

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

**Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikutevahelise silla eB12 olulisus
IRES-vahendatud translatsioonis**

Magistritöö

Molekulaarsed bioteadused

30 EAP

Carolin Kattel

Juhendajad: PhD Tiina Tamm
PhD Margus Leppik

TARTU 2021

INFOLEHT

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 olulisus IRES-vahendatud translatsioonis

Lühikokkuvõte: *Saccharomyces cerevisiae* ribosoom koosneb väikesest (40S) ja suurest (60S) subühikust, mille assotsieerumisel 80S partiklits on olulised 17 subühikute vahelist silda. Magistritöö eesmärgiks oli selgitada kas ja kuidas mõjutab ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 puudumine nii kanoonilist kui ka IRES-vahendatud translatsiooni ning ribosomaalsete subühikute assotsieerumist muteeritud IRES-järjestustel. *In vitro* translatsiooni katsetest selgus, et eB12 silla puudumine ribosoomist mõjutab nii 5'-cap sõltuvat kui ka CrPV IGR IRES-vahendatud valgusünteesi. *In vitro* assotsiatsiooni katsetest selgus, et metsiktüüpi 40S ja puuduva eB12 sillaga 60S ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooniks on vajalik metsiktüüpi IGR IRES struktuur.

CERCS teaduseriala: P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: ribosoom, subühikute vahelised sillad, eB12, CrPV IGR IRES, *in vitro* translatsioon, subühikute re-assotsiatsioon

The importance of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal intersubunit bridge eB12 in IRES-mediated translation

Abstract: The *Saccharomyces cerevisiae* ribosome consists of a small (40S) and a large (60S) subunit - for 80S particle association, the 17 bridges between subunits are important. The aim of the master's thesis was to find out whether and how the lack of bridge eB12 between ribosomal subunits affects both canonical and IRES-mediated translation and the association of ribosomal subunits in mutated IRES sequences. *In vitro* translation tests showed that the absence of the eB12 bridge from the ribosome affects both 5'-cap-dependent and CrPV IGR IRES-mediated protein synthesis. *In vitro* association tests revealed that the wild-type CrPV IGR IRES structure is required for the association of wild-type 40S and 60S ribosomal subunits without the eB12 bridge.

CERCS research specialization: P320 nucleic acids, protein synthesis

Keywords: ribosome, intersubunit bridges, eB12, CrPV IGR IRES, *in vitro* translation, re-association of subunits

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist.....	7
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ribosoomi subühikute struktuur	7
1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ribosoomi subühikute vahelised sillad.....	11
1.2. Ülevaade eukarüootsest translatsioonist	19
1.2.1. Translatsiooni initsiatsioon	19
1.2.2. Translatsiooni elongatsioon	22
1.2.3. Translatsiooni terminatsioon ja ribosoomi subühikute taaskasutus.....	24
1.3. IRES järjestused.....	26
1.3.1. CrPV IGR IRES struktuur	26
1.3.2. Ülevaade CrPV IRES järjestuse vahendatud translatsiooni initsiatsioonist	28
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	32
2.1. Töö eesmärk.....	32
2.2. Materjal	32
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> ja <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tüved ja plasmiidid.....	32
2.2.2. Söötmed ja puhvrid	34
2.2.3. Oligonukleotiidid	35
2.3. Metoodika	35
2.3.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc reportervektorite konstrueerimine.....	35
2.3.2. Plasmidse DNA lineariseerimine.....	39
2.3.3. mRNA süntees, puhastamine ja 5'-cap-imine	39
2.3.4. <i>In vitro</i> translatsiooni reaktsioon	40
2.3.5. Ribosomaalsete subühikute <i>in vitro</i> assotsiatsiooni analüüs	42
2.4. TULEMUSED	44
2.4.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc reportervektorite konstrueerimine ja kontrollimine	44
2.4.2. Konstrueeritud RLuc-IGR-IRES-FLuc reporter-mRNA-de <i>in vitro</i> translatsioon	45
2.4.2.1. 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsioon	45
2.4.2.2. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsioon.....	48
2.4.2.3. RLuc-IGR-IRES _{mut} -FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsioon.....	51
2.4.3. RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-FLuc mRNA-de <i>in vitro</i> translatsiooni TFA-de määramine.....	53
2.4.3.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc <i>in vitro</i> translatsiooni TFA määramine	53
2.4.3.2. RLuc-FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsiooni TFA määramine.....	54

2.4.4. Ribosoomi subühikute <i>in vitro</i> assotsiatsioon	57
2.5. Arutelu	61
KOKKUVÕTE	65
SUMMARY	67
TÄNUSÕNAD	69
KASUTATUD ALLIKAD	70
LISAD	79
Lisa 1. Aminohapete segu koostis.	79
Lisa 2. 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsiooni reaktsiooni RLuc-i ja FLuc-i regressioonisirgete platoode, tõusude ja 60. reaktsiooniminutite keskmised ($\pm$ standardhälbed) <i>wt</i> ja Δ eB12 pärmiekstraktides.	79
Lisa 3. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsiooni reaktsiooni RLuc-i ja FLuc-i regressioonisirgete platoode ja tõusude keskmised ($\pm$ standardhälbed) <i>wt</i> ja Δ eB12 pärmiekstraktides.	80
Lisa 4. RLuc-IGR-IRES _{mut} -FLuc mRNA <i>in vitro</i> translatsiooni reaktsiooni RLuc-i regressioonisirgete platoode ja tõusude keskmised ($\pm$ standardhälbed) Δ eB12 pärmiekstraktis	80
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS	81

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

A-sait – aminoatsüül-tRNA sait

CrPV IGR IRES – kilhide paralüüsi viiruse (ingl *cricket paralysis virus*) geenidevahelise piirkonna (ingl *intergenic region*) sisemine ribosoomi sisenemise sait (ingl *internal ribosome entry site*)

Da – dalton

E. coli – *Escherichia coli* ehk soolekepike

E-sait – tRNA väljumissait (ingl *exit site*)

IF – initsiatsioonifaktor (ingl *initiation factor*)

MW – molekulaarne kaal (ingl *molecular weight*)

PK – pseudosõlm (ingl *pseudoknot*)

P-sait – peptidüül-tRNA sait

PTC – peptidüültransferaasne tsenter

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärm

S – Svedbergi ühik

TBE – tris-boorhape-EDTA puhver

U – ühik (ingl *unit*)

UTR – mittetransleeritav regioon (ingl *untranslated region*)

wt – metsiktüüp (ingl *wild type*)

SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribosomaalsetest RNA-dest (rRNA-dest) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valkudest) koosnev kompleks, mis viib rakkudes läbi võtmetähtsusega protsessi – valkude biosünteesi. *Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärmi ribosoom koosneb väikesest 40S ja suurest 60S subühikust. Väike subühik koosneb 33 r-valgust ja 18S rRNA-st ning vastutab mRNA-s sisalduva informatsiooni dekodeerimise eest. Suur subühik koosneb 46 r-valgust, 5S ja 5.8S ning 25S rRNA-st. 60S subühik vastutab peptiidsideme katalüüsamise eest. Ribosomaalsete 40S ja 60S subühikute omavahelisel seondumisel translatsiooniliselt aktiivseks 80S ribosoomiks on olulised ribosomaalsete subühikute vahelised sillad. *S. cerevisiae* ribosoomis on kirjeldatud 17 ribosomaalsete subühikute ühinemisel tekkivat silda (Ben-Shem *et al.*, 2011). Subühikutevahelistest sildadest kaksteist omavad väga sarnast ülesehitust ja asukohta ka prokarüootses ribosoomis, mistõttu nimetatakse neid ka konserveerunud sildadeks (Ben-Shem *et al.*, 2011; Yusupov *et al.*, 2001). Konserveerunud sillad on enamjaolt leitavad ribosoomi konserveerunud funktsionaalses südamikus. *S. cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelistest sildadest viis on aga omased ainult eukarüootsele ribosoomile ehk on eukarüoodispetsiifilised. Nende sildade komponentideks on valdavalt eukarüoodispetsiifilised r-valgud ja rRNA-de lisasegmendid (ingl *extension segments*). Eukarüoodispetsiifilistest subühikute vahelistest sildadest neli, mille hulgas on ka käesoleva töö seisukohast oluline eB12 sild, asuvad subühikute vahelise kokkupuutepinna ääreregioonides, kus ribosomaalsete subühikute suhteline liikumine on kõige ulatuslikum. Silla eB12 olulisust on näidatud nii ribosomaalsete subühikute stabiilsel seondumisel 80S ribosoomiks kui ka ribosomaalsete subühikute omavahelisel rotatsioonil translatsiooni elongatsioonifaasis aset leidvas translokatsiooni protsessis (Kisly *et al.*, 2016).

Magistritöö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade eukarüootsest ribosoomist, *S. cerevisiae* ribosomaalsete subühikute struktuurist ja subühikute vahelistest sildadest ning eukarüootsest translatsioonist. Lisaks sellele antakse ülevaade ka kilhide paralüüsi viiruse (ingl *cricket paralysis virus*) (CrPV) geenidevahelise piirkonna (ingl *intergenic region*) (IGR) sisemisest ribosoomide sisenemise saidist (ingl *internal ribosome entry site*) (IRES) ja sellelt lähtuvast kahte translokatsiooni protsessi vajavast translatsiooni initsiatsioonist. Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 puudumine ribosoomist CrPV IGR IRES-e järjestuse variantidelt lähtuvat translatsiooni ja ribosomaalsete subühikute re-assotsiatsiooni võrrelduna metsiktüüpi ribosoomidega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist

Ribosoomid on ribosomaalsetest RNA-dest (rRNA-dest) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valkudest) koosnevad universaalselt konserveerunud makromolekulaarsed kompleksid, mis viivad rakkudes läbi võtmetähtsusega protsessi – valkude biosünteesi ehk translatsiooni.

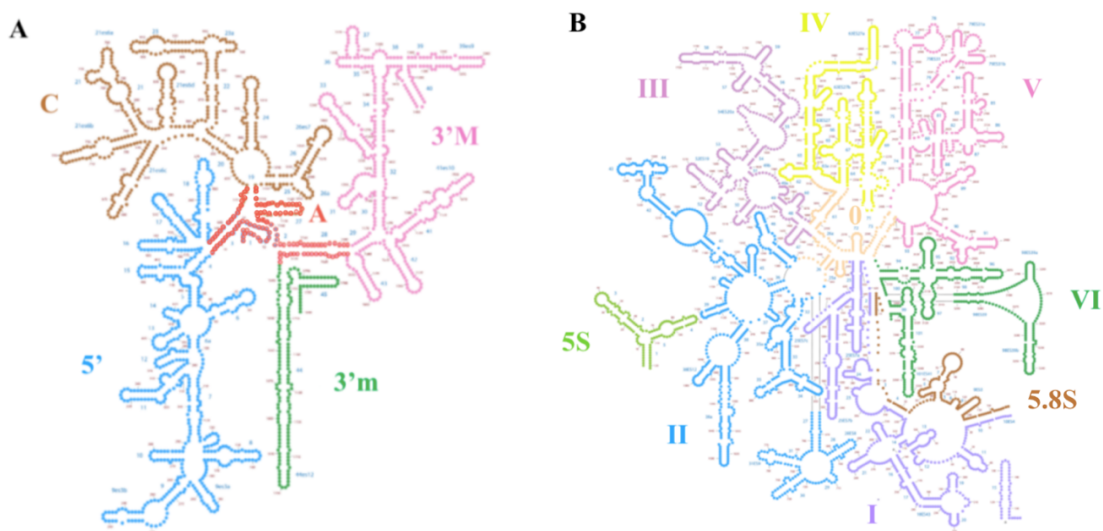
Ribosoomide ensümaatiline aktiivsus põhineb, erinevalt valdavast enamusest rakulistest polümeraasidest, RNA-l – tegemist on ribosüümidega (Green *et al.*, 1997; Noller *et al.*, 1992). Ribosoomide koosseisu kuuluvad r-valgud toimivad seevastu pigem struktuursete elementidena, stabiliseerides rRNA-de tertsiaarstruktuure (Klein *et al.*, 2004).

