi biogeneesi metüültransferaas WBSCR22 on reguleeritud rakus TRMT112 poolt

mille juhendajateks on Reet Kurg ja Kadri Õunap,

- 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 **31.12.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014