Kõik ribosoomid on moodustunud kahest subühikust, mille vahel rRNA ja r-valgud on ebavõrdselt jaotunud. Funktsionaalne eukarüootne ribosoom koosneb väikesest 40S (MW $\approx$ 1,2 MDa) ja suurest 60S (MW $\approx$ 2,0 MDa) subühikust (Ben-Shem *et al.*, 2011; Spahn *et al.*, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi 40S subühik koosneb 33 r-valgust (MW $\approx$ 0,55 MDa) ja 18S rRNA-st (MW $\approx$ 0,65 MDa), mis sisaldab 1800 nukleotiidi (Ben-Shem *et al.*, 2011; Spahn *et al.*, 2001). Väike ribosomaalne subühik tagab translatsiooni initsiatsioonil start-koodoni korrektse äratundmise ja elongatsioonil korrektse aminoatsüül-tRNA valiku, ehk mRNA-s sisalduva informatsiooni dekodeerimise (Merrick ja Pavitt, 2018). *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi 60S subühik koosneb 46 r-valgust (MW $\approx$ 0,76 MDa) ja kolmest rRNA-st (MW $\approx$ 1,26 MDa): 5S rRNA-st, mis sisaldab 121 nukleotiidi, 5.8S rRNA-st, mis sisaldab 158 nukleotiidi ning 3394 nukleotiidi sisaldavast 25S rRNA-st (Ben-Shem *et al.*, 2011; Spahn *et al.*, 2001). Suur ribosomaalne subühik katalüüsib peptiidsideme teket (Nissen *et al.*, 2000). 40S ja 60S subühikud moodustavad subühikute kokkupuutepindasid ühendavate intermolekulaarsete sildade kaudu translatsiooniliselt aktiivse 80S (MW $\approx$ 3,2 MDa) ribosoomi (Yusupov *et al.*, 2001).

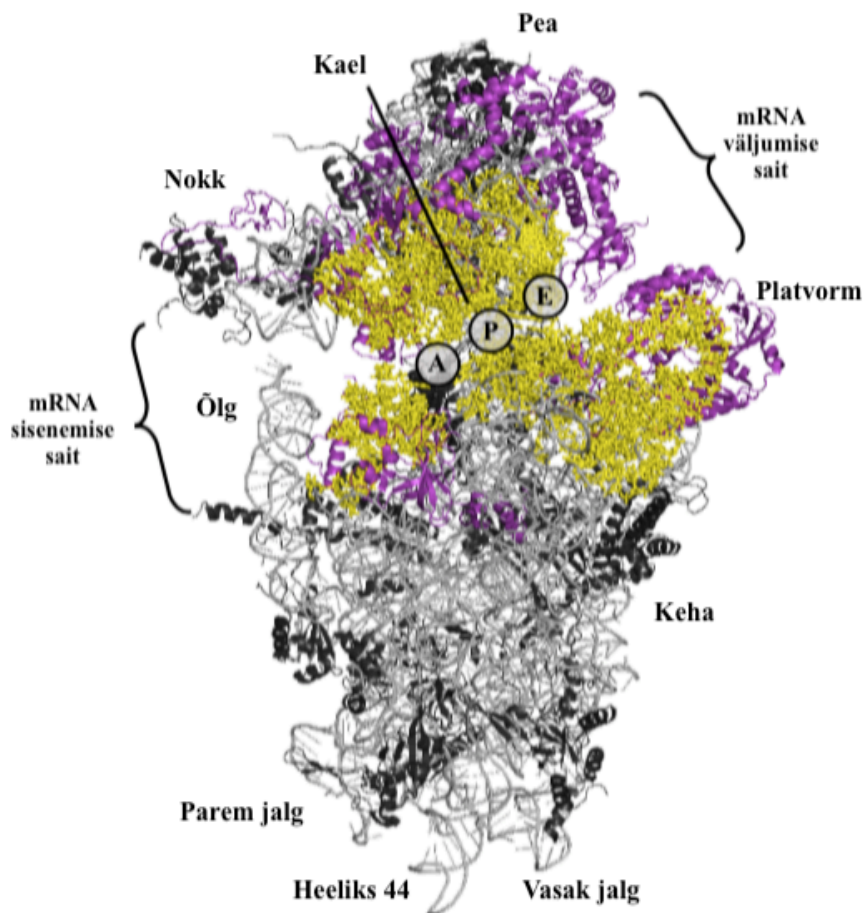
1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute struktuur

Saccharomyces cerevisiae ribosoomi väikese subühiku koosseisu kuuluva 18S rRNA sekundaarstruktuuris eristuvad viis domeeni: 5' (5'), tsentraalne (C), 3'-mažoorne (3'M), 3'-minoorne (3'm) ja neid omavahel ühendav 18S rRNA keskne domeen A (Joonis 1A) (Gulen *et al.*, 2016). Sekundaarstruktuuri domeenid moodustavad r-valkude kaasabil (ingl *assistance*)

voltunud tertsiaarstruktuuris üheksa morfoloogilist elementi, millele on tinglikult antud nimed: pea, nakk, kael, platvorm, õlg, keha, parem ja vasak jalg ning tüvistruktuur (ingl *stem*), mille moodustab heeliks 44 (Joonis 2) (Spahn *et al.*, 2001). Valkude biosünteesis matriitsina (ingl *template*) kasutatav mRNA (ingl *messenger RNA*) siseneb ribosoomi väikesesse subühikusse noka ja õla elementide vahelt, väljumise sait asub aga pea ja platvormi elemendi vahel (Spahn *et al.*, 2001). Nende saitide vahel, kaela elemendi piirkonnas, asuvad nii mRNA kanal kui ka aminoatsüül- (A), peptidüül- (P) ja deatsetüleeritud (E) tRNA (ingl *transfer RNA*) saidid. Seejuures interakteerub 40S subühikuga vaid väike osa tRNA molekulist (Nierhaus *et al.*, 2000). Oluline roll tRNA seondumisel 40S subühikule on eelkõige interaktsioonidel 18S rRNA heeliksiga 24, 30, 31, 43 ja 44 ning r-valguga uS9 (Spahn *et al.*, 2001). Ribosoomi väikese subühiku võtmefunktsiooni translatsiooni elongatsioonifaasis täidab A-saidis paiknev dekodeeriv tsepter, milles 18S rRNA heeliksi 18 nukleotiid G577 stabiliseerib koodon-antikoodon paardumise ning initsieerib järkjärgulise dekodeeriva tsentri lukustumise (ingl *latching*) (Loveland *et al.*, 2017). Koodon-antikoodon paardumise vastamist Watson-Crick'i geomeetria kontrollivad 18S rRNA heeliksis 44 paiknevad nukleotiidid A1755 ja A1756, mis moodustavad tekkinud kolmenukleotiidse heeliksiga A-minoorseid interaktsioone (Ogle *et al.*, 2001).



Joonis 1. *S. cerevisiae* 18S, 25S, 5S ja 5.8S rRNA-de sekundaarstruktuurid. (A) 18S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on märgitud 18S rRNA sekundaarstruktuuri elemendid: 5' domeen (helesinine), tsentraalne domeen (C) (helepruun), 3' mažoorne (3'M) (heleroosa), 3' minoorne (3'm) (tumeroheline) domeen ning domeen A (punane). (B) 25S, 5S ja 5.8S rRNA sekundaarstruktuurid. Joonisel on märgitud 25S rRNA domeenid 0 (beež), I (helelilla), II (helesinine), III (lilla), IV (kollane), V (heleroosa), VI (tumeroheline) ja 5S (heleroheline) ning 5.8S (helepruun) rRNA-d. Joonis kohandatud (Gulen *et al.*, 2016).



Joonis 2. *S. cerevisiae* ribosoomi 40S subühiku kolmedimensionaalne struktuur vaadatuna subühikute vaheliselt poolelt. Joonisel on 18S rRNA ja r-valgud kujutatud vastavalt hallilt ja mustalt, sealjuures on rRNA heeliksid ja valgud, mis panustavad mRNA kanali või tRNA seondumissaitide moodustumisse kujutatud vastavalt kollaselt või tumeroosalt. Joonisel on märgitud 40S subühiku tertsiaarstruktuuri morfoloogilised elemendid: pea, nokk, kael, platvorm, õlg, keha, parem ja vasak jalg ning heeliks 44. Lisaks sellele on joonisel märgitud mRNA sisenemise ja väljumise saidid ning ligikaudsed aminoatsüül- (A), peptidüül- (P) ja deatsetüleeritud (E) tRNA saidid. Joonis kohandatud (Kisly, 2019).

S. cerevisiae suure ribosomaalse subühiku koosseisu kuuluva 25S rRNA sekundaarstruktuuris on eristatavad seitse domeeni: I-VI ja neid omavahel ühendav keskne südamik, mis defineeriti domeen 0-na (Joonis 1B) (Petrov *et al.*, 2014). Seega, sarnaselt 18S rRNA sekundaarstruktuuriga, on ka 25S rRNA sekundaarstruktuuris keskne, kõrgelt struktureeritud südamikdomeen, millest teised rRNA domeenid välja hargnevad. 25S rRNA kaheksandaks ja üheksandaks domeeniks võib tinglikult pidada 5S ja 5.8S rRNA-d.

Tertsiaarstruktuuris moodustab 25S rRNA koos 5S ja 5.8S rRNA ning r-valkudega globulaarse struktuuri, milles on eristatavad kolm kühmu (ingl *stalk*): L1 kühm, tsentraalne ja P kühm (Ben-Shem *et al.*, 2011) (Joonis 3). L1 kühmu moodustavad 25S rRNA domeeni V kuuluvad heeliksid 75, 76 ja 79 ning r-valk uL1 (Reblova *et al.*, 2012). E-saidi läheduses paiknev

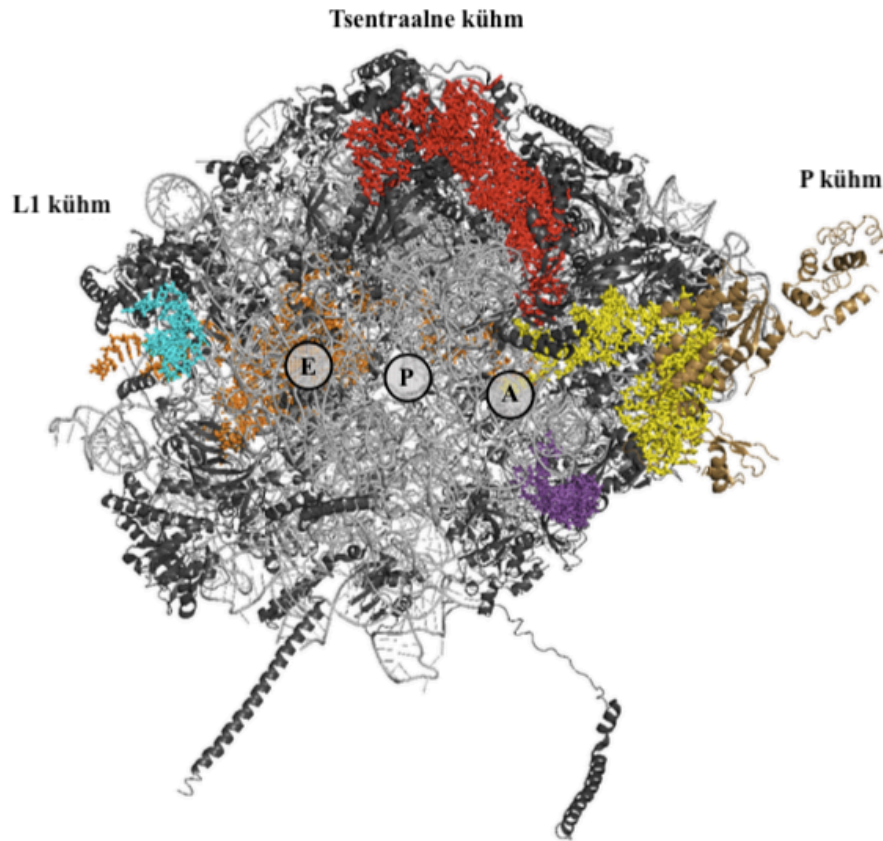
dünaamiline L1 kühm on seotud nii tRNA-de translokatsiooniga P-saidist E-saiti, kui ka deatsetüleeritud tRNA-de vabastamisega ribosoomist (Trabuco *et al.*, 2010).

Tsentraalne kühm, mille moodustavad 5S rRNA ja r-valgud uL5 ning uL18, koordineerib ribosoomi funktsionaalsete keskuste aktiivsust vastusena keskuste endi poolt edastatud allosteerilistele signaalidele (Bogdanov *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001).

P kühmu moodustumise aluseks on 25S rRNA domeen II, milles r-valgud uL10, uL11, P1 ja P2 on seondunud rRNA heeliksile 42-44 (Ben-Shem *et al.*, 2011; Spahn *et al.*, 2001; Tchorzewski *et al.*, 2003). P kühm on osa universaalselt konserveerunud ribosomaalsest GTPaasi siduvast tsentrist (ingl *GTPase-associated center*) (GAC) ning stimuleerib faktor-sõltuvat GTP hüdrolüüsi (Wawiora *et al.*, 2017). GAC teiseks elemendiks on 25S rRNA domeeni VI heeliksis 95 paiknev sartsiin-ritsiin ling (SRL), mis on oluline aktiveerimaks translatsioonil osalevaid GTPaase (Voorhees *et al.*, 2010).

Sarnaselt väikesele ribosomaalsele subühikule, on ka suures subühikus paiknevad A-, P- ja E-tRNA saidid domineeritud rRNA heeliksile poolt. A- ja P-saitide piirkonnas asub ribosoomi oluliseim piirkond - peptidüültransferaasne tsenter (ingl *peptidyl transferase center*) (PTC), mis moodustub 25S rRNA domeeni V heeliksidest 73, 74 ja 80-93 (Ben-Shem *et al.*, 2011). PTC-s viiakse läbi ribosoomi kõige fundamentaalsemat funktsiooni – peptiidsideme sünteesi, mille katalüüs sõltub täielikult rRNA-st (Nissen *et al.*, 2000)

Peptidüültransferaasest tsentrist saab alguse ribosoomi suure subühiku solvendipoolsel küljel avanenud peptiidi väljumistunnel (Nissen *et al.*, 2000). Tunnel moodustub peamiselt 5.8S rRNA ja 25S rRNA domeenide 0, I, III ja V osalusel, kuid tunneli toetamisel on oluline panus ka r-alkudel uL4, uL22 ja eL39. Ribosoomivalk uL22, koos r-alkude uL19, uL23, uL24, uL29, eL31, panustab ka peptiidi väljumissaidi moodustumisse (Nissen *et al.*, 2000). Peptiidi väljumistunnelis algab vast sünteesitud polüpeptiidide esmane voltumine väikesteks α -heeliksileks, β -juuksenõel struktuurideks ja tsink-sõrm domeenideks (Nilsson *et al.*, 2015).

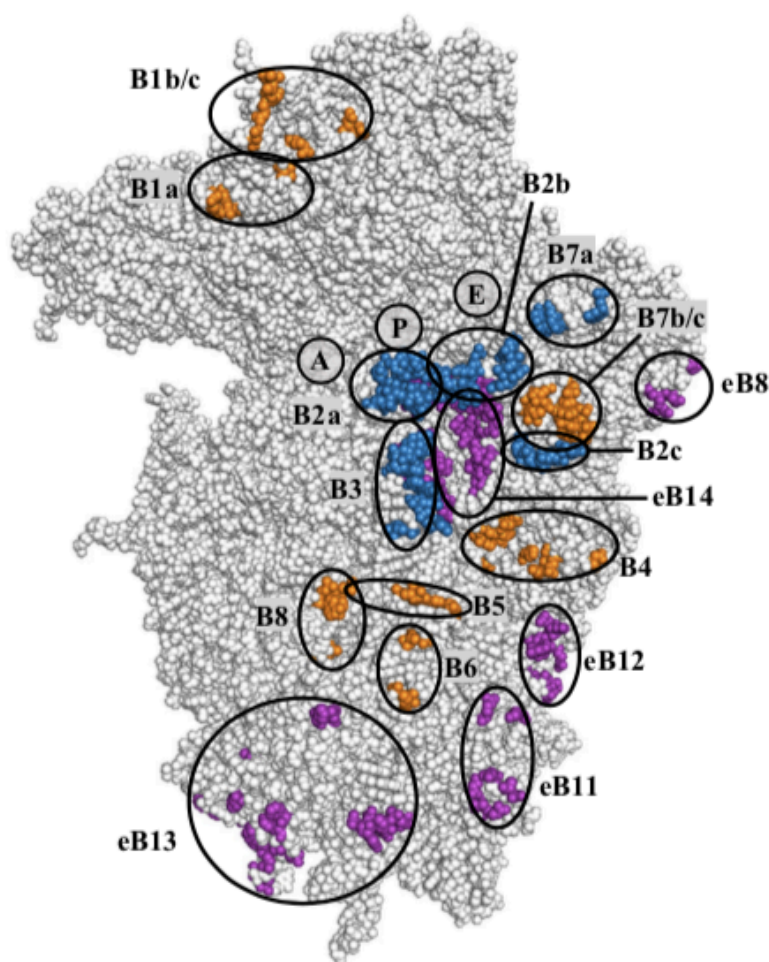


Joonis 3. *S. cerevisiae* ribosoomi 60S subühiku kolmedimensionaalne struktuur vaadatuna subühikute vaheliselt poolelt. Joonisel 5S rRNA kujutatud punaselt, 5.8S rRNA oranžilt, 25S rRNA hallilt ja r-valgud mustalt. Joonisel on märgitud 60S subühiku tertsiaarstruktuuris olulised morfoloogilised elemendid: L1 kühm, tsentrálne kühm ja P kühm. Lisaks sellele on märgitud ligikaudsed aminoatsüül- (A), peptidüül- (P) ja deatsetüleeritud (E) tRNA saidid. 25S rRNA heeliksid, mis panustavad L1 kühmu moodustamisse on kujutatud helesiniselt. P kühmu moodustavad 25S rRNA heeliksid 42-44 ning r-valgud uL10, uL11, P1 ja P2 on kujutatud vastavalt kollaselt ja pruunilt. Sartsiin-ritsiin ling on kujutatud lillalt. Joonis kohandatud (Kisly, 2019).

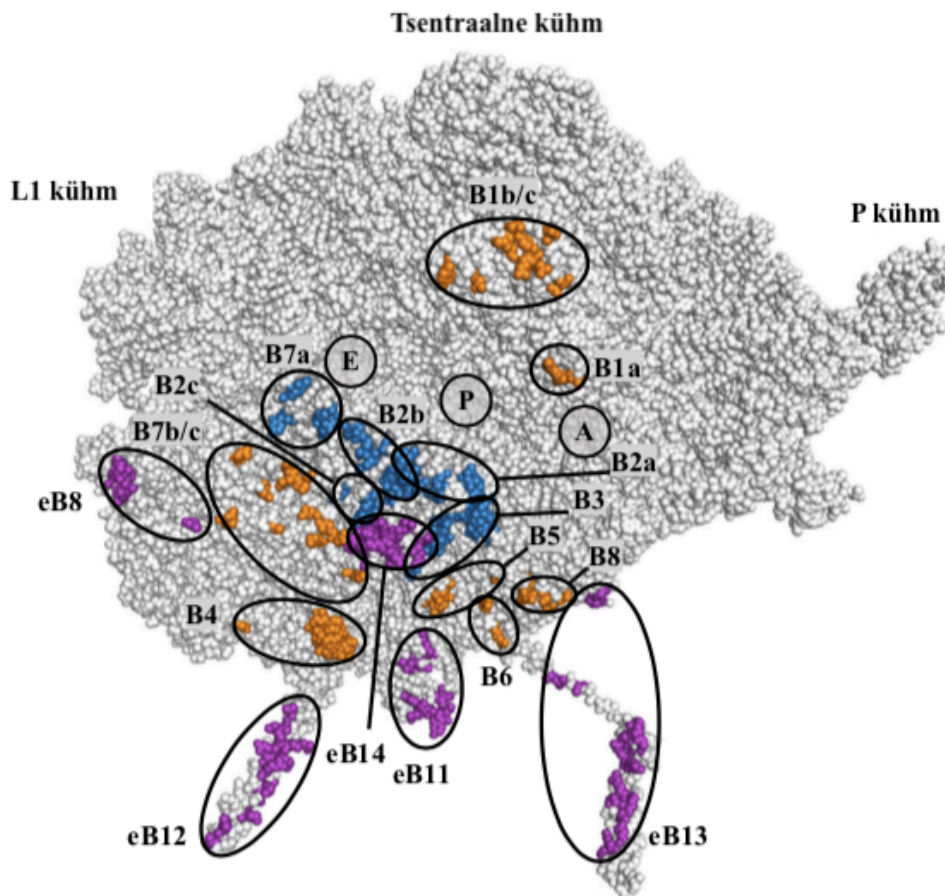
1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelised sillad

Saccharomyces cerevisiae ribosomaalsed 40S ja 60S subühikud moodustavad subühikute vaheliste kontaktide ehk sildade vahendusel funktsionaalse 80S ribosoomi. Lisaks strukturesele rollile, on sildadel oluline osa ka subühikute vahelises informatsioonivahetuses ja sellest tulenevalt ka subühikute aktiivsuse koordineerimises (Ben-Shem *et al.*, 2011). *S. cerevisiae* ribosoomis on kirjeldatud 17 subühikute vahelist silda, mis jagunevad vastavalt interaktsiooni olemusele kolmeks: rRNA-rRNA, valk-rRNA ja valk-valk sillad (Ben-Shem *et al.*, 2011).

rRNA-rRNA tüüpi interaktsioone sisaldavad sillad on kõige stabiilsemad ja translatsiooniprotsessis väheste lokaalsete ümberkorraldustega. Need sillad asetsevad võrdlemisi staatilistes regioonides ribosoomi funktsionaalses keskmes (Joonised 4, 5) (Gao *et al.*, 2003). Seevastu valk-rRNA ja eelkõige valk-valk interaktsioone sisaldavad sillad on dünaamilisemad ja esinevad regioonides, kus translatsioonitsükli käigus toimub ulatuslik subühikute vaheline suhteline liikumine (Joonised 4, 5) (Gao *et al.*, 2003). *S. cerevisiae* ribosoomi seitsmeteistkümnest subühikute vahelisest sillast kaksteist omavad väga sarnast ülesehitust ja asukohta ka prokarüootses ribosoomis, mistõttu nimetatakse neid ka konserveerunud sildadeks (Ben-Shem *et al.*, 2011; Yusupov *et al.*, 2001). Konserveerunud sillad on enamjaolt leitavad ribosoomi konserveerunud funktsionaalses südamikus (Joonised 4, 5).



Joonis 4. *S. cerevisiae* ribosoomi subühikute vaheliste sildade asukoht 40S subühikul. rRNA ja r-valgud on kujutatud helehallilt. Konserveerunud sillad, mis sisaldavad ainult rRNA-rRNA kontakte on sinised. Konserveerunud sillad, mis sisaldavad valgulist komponenti on oranžid. Eukarüoodispetsiifilised sillad on roosad. Joonisel on märgitud ligikaudsed aminoatsüül- (A), peptidüül- (P) ja deatsetüleeritud (E) tRNA saidid. Joonis kohandatud (Kisly, 2019).



Joonis 5. *S. cerevisiae* ribosoomi subühikute vaheliste sildade asukoht 60S subühikul. rRNA ja r-valgud on kujutatud helehallilt. Konserveerunud sillad, mis sisaldavad ainult rRNA-rRNA kontakte on sinised. Konserveerunud sillad, mis sisaldavad valgulist komponenti on oranžid. Eukarüoodispetsiifilised sillad on roosad. Joonisel on märgitud 60S subühiku tertsiaarstruktuuris olulised morfoloogilised elemendid: L1 kühm, tsentraalne kühm ja P kühm. Lisaks sellele on märgitud ligikaudsed aminoatsüül- (A), peptidüül- (P) ja deatsetüleeritud (E) tRNA saidid. Joonis kohandatud (Kisly, 2019)

Ainult rRNA-rRNA interaktsioone sisaldavad viis konserveerunud silda: B2a, B2b, B2c, B3 ja B7a (Ben-Shem *et al.*, 2011). Need sillad on moodustunud 18S rRNA heeliksi 23, 24, 44 ja 45 ning 25S rRNA domeeni IV heeliksi 62, 64, 66-71 vahel ning loovad ribosoomis tRNA-de ja mRNA teekonda järgiva rRNA-rRNA kontaktide piirkonna (Tabel 1, Joonised 4, 5) (Ben-Shem *et al.*, 2011). rRNA-rRNA sillad on olulised kindlustamiseks ribosomaalsete subühikute stabiilse liitumise 80S ribosoomiks ja translatsioonitsükli käigus toimuva subühikute vahelise roteerumise järel „algse“ oleku taastamise (Gao *et al.*, 2003).

Kuus konserveerunud silda - B1a, B4, B5, B6, B7b/c ja B8 - sisaldavad lisaks rRNA-rRNA interaktsioonidele ka valk-rRNA ja valk-valk interaktsioone. Sild B1a, mis eristub asukohalt

teistest nimetatud sildadest, on moodustunud 18S rRNA heeliksi 33 ja valgu uS19 ning A-saidi paindliku sõrme-elementi, 25S rRNA domeeni II kuuluva heeliksi 38, vahel (Tabel 2). B1a loob kontaktid suure ribosomaalse subühiku tsentraalse kühmu ja väikese subühiku pea elemendi vahel (Joonised 4, 5) (Ben-Shem *et al.*, 2011). Translokatsioonil toimuva pea elemendi pöörlemise (ingl *swiveling*) tõttu, on sild B1a olemas ribosoomi pre-translokatsioonilises konformatsioonis, kuid puudub post-translokatsioonilises konformatsioonis, ehk translatsiooni käigus võib sild kaduda ja uuesti tekkida (Ben-Shem *et al.*, 2011). B1a sillaga samas ribosoomi piirkonnas loob kontakte konserveerunud sildadest viimane - B1b/c - mis on ühtlasi ainus ainult valk-valk interaktsioone sisaldav sild (Joonised 4, 5) (Ben-Shem *et al.*, 2011). Selle silla moodustamisel osalevad kaks valku väikesest ribosomaalsest subühikust - uS13 ja uS19 – ning üks suure subühiku valk - uL5 (Tabel 2). Sildade B1a ja B1b/c komponendid on otseselt seotud tRNA seondumissaitidega. Valkude uS13 ja uS19 C-terminaalsed pikendused (ingl *extensions*) interakteeruvad 40S subühikus vastavalt P-saidi tRNA ning A-saidi tRNA-ga. uS19 interakteerub lisaks veel mRNA-ga (Armache *et al.*, 2010; Budkevich *et al.*, 2011; Bulygin *et al.*, 2005; Khairulina *et al.*, 2010). 60S subühikus interakteeruvad P-saidi ja A-saidi tRNA-ga vastavalt valk uL5 ning A-saidi sõrme-element (Svidritskiy *et al.*, 2014). B1a ja B1b/c sillad on olulised edastamaks informatsiooni 40S subühiku dekodeerivast tsentrist 60S subühikusse ja translokatsiooni toimumiseks (Bowen *et al.*, 2015; Liu ja Fredrick, 2013; Rakaускаite ja Dinman, 2006; Sergiev *et al.*, 2005).

Sillad B4 ja B7b/c loovad kontaktid väikese ribosomaalse subühiku keha/platvormi elementide ja suure subühiku L1 kühmu vahel (Joonised 4, 5). Sild B4 on moodustunud väikese subühiku 18S rRNA heeliksi 20 ja valgu uS15 ning suure subühiku 25S rRNA heeliksi 34 ja valgu eL30 vahel. Sild B7b/c on aga moodustunud 18S rRNA heeliksi 24 ja suure subühiku valkude uL2 ning eL43 vahel (Tabel 2). Sildu B4 ja B7b/c moodustavad komponendid panustavad ka teiste subühikute vaheliste sildade moodustamisse. Näiteks on B7b/c silla moodustamisel osalev 18S rRNA heeliks 24 osa ka rRNA-rRNA sildadest B2a, B2b, B2c ja valk eL43 osaleb eukarüoodispetsiifilise silla eB8 moodustamisel (Tabelid 1, 3). B4 silla moodustamisel osalev valk uS15 interakteerub aga valguga eS7, mis on eB12 silla komponent. B4 ja B7b/c sildade olulisus seisneb ribosoomi pöörleva staadiumi regulatsioonis (Bock *et al.*, 2015; Liu ja Fredrick, 2013; Musalgaonkar *et al.*, 2014).

Tabel 1. *S. cerevisiae* ribosoomi rRNA-rRNA interaktsioone sisaldavate subühikute vahelised sildade komponendid. Sildade ja sillakomponentide nimetused ning interaktsioonide hulk (Ben-Shem *et al.*, 2011; Poirot ja Timsit, 2016).

Sild	Pre-translokatsiooniliselt			Post-translokatsiooniliselt		
	18S rRNA	25S rRNA	Kontaktide arv	18S rRNA	25S rRNA	Kontaktide arv
B2a	h24	H69	2	h24	H69	2
	h44	H69	11	h44	H69	11
	h45	H69	2	h45	H69	2
B2b	h24	H68	1	h24	H68	2
	h24	H70	2	h45	H70	1
	h45	H71	3	h45	H71	2
B2c	h24	H66	1	h24	H67	2
	h24	H67	3			
B3	h44	H62	1	h44	H62	1
	h44	H64	2	h44	H64	3
	h44	H70	14	h44	H70	14
B7a	h23	H68	3	h23	H68	2

Eraldi klastri moodustavad sillad B5, B6 ja B8, mis loovad subühikute vahelised kontaktid translatsiooniliste GTPaaside seondumissaitide lähedal (Joonised 4, 5). Sildade B5 ja B8 moodustamisel osalevad mõlema silla puhul väikesest subühikust 18S rRNA heeliks 14 ja suurest subühikust valk uL14. Silla B5 moodustamisse panustavad lisaks eelnevalt mainitule veel väikese subühiku heeliks 44 ja suure subühiku heeliks 62 (Tabel 2). Sillal B5 on ühisosa ka teise samasse klastrisse kuuluva sillaga, B6, mis on moodustunud väikese subühiku 18S rRNA heeliksi 44 ja suure subühiku valgu eL24 vahel (Tabel 2). Jagatud komponente on sildadel B5 ja B6 ka teiste sildadega. Näiteks panustab 18S rRNA heeliks 44 ka rRNA-rRNA sildade B2a ja B3 moodustamisse ning valk eL24 osaleb eukarüoodispetsiifilise silla eB13 moodustamisel (Tabelid 2, 3). B5, B6 ja B8 sildade olulisust on näidatud prokarüootses ribosoomis dekodeerimise täpsuse reguleerimisel (Sun *et al.*, 2011).

Tabel 2. *S. cerevisiae* ribosoomi rRNA- Valk, valk-Valk interaktsioone sisaldavate konserveerunud subühikute vaheliste sildade komponendid. Sildade ja sillakomponentide nimetused ning interaktsioonide hulk (Ben-Shem *et al.*, 2011; Poirot ja Timsit, 2016). Valkude nimetused on esitatud vastavalt Ban *et al.*, 2014 nomenklatuurile.

Sild	Pre-translokatsiooniliselt			Post-translokatsiooniliselt		
	40S	60S	Kontaktide arv	40S	60S	Kontaktide arv
B1a	h33	H38	1	-	-	-
	uS19	H38	2			
B1b/c	uS13	uL5	2	uS13	uL5	2
	uS19	uL5	6	uS19	uL5	5
B4	h20	H34	6	h20	H34	7
	uS15	H34	1	uS15	H34	5
	uS15	eL30	1			
B5	h44	H62	1	h44	H62	2
	h14	uL14	1	h14	uL14	1
	h44	uL14	4	h44	uL14	4
B6	h44	eL24	2	h44	eL24	2
B7b/c	h24	uL2	6	h24	uL2	4
	h24	eL43	1	h24	eL43	4
				h27	eL43	1
B8	h14	uL14	4	h14	uL14	5

S. cerevisiae ribosoomi seitsmeteistkümnest subühikute vahelisest sillast viis on omased ainult eukarüootsele ribosoomile ehk on eukarüoodispetsiifilised (Joonised 4, 5). Nende sildade komponentideks on valdavalt eukarüootidele spetsiifilised r-valgud ja rRNA-de lisasegmendid (ingl *extension segments*) (ES), mis prokarüootides puuduvad (Tabel 3). Eukarüoodispetsiifilistest subühikute vahelistest sildadest neli - eB8, eB11, eB12 ja eB13 – asuvad subühikute vahelise kokkupuutepinna ääreregioonides, kus ribosomaalsete subühikute omavaheline suhteline liikumine on kõige ulatuslikum (Joonised 4, 5). Viiest sillast viimane, eB14, asub ainsana staatilisemas regioonis - ribosoomi südamikus (ingl *core*).

eB8 moodustub suurest ribosomaalsest subühikust 25S rRNA heeliksi 79 eukarüoodispetsiifilise segmendi ES31L ja väikesest subühikust valgu eS1 vahel (Tabel 3). Post-translokatsioonilises konformatsioonis lisanduvad kontaktid valkude eL43 ja eS1 vahel. Silla eB8 suure subühiku poolne valguline komponent, eL43, seob silla valgu eL8 kaudu ka lähedalasuva L1 kühmuga (Poirot *et al.*, 2016). Lisaks on valgu eL43 kaudu sillal eB8 ühisosa

ka konserveerunud sillaga B7b/c. eB8 väikese subühiku poolne komponent, eS1, paikneb platvormi domeeni äärel, interakteerudes seejuures mRNA väljumiskanalit moodustavate komponentide - 18S rRNA heeliksiga 26 ja valkudega eS26 ning uS11 (Ben-Shem *et al.*, 2011; Poirot *et al.*, 2016). Lisaks on ristsidumise (ingl *cross-linking*) katsetega leitud interaktsioon hepatiidiviirus C (ingl *hepatitis C virus*) (HCV) sisemise ribosoomi sisenemise saidi (ingl *internal ribosome entry site*) (IRES) ja valgu eS1 vahel (Babaylova *et al.*, 2009). On huvitav, et silla eB8 moodustamises osalev 25S rRNA heeliks 79 stäkkub (ingl *stacks*) L1 kühmu kandva heeliksiga 76, seega võib sild eB8 olla oluline näiteks L1 kühmu asukohta mõjutava translokatsiooniprotsessi kontrollis (Spahn *et al.*, 2001).

Tabel 3. *S. cerevisiae* ribosoomi subühikute vaheliste eukarüoodispetsiifiliste sildade komponendid. Sildade ja sillakomponentide nimetused ning interaktsioonide hulk (Ben-Shem *et al.*, 2011; Poirot ja Timsit, 2016). Valkude nimetused on esitatud vastavalt Ban *et al.*, 2014 nomenklatuurile.

Sild	Pre-translokatsiooniliselt			Post-translokatsiooniliselt		
	40S	60S	Kontaktide arv	40S	60S	Kontaktide arv
eB8	eS1	eS31L	2	eS1	ES31L	2
				eS1	eL43	2
eB11	eS8	H63	1	eS8	eS41L	5
	eS8	ES41L	6			
eB12	ES6S	eL19	13	ES6S	eL19	14
	uS17	eL19	3	eS7	eL19	2
eB13	eS6	eL3	3	h6	uL3	1
	eS6	eL24	8	ES3S	eL24	6
				ES12S	eL24	3
				eS6	uL3	2
				eS6	eL24	11
eB14	h27	eL41	10	h27	eL41	10
	h44	eL41	4	h44	eL41	5
	h45	eL41	14	h45	eL41	14

Sild eB11 moodustub 60S subühiku 25S rRNA heeliksi 101 eukarüoodispetsiifilise pikendussegmendi ES41L ja 40S valgu eS8 vahel (Tabel 3). Pre-translokatsioonilises konformatsioonis osaleb silla moodustamisel veel 25S rRNA heeliks 63, mis loob samuti kontakti valguga eS8. Valk eS8, asudes väikese subühiku vasaku jala elemendi piirkonnas, interakteerub lähedalasuva valguga uS17, mis osaleb eukarüootse silla eB12 moodustamises

(Tabel 3) (Poirot *et al.*, 2016). Lisaks sellele interakteeruvad sildade eB11 ja eB12 komponendid - 25S rRNA heeliks 63 ja valk eL19 - ka suures subühikus (Ben-Shem *et al.*, 2011). Seega on sillad eB11 ja eB12 justkui omavahel ühendatud.

Eukarüootse ribosoomi suure subühiku omapäraks on kahe pika valgulise heeliksi väljaulatumine subühiku külgedelt (Joonis 5). Need C-terminaalsed α -heeliksid, mis on eukarüoodispetsiifilisteks pikendusteks r-valkudele eL19 ja eL24, moodustavad vastavalt subühikute vahelised sillad eB12 ning eB13. eB12 silla peamine komponent, r-valk eL19 saab alguse suure ribosomaalse subühiku E-saidist ja interakteerub väikese subühiku 18S rRNA pikendussegmentiga ES6S (Tabel 3, Joonised 4, 5). Lisaks on sillal eB12 pre-translokatsioonilises staadiumis lisainteraktsioonid eL19 C-terminaalse α -heeliksi ja valgu uS17 vahel. Post-translokatsioonilises staadiumis asendub aga interaktsioon valguga uS17 interaktsiooniga valgu eS7-ga (Tabel 3). eB12 komponendi uS17 kaudu on sillal interaktsioonid ka konserveerunud sillaga B4 (komponendi uS15 kaudu) ja eukarüootsete sillaga eB11 (komponendi eS8 kaudu) (Tabelid 2, 3). Silla eB12 olulisust on näidatud ribosomaalsete subühikute stabiilsel seondumisel 80S ribosoomiks *in vitro* (Kisly *et al.*, 2016). Nimelt ei ole 60S subühikud, milles on puudu valgu eL19 C-terminaalse α -heeliksi eB12 silda moodustav osa (Δ eB12), võimelised *in vitro* re-assotsiatsioonikatses 80S ribosoomi moodustama (Kisly *et al.*, 2016). Lisaks sellele on eB12 silla deletsioonimutandil aeglasem kasvufenotüüp, muutunud tundlikkus/resistentsus translatsioonilistele inhibiitoritele ja suurenenud vastupidavus hüperosmootsele stressile (Kisly *et al.*, 2016).

Silla eB13 peamine komponent, eL24, pikeneb suure ribosomaalse subühiku A-saidist ja interakteerub väikese subühikuga valgu eS6 kaudu (Tabel 3, Joonis 5). Pre-translokatsioonilises staadiumis assisteerivad interaktsiooni veel valgu eS6 kontaktid suure subühiku valguga uL3, millele lisanduvad post-translokatsioonilises staadiumis veel valgu uL3 kontakt 18S rRNA heeliksiga 6. Lisaks on post-translokatsioonilises staadiumis tuvastatavad kontaktid valgu eL24 ja 18S rRNA pikendussegmentide ES3S ning ES12S vahel. Kahjuks ei ole eL24 mittetäieliku struktuuri tõttu interaktsioonid 18S rRNA-ga nähtavad pre-translokatsioonilises staadiumis (Ben-Shem *et al.*, 2011). Sild eB13 on oluline 80S ribosoomi moodustamiseks ja omab rolli nii translatsiooni initsiatsiooni kui ka elongatsiooni stimuleerimises (Kisly *et al.*, 2019).

Sild eB14 erineb teistest eukarüoodispetsiifilistest subühikute vahelistest sildadest asudes ainsana ribosoomi südamikpiirkonnas (ingl *core region*) (Joonised 4, 5). eB14 loob kontaktid 40S subühiku dekodeeriva tsentri ja 60S subühiku konserveerunud rRNA südamiku läheduses

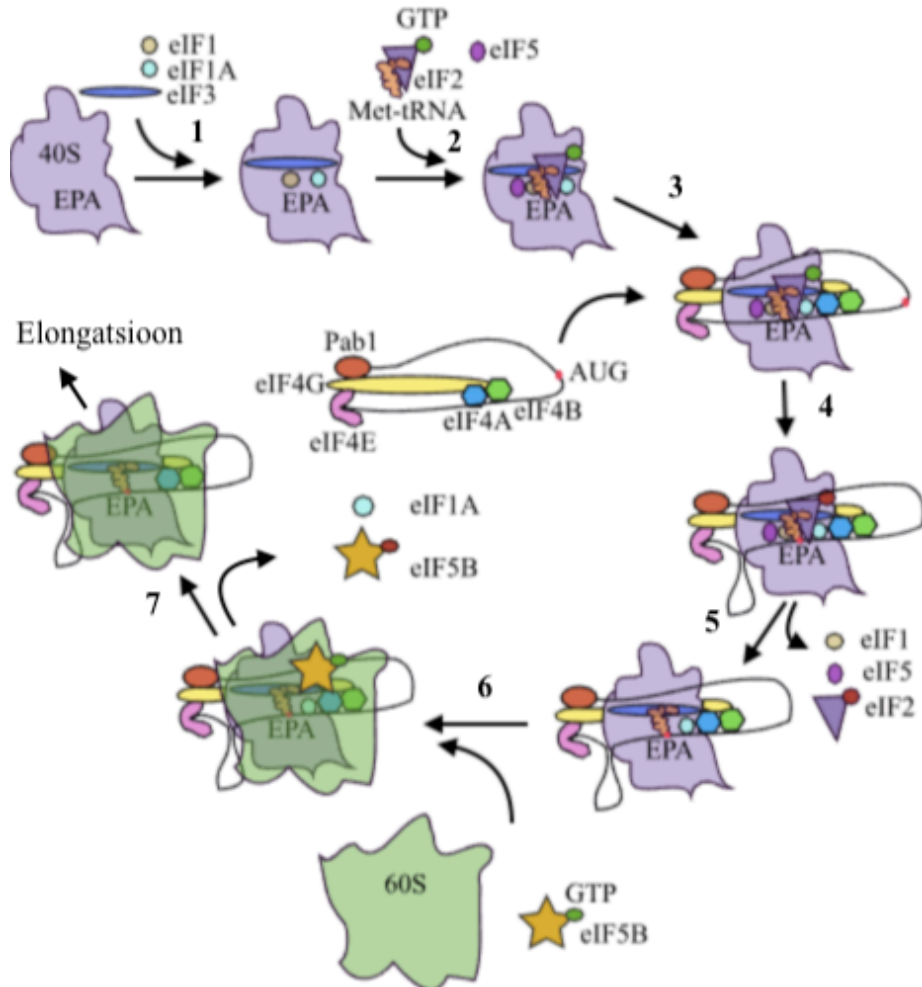
(Ben-Shem *et al.*, 2011). Täpsemalt moodustub eB14 18S rRNA heeliksite 27, 44, 45 ja suure ribosomaalse subühiku väikseima r-valgu, eL41, vahel (Tabel 3). Huvitavalt on r-valk eL41 ribosoomi väikese subühikuga tugevamalt seotud kui suure subühikuga. Nimelt interakteeruvad eL41 25-st aminohappest 18 väikese ja ainult 2 suure ribosomaalse subühikuga (Ben-Shem *et al.*, 2011). Kuna eB14 valgulise komponendi, eL41 deletsiooni tulemusena vähenevad vähesel määral translatsiooni täpsus ja peptidüültransferaasne aktiivsus, siis silla eB14 olulisus võib seisneda ribosoomi funktsionaalsuse peenhäälestamisel (Dresios *et al.*, 2003; Meskauskas *et al.*, 2003).

1.2. Ülevaade eukarüootsest translatsioonist

Valkude biosünteesi ehk translatsiooni käigus dekodeeritakse mRNA nukleotiidne järjestus valgu aminohappeliseks järjestuseks. Seejuures on translatsiooni puhul tegemist tsüklilise protsessiga, mille iga tsükel on jagatav nelja erinevasse faasi: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosoomi taaskasutus (ingl *recycling*) (Agirrezabala ja Frank, 2009). Nende faaside kooskõlastatud määrab valgusünteesi ja valkude voltumise efektiivsuse ning kvaliteedi.

1.2.1. Translatsiooni initsiatsioon

Translatsiooni initsiatsioon algab ternaarse kompleksi (ingl *ternary complex*) (TC) tekkega, mil GTP-seondunud eIF2 assotsieerub Met-tRNA^{Met}-ga (Kapp ja Lorsch, 2004). Kuna eIF2 on stabiilses olekus seondunud GDP-ga, tuleb TC moodustumiseks eIF2·GDP esmalt guaniini nukleotiidi väljavahetava faktori (ingl *guanine nucleotide exchange factor*) (GEF) poolt aktiveerida eIF2·GTP-ks (Pavitt *et al.*, 1998). Tekkinud ternaarne kompleks seondub seejärel koos kompleksi stabiliseeriva eIF5-ga väikesele ribosomaalsele subühikule, mille tulemusena moodustub 43S pre-initsiatsioonikompleks (ingl *preinitiation complex*) (PIC) (Joonis 6, etapp 2) (Jennings *et al.*, 2017).



Joonis 6. Eukarüootse translatsiooni initsiatsiooni mudel. (1) Faktorite eIF1, eIF1A ja eIF3 seondumine 40S subühikule. (2) Ternaarse kompleksi seondumine 40S subühikule. (3) mRNA aktivatsioon eIF3F kompleksi poolt ja sellele järgnev seondumine 43S preinitsiatsiooni kompleksile. (4) mRNA skaneerimine. (5) Start-koodoni äratundmine ja faktorite eIF1, eIF2 ning eIF5 dissotsieerumine. (6) Faktori eIF5B poolt soodustatud 60S subühiku seondumine. (7) Faktorite eIF1A ja eIF5B dissotsieerumine. Faktorite eIF4F ja eIF3 dissotsieerumist ei ole näidatud. Joonis kohandatud (Merrick ja Pavitt, 2018).

Ternaarse kompleksi seondumise väikesele ribosomaalsele subühikule teevad võimalikuks faktorite eIF1, eIF1A ja eIF3 kooperatiivsest seondumisest põhjustatud konformatsioonilised muutused, mille käigus toimub subühiku pea elemendi pööramine (Joonis 6, etapp 1) (Passmore *et al.*, 2007; Sokabe ja Fraser, 2014). eIF1 ja eIF1A seonduvad väikese subühiku platvormi elemendiga, vastavalt P- ja A-saidi lähedale (Aylett *et al.*, 2015). eIF3 seondub väikese subühikuga solvendipoolselt küljelt selliselt, et interakteerub nii mRNA sisenemise kanali/A-saidi kui ka väljumise kanaliga/E-saidiga (Aitken *et al.*, 2016; Aylett *et al.*, 2015; Llacer *et al.*, 2015). Lisaks ternaarse kompleksi seondumise võimaldamisele avaneb subühiku

pea elemendi pööramisega pea ja platvormi elementide vahel pilu, mis on oluline järgneva mRNA seondumiseks (Llacer *et al.*, 2015).

mRNA tuuakse väikese ribosomaalse subühiku avatud mRNA kanalis läbi aktivatsiooni. mRNA-d aktiveeritakse eIF4F seondumisega 5'-7-metüülguanosiin-cap (m⁷G-cap) struktuurile ja polü(A) seonduva valguga 1 (ingl *poly(A) binding protein 1*) (Pab1) seondumisega 3'-polü(A) struktuurile (Joonis 6, etapp 3) (Jackson *et al.*, 2010). eIF4F kompleks koosneb neljast faktorist: eIF4A, eIF4B, eIF4E ja eIF4G (Jackson *et al.*, 2010). mRNA-de laadimine väikesele subühikule algab 5'-cap struktuuri sisaldavate mRNA-de äratundmisega cap-seonduva eIF4E poolt (O'Leary *et al.*, 2013). Faktor eIF4G, omades seondumissaite nii eIF4E-le kui ka Pab1-le, tsirkulariseerib mRNA ja moodustab seeläbi mRNA „suletud ringi“ (Archer *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 1998). eIF4A on eIF4B poolt stimuleeritav ATP-sõltuv RNA helikaas, mis eemaldab mRNA 5'-otsast sellega seondunud valgud ja harutab lahti mRNA sekundaarstruktuurid (Merrick ja Pavitt, 2018; Rozen *et al.*, 1990). Faktorite eIF3, eIF5, eIF4B ja eIF4G vahendusel kinnitatakse tsirkulariseeritud mRNA 43S pre-initsiatsioonikompleksile, mille tulemusena moodustub 48S pre-initsiatsioonikompleks (Joonis 6, etapp 3) (Dever *et al.*, 2016).

48S pre-initsiatsioonikompleks skaneerib mRNA 5'-mittetransleeritavat ala (ingl *untranslated region*) (UTR) otsides sobivas kontekstis start-koodoni stabiilse mRNA koodon-Met-tRNA_i^{Met} antikoodon interaktsiooni jaoks (Joonis 6, etapp 4) (Cigan, *et al.*, 1988). Start-koodoni äratundmisel, mil toimub korrektne paardumine mRNA start-koodoni ja P-saiti seondunud Met-tRNA_i^{Met} vahel, läheb „avatud“ skaneerimise vorm üle „suletud“ kompleksiks (Merrick ja Pavitt, 2018). Üleminekul „suletud“ kompleksiks toimub väikese subühiku pea elemendi tagasipööramine, mis fikseerib 48S pre-initsiatsioonikompleksi start-koodonile ja hoiab ära edasise skaneerimise (Hussain *et al.*, 2014; Llacer *et al.*, 2015). Skaneerimise käigus hüdrolyüsatakse eIF2-ga seondunud GTP GDP+P_i-ks, kuid P_i vabastatakse alles start-koodoni äratundmisel (Algire *et al.*, 2005; Majumdar ja Maitra, 2005). GTP hüdrolyüsi järgselt omab eIF2·GDP madalat afiinsust Met-tRNA_i^{Met}-le, mis võimaldab faktori vabastamist 48S kompleksist (Algire *et al.*, 2005). Koos eIF2-ga vabastatakse väikeselt subühikult nii eIF1 kui ka eIF5 (Joonis 6, etapp 5) (Jennings *et al.*, 2017; Kapp ja Horsch, 2004; Unbehaun *et al.*, 2004).

Nimetatud faktorite vabastamine väikeselt ribosomaalselt subühikult avab pinna eIF5B·GTP seondumiseks (Yamamoto *et al.*, 2014). eIF5B stabiliseerib P-saidi start-koodoni ja initsiaator-tRNA vahelisi interaktsioone ning viib läbi 60S subühiku ühinemise 48S pre-

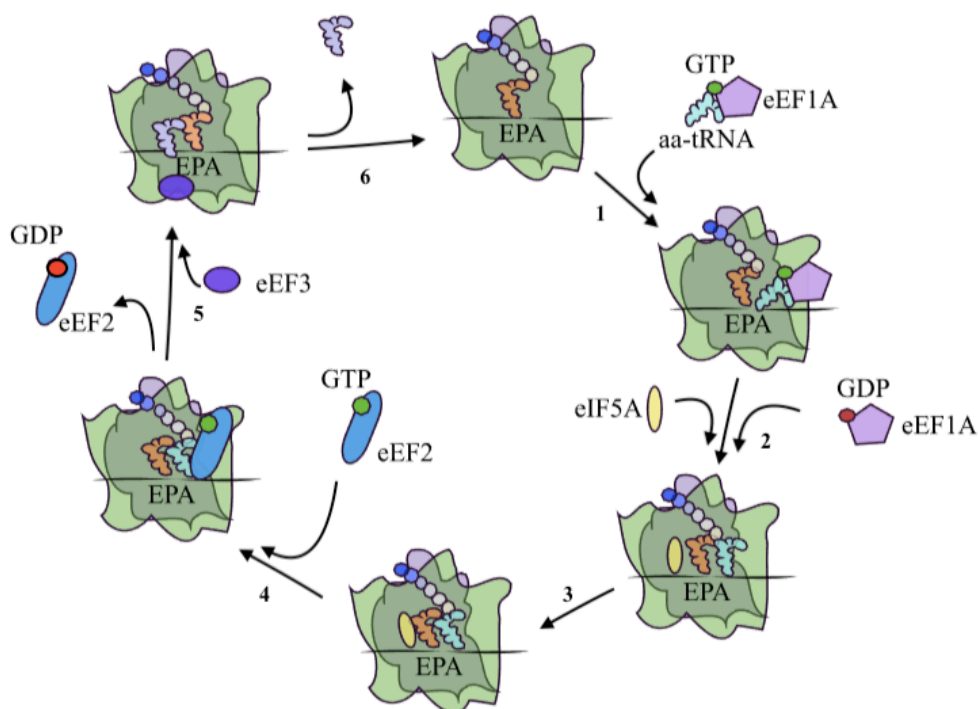
initsiatsioonikompleksiga (Joonis 6, etapp 6) (Yamamoto *et al.*, 2014). GTP hüdroolüüs ja sellele järgnev eIF5B·GDP ja eIF1A vabastamine võimaldab 80S ribosoomi moodustumise (Joonis 6, etapp 7) (Merrick ja Pavitt, 2018). Arvatakse, et eIF3 jääb 80S ribosoomiga seotuks nii subühikute ühinemisel kui ka mõneks järgnevaiks elongatsioonitsükliks (Valasek *et al.*, 2017). Translatsiooni initsiatsiooni tulemusena moodustub 80S ribosoom, mille P-saidis on omavahel paardunud mRNA start-koodon ja Met-tRNA_i^{Met} antikoodon ning A-sait on vaba aminoatsüül-tRNA aktsepteerimiseks.

Selles peatükis kirjeldatud protsess on tuntud kui 5'-cap struktuurist sõltuv translatsiooni initsiatsioon, mis on eukarüootsetes rakkudes põhiline translatsiooni initsiatsiooni viis.

1.2.2. Translatsiooni elongatsioon

Translatsiooni elongatsioon algab aminoatsüül-tRNA-de toomisega 80S ribosoomi vabasse A-saiti. Ribosoomi A-saiti tuuakse aminoatsüül-tRNA-d GTP-seondunud elongatsioonifaktor eEF1A poolt (Joonis 7, etapp 1) (Dever *et al.*, 2018). A-saidis fikseerib 18S rRNA heeliksi 18 nukleotiidi G577 koodon-antikoodon heeliksi ribosoomi dekodeerivasse tsentrisse, misjärel heeliksi 44 nukleotiidiidid A1755 ning A1756 interakteeruvad tekkinud dupleksi kahe esimese koodonipaariga (Shao *et al.*, 2016). mRNA koodoni ja aminoatsüül-tRNA antikoodoni korrektsel paardumisel hüdroolüüsitakse eEF1A-ga seondunud GTP, mille järel eEF1A·GDP ribosoomilt dissotsieerub (Joonis 7, etapp 2) (Shao *et al.*, 2016). Dissotsieerunud eEF1A·GDP aktiveeritakse taaskasutuseks nukleotiidi väljavahetamise faktori eEF1B poolt taas GTP-seondunud vormi (Gromadski *et al.*, 2007).

eEF1A küljest vabanenud aminoatsüül-tRNA 3' aktseptorõlg liigub seejärel ribosoomi suure subühiku peptidüültransferaasesse tsentrisse, kus aminoatsüül-tRNA α -aminorühm reageerib peptidüül-tRNA karbonüülse süsinikuga, moodustub peptiidside (Joonis 7, etapp 3) (Rodnina *et al.*, 2007). Peptiidside tekkimisel kantakse vabanenud peptiidahel P-saidis olevalt peptidüül-tRNA-lt A-saidis olevale aminoatsüül-tRNA-le, mille tulemusena jääb P-saiti deatsetüül-tRNA ja A-saiti ühe aminohappe võrra pikem peptidüül-tRNA (Rodnina *et al.*, 2007). Peptiidside moodustumisele aitab kaasa ka E-saiti seondunud eIF5A, mis interakteerub peptidüül-tRNA aktseptorõlaga orienteerides seda peptiidside teke reaktsiooni soosivasse asendisse (Joonis 7, etapp 2) (Shin *et al.*, 2017).



Joonis 7. Eukariootse translatsiooni elongatsiooni mudel. (1) Aminoatsüül-tRNA ribosoomile toomine faktori eEF1A poolt. (2) Aminoatsüül-tRNA seondumine ribosoomi A-saiti, faktori eEF1A dissotsieerumine. (3) Peptiidsideme süntees. (4) eEF2 seondumine. (5) Translokatsiooni toimumine, faktori eEF2 dissotsieerumine, eEF3 seondumine. (6) Faktori eEF3 poolt soodustatud tRNA vabastamine ribosoomi E-saidist. Faktorite EIF5A ja eEF3 dissotsieerumine pole näidatud. Joonis kohandatud (Dever *et al.*, 2018).

Peptiidsideme moodustumise järel toimub tRNA-de translokatsioon, mille käigus vabastatakse ribosoomi A-sait järgmise aminoatsüül-tRNA seundumiseks. tRNA-de translokatsioon toimub koos väikese ribosomaalse subühiku võnkumisega (ingl *oscillation*) roteerunud ja mitteroteerunud staadiumite vahel (Moazed ja Noller, 1989). Roteerunud staadiumis, milles väike ribosomaalne subühik on suure subühiku suhtes $\sim 5^\circ$ võrra vastupäeva pööratud, liiguvad tRNA-de aktseptorotsad suure subühiku suhtes P-saidist E-saiti ja A-saidist P-saiti (Budkevich *et al.*, 2011). tRNA-de antikoodon-struktuurid jäävad esialgu vastavalt väikese subühiku P- ja A-saidiga seotuks (Budkevich *et al.*, 2011). Sellist tRNA-de asetust ribosoomis nimetatakse hübriidolekuks (Ratje *et al.*, 2010). Väikese ribosomaalse subühiku roteerunud olekus seondub ribosoomi A-saiti eEF2-GTP, mis kutsub esile väikese ribosomaalse subühiku täiendava, $\sim 3^\circ$ vastupäeva pööramise ja suure subühiku L1 kühmu paigutumise ribosomaalsete subühikute vahelisse ruumi (Joonis 7, etapp 4) (Tourigny *et al.*, 2013). Subühikute vahelisse ruumi suunatud positsioonis loob L1 kühm stabiliseerivad kontaktid E-/P-hübriidolekus oleva tRNA-

ga (Tourigny *et al.*, 2013). Lisaks algatab eEF2·GTP seondumine väikese ribosomaalse subühiku pea elemendi $\sim 4^\circ$ vastupäeva pööramise (Ratje *et al.*, 2010). Väikese subühiku tagasiroteerumisel aitab eEF2-ga seotud GTP hüdroolüüsil vabanev energia „lahti lukustada“ 18S rRNA heeliksi 44 nukleotiidide ja koodon-antikoodon dupleksi vahelise dekodeeriva interaktsiooni (Taylor *et al.*, 2007). GDP-seondunud eEF2 vabaneb ribosoomilt ja võimaldab väikese subühiku pea elemendi tagasipööramise (Joonis 7, etapp 5) (Taylor *et al.*, 2007). See omakorda põhjustab tRNA-de antikoodon-struktuuride lõpliku translokatsiooni vastavalt E- ja P-saiti (Ratje *et al.*, 2010). Translokatsioonijärgselt paikneb ribosoomi E-saidis deatsetüleeritud tRNA, P-saidis peptidüül-tRNA ja translokatsiooni käigus vabastatud A-sait on valmis järgmise aminoatsüül-tRNA seondumiseks (Noller *et al.*, 2017). Deatsetüleeritud tRNA vabastamisele aitab *S. cerevisiae* ribosoomis kaasa E-saidi lähedal paiknev ATP-seondunud eEF3 (Joonis 7, etapp 6) (Andersen *et al.*, 2006).

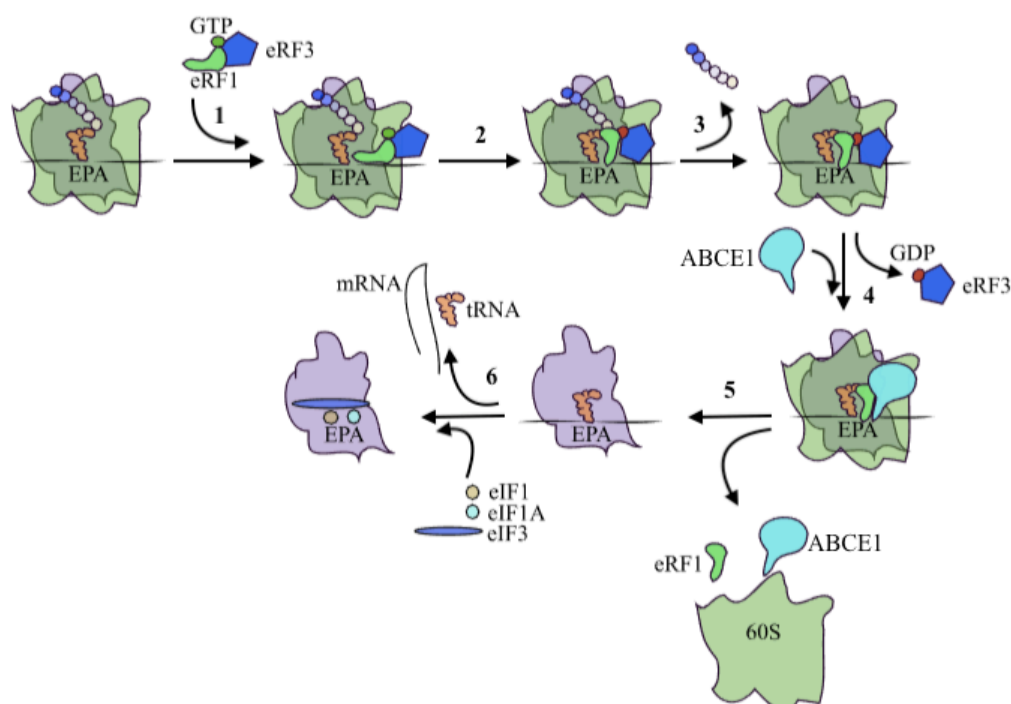
Elongatsioonitsükli etappe – dekodeerimist, peptiidahela ülekannet ja translokatsiooni – korratakse seni kuni kogu mRNA järjestus on dekodeeritud ning väikese ribosomaalse subühiku dekodeeriv tšenter tunneb ära translatsiooni terminatsiooni määrava koodoni.

1.2.3. Translatsiooni terminatsioon ja ribosoomi subühikute taaskasutus

Translatsiooni terminatsioon algatatakse terminatsiooni määrava stop-koodoni (UAA, UAG, UGA) äratundmisel ribosoomi A-saidis (McCaughan *et al.*, 1995). Terminatsiooni toimumist vahendavad vabastusfaktorid (ingl *release factors*) eRF1 ja eRF3 (Joonis 8, etapp 1) (Zhouravleva *et al.*, 1995). Faktoril eRF1 on kolm domeeni: N-terminaalne domeen, mis on vastutav stop-koodoni äratundmise eest; keskmine domeen, mis sisaldades GGQ motiivi, kutsub esile vastsünteesitud polüpeptiidi vabastamise peptidüül-tRNA-lt ja C-terminaalne domeen, mis seondumissaidiks GTP-seondunud eRF3-le (Bertram *et al.*, 2000; Frolova *et al.*, 1996; Frolova *et al.*, 1999).

Stop-koodoni äratundmisel hüdroolüüsitakse eRF3-ga seondunud GTP, mille tulemusena muutub eRF3-ga seotud faktori eRF1 konformatsioon, mis omakorda võimaldab katalüütilisel GGQ motiivil sattuda peptidüültransferaasesse tsentrisse (Joonis 8, etapp 2) (Preis *et al.*, 2014). GGQ sattumine PTC-sse kutsub esile järjekordse konformatsioonilise muutuse, mille tagajärjel paljastub vee nukleofiilsele rünnakule esterside, mis ühendab P-saidis paiknevat peptidüül-tRNA-d sünteesitud polüpeptiidiga (Jin *et al.*, 2010). Sellega soodustatakse

vastsünteesitud polüpeptiidi lõikamist ja sellele järgnevat ribosoomilt vabastamist (Joonis 8, etapp 3) (Hellen, 2018).



Joonis 8. Eukariootse translatsiooni terminatsiooni ja ribosoomi subühikute taaskasutuse mudel. (1) Faktorite eRF1 ja eRF3 seondumine ribosoomile. (2) Stop-koodoni äratundmine, faktoriga eRF3 seotud GTP hüdrolüüs. (3) Sünteesitud peptiidi vabastamine ribosoomilt. (4) Faktori eRF3 dissotsieerumine, faktori ABCE1 seondumine. (5) ABCE1, eRF1 ja 60S subühiku dissotsieerumine. (6) Faktorite eIF1, eIF1A ja eIF3 seondumine; mRNA ja deatsetüleeritud tRNA vabastamine. Joonis kohandatud (Dever ja Green, 2012; Hellen *et al.*, 2018).

Terminatsioonijärgne ribosoomi subühikute taaskasutamine algatatakse ABCE1 seondumisega ribosomaalsete subühikute vahelisse ruumi (Joonis 8, etapp 4) (Hellen, 2018). Ribosoomi subühikute dissotsiatsioon toimub kahes faasis. Esimeses faasis loob ABCE1 klasterdomeeni FeS kaudu kontakti A-saidis paikneva eRF1-ga ning lükkab vabastusfaktori subühikute vahelise ruumi (Barthelme *et al.*, 2011). Selle käigus käitub eRF1 justkui „molekulaarne kiil“ (ingl *molecular wedge*) destabiliseerides subühikute vahelisi sildasid (Heuer *et al.*, 2017). Teises faasis, kui 60S subühik on „lahtilukustatud“, loob FeS klasterdomeen uued interaktsioonid 40S subühiku heeliksi 44 lähedal, takistades sellega 60S-i reassotsiatsiooni steeriliselt ja konkreetsemalt ka konserveerunud silla B5 moodustumist (Heuer *et al.*, 2017). Valgu ABCE1 väikeselt subühikult vabanemise ajastus ei ole teada. ABCE1 kas vabaneb 40S-

It peale 60S subühiku dissotsiatsiooni või alternatiivse mudeli kohaselt jääb 40S-iga seotuks ning stimuleerib edasist initsiatsioonifaktorite seondumist (Joonis 8, etapp 5) (Pisarev *et al.*, 2010; Heuer *et al.*, 2017; Hellen, 2018). Deatsetüleeritud tRNA ja mRNA, mis jäävad 40S subühikuga seotuks ka peale 60S lahkumist, vabastatakse initsiatsioonifaktori eIF1 seondumisel väikesele subühikule. eIF1 destabiliseerib P-saidis paikneva mitte-initsiaator tRNA seondumise, see omakorda viib ka mRNA vabastamiseni subühikult (Joonis 8, etapp 6) (Pisarev *et al.*, 2007; Pisarev *et al.*, 2010).

Sellele järgnevalt saavad ribosomaalsed subühikud alustada uue initsiatsioonifaasiga ja jätkata järgmise valgusünteesitsükliga.

1.3. IRES järjestused

Viirusinfektsioonide korral muutub eukarüootsetes rakkudes oluliseks translatsiooni initsiatsiooni alternatiivne viis. Oma valkude produtseerimiseks kaaperdavad (ingl *hijack*) viirused peremeesorganismi ribosoomid, kasutades selleks oma mRNA-des spetsiifilisi struktureeritud *cis*-toimivaid RNA järjestusi, mis on tuntud kui sisemised ribosoomi sisenemise saidid (ingl *internal ribosome entry sites*), IRES-ed (Filbin ja Kieft, 2009; Jackson *et al.*, 2010). Üldiselt mRNA-de 5'-mittetransleeritavas alas (ingl *untranslated region*) (UTR) paiknevad IRES järjestused võimaldavad viirustel elongatsioonikompetentsete ribosoomide assambleerimist 5'-cap- ja 3'-polü(A)-sõltumatul viisil, vajades selleks vähendatud koosseisus peremeesorganismi initsiatsioonifaktoreid, kui üldse (Yamamoto *et al.*, 2017). Vastavalt translatsiooni initseerimiseks vajaminevate faktorite hulgale jagatakse viiruselisi IRES-eid nelja erinevasse klassi: I-IV, milles klassi I kuuluvad IRES järjestused vajavad kõige enam initsiatsioonifaktoreid ning klassi IV kuuluvad IRES järjestused ei vaja neid üldse (Filbin ja Kieft, 2009).

Töö metoodikast lähtudes keskendutakse ainult klassi IV kuuluvale kilvide paralüüsi viiruse (ingl *cricket paralysis virus*) IGR IRES (CrPV IGR IRES) järjestusele ja sellelt lähtuvale translatsiooni initsiatsioonile.

1.3.1. CrPV IGR IRES struktuur

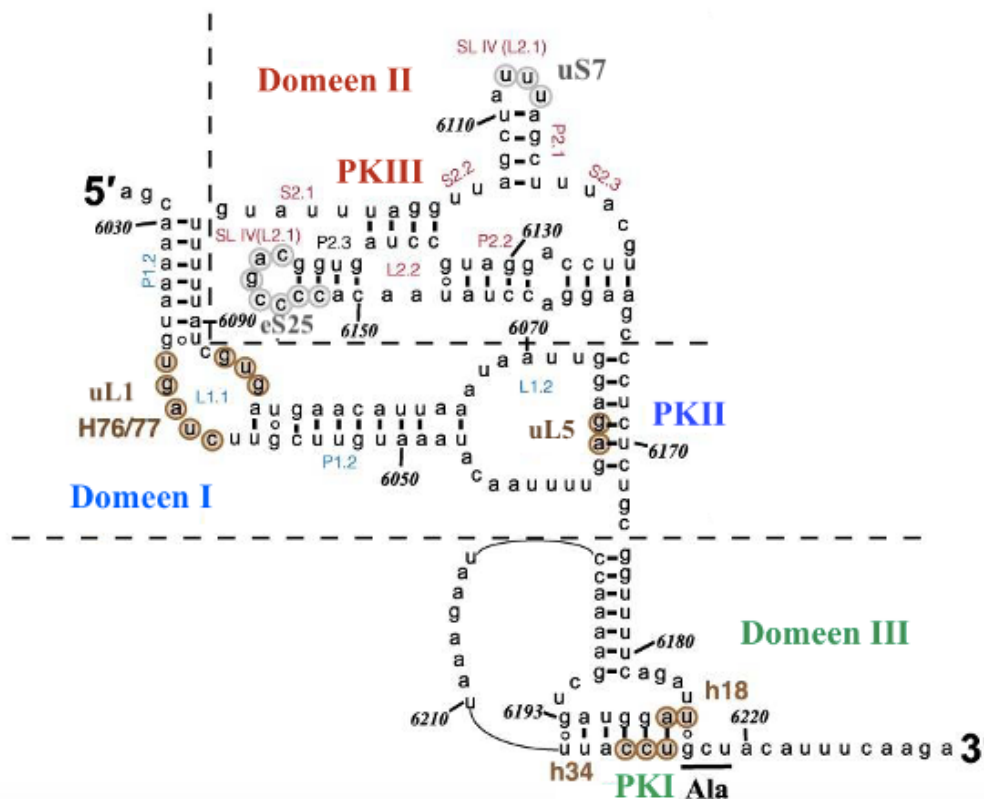
Klass IV IRES järjestused, mille näiteks ka kilvide paralüüsi viiruse (ingl *cricket paralysis virus*) IGR IRES on, ei vaja translatsiooni algatamiseks peremeesorganismi initsiatsioonifaktoreid (Wilson *et al.*, 2000a). Lisaks sellele on minetatud vajadus ka Met-

tRNA^{Met}-le, sest klass IV IRES-telt ei alga translatsioon kanooniliselt AUG koodonilt, vaidalaniini kodeerivalt GCU koodonilt (Murray *et al.*, 2016).

CrPV IGR IRES-e 188 nukleotiidist koosneva järjestuse kõrgelt konserveerunud sekundaarstruktuuris on eristatavad kolm domeeni, millest igaühes sisaldub üks pseudosõlm (ingl *pseudoknot*) struktuur (Kanamori ja Nakashima, 2001). Domeenid I ja II, mis sisaldavad vastavalt pseudosõlmehetked II (PKII) ja III (PKIII), voltuvad koos ning on olulised nii 40S kui ka 60S subühiku seondamisel (Costantino ja Kieft, 2005; Jan ja Sarnow, 2002). Nii PKII kui ka PKIII tüvivaas struktuuri katkestamine (ingl *disruption*) viib 40S subühiku seondamise afiinsuse neljakordsele langusele (Jan ja Sarnow, 2002).

Domeen III, mis sisaldab pseudosõlme I (PKI), paikneb vahetult kodeeriva järjestuse esimesest koodonist (GCU) ülesvoolu ja voltub eraldiseisvalt (Jan ja Sarnow, 2002; Muhs *et al.*, 2015). PKI tüvivaas struktuuri katkestamine ei vähenda ribosomaalse 40S subühiku seondamise afiinsust, vaid mõjutab eelkõige CrPV-IRES-e paiknemist ribosoomis (Jan ja Sarnow, 2002). Selle domeeni olulisus seisneb kodeeriva järjestuse algus-saidi asetamises ribosoomi dekodeerivasse tsentrisse ja ribosoomi ettevalmistamises (ingl *priming*) translatsiooni elongatsioonifaasiks, sest osa PKI struktuurist mimikeerib mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vahelist interaktsiooni (Costantino *et al.*, 2008; Jan ja Sarnow, 2002).

Katkestatud PKI, PKII või PKIII tüvivaas struktuuriga CrPV-IRES järjestused näitavad translatsioonilise aktiivsuse ligikaudu 90%-list langust (Jan ja Sarnow, 2002). Kompensatoorsed mutatsioonid, mis taastavad PKI, PKII või PKIII tüvivaas struktuurid tagavad translatsioonilise aktiivsuse, mis on vastavalt 50%, 25% ja 50% metsiktüübi CrPV-IRES-e translatsioonilisest aktiivsusest (Jan ja Sarnow, 2002). See näitab, et IRES-e aktiivsuseks ei ole vajalik mitte PK struktuuride täpne nukleotiidne järjestus, vaid nende struktuurne terviklikkus. Lisaks on uuritud CrPV-sarnaste viiruste seas kõrgelt konserveerunud nukleotiidide muteerimise mõju 40S subühikuga seondumisele ja translatsioonilisele aktiivsusele. Näiteks vähendavad PKIII kuuluvate nukleotiidide AUUU (6111-6114) ja CA (6142-6143) deletsioonmutatsioonid 40S subühikuga seondumist kaks korda ning CrPV-IRES järjestuselt lähtuva translatsiooni aktiivsust rohkem kui 90% võrra (Jan ja Sarnow, 2002). Samas PKIII konserveerunud AA (6151-6152) nukleotiidide muutmine UU nukleotiidideks ei oma efekti 40S seondumise afiinsusele, kuid vähendab translatsioonilist aktiivsust ligikaudu 75% võrra (Jan ja Sarnow, 2002).



Joonis 9. CrPV IGR IRES-e sekundaarstruktuur. CrPV IGR IRES-e domeenid I (sinine), II (punane) ja III (roheline), mis sisaldavad vastavalt pseudosõlmesid II (PKII), III (PKIII) ja I (PKI) on eraldatud punktiirjoonega. Domeenis III on must joon alla tõmmatud kodeeriva ala esimesele,alaniini kodeerivale GCU koodonile. Joonisel on tähistatud ka CrPV IGR IRES-e muud struktuursed elemendid: tüvi-aas struktuurid (ingl *stem loop*) (SL), aas-struktuurid (ingl *loop*) (L), üheaheelalised piirkonnad (ingl *single strand*) (S), paardunud piirkonnad (ingl *paired helix*) (P). Halli ja pruuni ringiga on ümbritsetud nukleotiidid, mis interakteeruvad vastavalt 40S ja 60S subühikuga. Vastava tooniga (hall või pruun) on kõrvale märgitud ka, missuguste subühiku heeliksiite ja/või valkudega vastav interaktsioon luuakse. Joonis kohandatud (Johnson *et al.*, 2017).

1.3.2. Ülevaade CrPV IRES järjestuse vahendatud translatsiooni initsiatsioonist

CrPV IRES järjestuse vahendatud translatsiooni initsiatsiooni esimeseks etapiks on IRES-e seondumine 40S ribosomaalse subühikuga (Joonis 10, etapp 1) (Jackson *et al.*, 2010). Selle seondumise toimumisel on olulised CrPV IRES-e PKIII-e kuuluvad kaks tüvi-aas (ingl *stem-loop*) (SL) struktuuri, SL-IV ja SL-V, mis loovad kontaktid 40S subühiku pea ja keha elementide vahelises pilus paikneva ribosoomivalgude klastriga, millesse kuuluvad eS25, eS28, uS7 ja uS11 (Fernandez *et al.*, 2014; Jan ja Sarnow, 2002). Paigutudes eelnimetatud pilusse, piiravad SL-IV ja SL-V aga 40S subühiku pea elemendi dünaamilisust, fikseerides selle konformatsiooni, milles pea element on sellega külgneva keha elemendi suhtes $\sim 8^\circ$ võrra

vastupäeva pööratud (Behrmann *et al.*, 2015). Pea elemendi niisugune konformatsioon kutsub esile mRNA sisenemise kanali avanemise, mis omakorda võimaldab CrPV-IRES-e PKI-l dekodeerivasse tsentrisse seonduda (Fernandez *et al.*, 2014). Dekodeerivas tsentris loovad 18S rRNA heeliksi 44 konserveerunud adeniinid 1753 ja 1754 kontaktid tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelist interaktsiooni mimikeerivate PKI aluspaaride 1 (BP1) (G6189:C6214) ja 2 (BP2) (G6188:C6215) A-minoorsete motiividega (Murray *et al.*, 2016). Aluspaaride 1, 2 ja mingil määral ka 3 (BP3) (A6187:U6216) Watson-Crick'i geomeetria jälgimisse panustavad ka teised ribosomaalsed komponendid, mille hulka kuuluvad 18S rRNA heeliksi 18 nukleotiidid C564 ja G576 ning ribosomaalse valguga uS12 aminohappejäägid P64 ja S66 (Murray *et al.*, 2016). Mutatsioonanalüüsist nähtub, et PKI aluspaare 1, 2 ja 3 moodustav pööratud kordusjärjestus on CrPV-IRES-e aktiivsuseks hädavajalik, kuid sellest madalamat aktiivsust on võimalised tagama ka teatud komplementaarsust säilitavad variatsioonid (Wilson *et al.*, 2000a; Wilson *et al.*, 2000b).

Vastusena komplementaarselt paardunuks tunnistatud PKI tRNA/mRNA interaktsiooni mimikrile kutsutakse esile dekodeerimisele vastav konformatsiooniline muutus, mis PKI A-saiti ankurdab (Murray *et al.*, 2016).

Lisaks on vaadeldud ka niinimetatud neljandat aluspaari (BP4), mis moodustub esimese transleeritava koodoni (GCU-alaniin) esimese positsiooni (G6217) ja 18S rRNA lämmastikaluse C1273 vahel (Murray *et al.*, 2016). On spekuleeritud, et lämmastikalus C1273 võib olla oluliseks reguleerivaks elementiks CrPV-IRES järjestusel täheldatud translatsiooni alternatiivse, +1 lugemisraami valikul mõjutades dünaamilise PKI-ga külgneva esimese koodoni konformatsiooni A-saidis (Murray *et al.*, 2016).

Edasist 60S subühiku seondumist ja 80S ribosoomi moodustumist soodustab nii 40S subühiku konformatsiooniliselt piiratud pea element kui ka CrPV-IRES-e PKII-e aas-struktuur L1.1, mis moodustab kontaktid 60S subühiku L1 kühmu valguga uL1 ja 28S rRNA heeliksiga 76-78 (Joonis 9; Joonis 10, etapp 2) (Fernandez *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2016).

Moodustunud CrPV IRES-80S kompleks on konformatsiooniliselt dünaamiline ja võngub (ingl *oscillates*) roteerunud ja mitte-roteerunud staadiumite vahel (Joonis 10, etapp 3) (Fernandez *et al.*, 2014). Kuivõrd ribosoomi A-sait on CrPV IRES-e PKI poolt hõivatud ja mRNA esimene transleeritav koodon, GCU, pseudosõlmest I allavoolu paikneb, ei ole võimalik ilma IRES-e eelneva translokatsioonita vastavalt koodonilt translatsiooni alustada (Fernandez *et al.*, 2014). Roteerunud staadiumis, milles 40S subühik on 60S subühiku suhtes $\sim 5^\circ$ võrra vastupäeva pööratud, on ka A-saiti ankurdatud PKI veidi P-saidi poole kallutatud ja mimikeerib tRNA-de

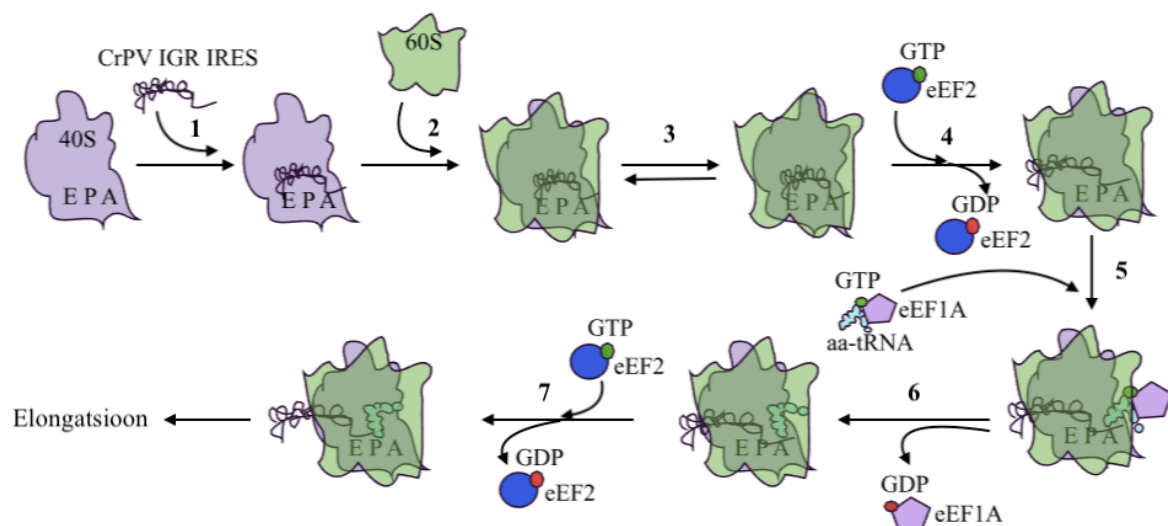
translokatsiooni hübriidolekut (Murray *et al.*, 2016). Selles staadiumis seondub ribosoomi A-saiti eEF2·GTP ja loob saidis paikneva PKI-ga tugeva interaktsiooni, mille tulemusena PKI veelgi enam ribosoomi P-saidi suunas nihkub (Joonis 10, etapp 4) (Murray *et al.*, 2016). Peale selle kutsub eEF2·GTP A-saiti seondumine esile väikese subühiku täiendava, $\sim 3^\circ$ vastupäeva pööramise ja L1 kühmu paigutumine ribosoomist välja (Brilot *et al.*, 2013). Kui eEF2·GTP seondumisel indutseeritav 40S subühiku pööramine on omane ka kanoonilisele tRNA-de translokatsioonile, siis L1 kühmu paigutumise suund ribosoomist välja on aga sellele vastupidine (Brilot *et al.*, 2013; Tourigny *et al.*, 2013). Ribosoomist väljapoole suunatud positsioonis loob L1 kühm stabiliseerivad kontaktid suure ribosomaalse subühiku valgu eL36 C-terminaalse domeeniga (Fernandez *et al.*, 2014).

Subühiku tagasi-roteerumine koos eEF2-ga seotud GTP hüdroolüüsil katkestatud SL-IV ja SL-V interaktsioonidega võimaldavad PKI translokatsiooni ribosoomi A-saidist P-saiti (Joonis 10, etapp 4) (Murray *et al.*, 2016). GTP hüdroolüüsi järgselt eEF2 dissotsieerub ja vabastab sellega esimese aminoatsüül-tRNA seondumiseks A-saidi (Pisareva *et al.*, 2018). Teine oluline ankurpunkt CrPV-IRES-e ribosoomile kinnitamisel, L1.1 element, aga säilitab oma kontaktid translokatsiooni käigus ribosoomist veelgi kaugemale välja lükatud L1 kühmuga (Murray *et al.*, 2016). Esimese translokatsiooni tulemusena tekkinud intermediaat on aga ebastabiilne ja võimeline tagasi translokeeruma, kui seda järgnevalt aminoatsüül-tRNA seondumisega ei stabiliseerita (Muhs *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2016). Kodeeriva ala esimesele koodonile, GCU-le, vastav aminoatsüül-tRNA tuuakse ribosoomi A-saiti eEF1A·Ala-tRNA^{Ala}·GTP ternaarse kompleksi koosseisus (Joonis 10, etapid 5 ja 6) (Petrov *et al.*, 2016). Seejärel on vajalik teise translokatsiooni toimumine, et liigutada PKI P-saidist E-saiti ja esimene aminoatsüül-tRNA A-saidist P-saiti (Muhs *et al.*, 2015).

Teine translokatsioon algatatakse sarnaselt esimesele translokatsioonile eEF2·GTP seondumisega roteerunud staadiumis 40S ribosomaalsele subühikule (Joonis 10, etapp 7) (Pisareva *et al.*, 2018). Selles staadiumis paiknevad nii PKI kui ka aminoatsüül-tRNA vastavalt E- ja P-saidi poole kaldu, taaskord niinimetatud tRNA-de hübriidolekus (Pisareva *et al.*, 2018). Seejuures kutsub eEF2·GTP seondumine aminoatsüül-tRNA poolt hõivatud A-saiti esile 40S subühiku pea elemendi veelgi tugevama vastupäeva pööramise (Abeyrathne *et al.*, 2016).

40S subühiku tagasi-roteerumisel viiakse eEF2-ga seotud GTP hüdroolüüsil lõpuni PKI ja aminoatsüül-tRNA translokatsioon vastavalt ribosoomi E- ja P-saitidesse (Joonis 10, etapp 7) (Pisareva *et al.*, 2018). Seejärel, eEF2-e ribosoomilt dissotsieerumisel, vabastatakse lisaks ribosoomi A-saidile ka fikseeringust 40S subühiku pea element ja algatatakse selle

tagasipöördumine (Pisareva *et al.*, 2018). See omakorda põhjustab CrPV-IRES-es konformatsioonilise muutuse, mille käigus assambleerub lahti (ingl *disassembles*) PKI esialgne struktuur (Pisareva *et al.*, 2018). Moodustub PKI*, milles antikoodoni tüvi-aas struktuuri sarnane segment relokeerub 60S ribosomaalse subühiku E-saiti, et mimikeerida kanoonilise E-saidi tRNA aktseptor-õlga (Pisareva *et al.*, 2018). Lahtiassambleerunud PKI* mRNA sarnane element jääb aga 40S subühiku E-saiti (Murray *et al.*, 2016). PKII ja PKIII jäävad seejuures assambleerituks, kuid nende suhteline kaugus üksteisest suureneb (Pisareva *et al.*, 2018). Samuti jääb CrPV-IRES-e L1.1 element 60S subühiku L1 kühmuga seotuks (Muhs *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2016). Kirjeldatud konformatsioonilised muudatused stabiliseerib CrPV-IRES-e taaskordne interaktsioon ribosomaalse valguga eS25, mis luuakse mitte enam IRES-e SL-V elemendi, vaid helikaalse segmendi poolt, mis hõlmab IRES-e jääke 6123-6127 ja 6159-6164 (Murray *et al.*, 2016; Pisareva *et al.*, 2018).



Joonis 10. CrPV IGR IRES vahendatud translatsiooni initsiatsiooni mudel. (1) CrPV IGR IRES-e seondumine 40S subühikule. **(2)** 60S subühiku seondumine, 80S ribosoomi moodustumine. **(3)** CrPV IRES-80S kompleksi võnkumine roteerunud ja mitte-roteerunud staadiumite vahel. **(4)** Esimese translokatsiooni toimumine faktori eEF2 vahendusel. **(5)** Aminoatsüül-tRNA ribosoomile toomine faktori eEF1A poolt. **(6)** Faktori eEF1A dissotsieerumine ribosoomilt. **(7)** Teise translokatsiooni toimumine faktori eEF2 vahendusel. Joonis kohandatud (Johnson *et al.*, 2017).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Eukarüoodispetsiifilise ribosoomi subühikute vaheline sild eB12 asub subühikute vahelise kokkupuutepinna ääreregioonis, kus ribosomaalsete subühikute suhteline liikumine on translatsiooni elongatsioonifaasis aset leidvas translokatsiooni protsessis kõige ulatuslikum. See lubab oletada, et viimane on ka CrPV IGR IRES järjestuse poolt vahendatud, kahte järjestikust translokatsiooni vajava, translatsiooni initsiatsiooni protsessis olulise tähtsusega. Käesoleva töö eemärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 puudumine 1) 5'-cap sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni; 2) CrPV IGR IRES-vahendatud translatsiooni ja 3) ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni CrPV IGR IRES-e järjestustel.

2.2. Materjal

2.2.1. *Escherichia coli* ja *Saccharomyces cerevisiae* tüved ja plasmiidid

Tabel 4. Töös kasutatud *Escherichia coli* ja *Saccharomyces cerevisiae* tüved.

Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r κ , m κ) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> TYSC309 (wt)	<i>MATa ura3-52 leu2</i> Δ 1 <i>his3</i> Δ 200 <i>trp1</i> Δ 36 Δ <i>arg4</i> Δ <i>lys1</i>	Tamm <i>et al.</i> , 2019
<i>S. cerevisiae</i> TYSC360 (Δ eB12)	<i>MATa ura3-52 leu2</i> Δ 1 <i>his3</i> Δ 200 <i>trp1</i> Δ 36 Δ <i>arg4</i> Δ <i>lys1</i> Δ <i>rpl19A::kanMX6</i> Δ <i>rpl19B::kanMX6</i> [<i>pRS315-rpl19</i> ₁₋₁₄₆]	Tamm <i>et al.</i> , 2019

Tabel 5. Töös kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Olulised järjestused	Allikas
pUC18 -Fluc	T7 promooteri kontrolli all reporteroperon, mis sisaldab <i>PGK1</i> 5'UTR-i, FLuc'i ja polü(A) saba kodeerivat järjestust	Kisly <i>et al.</i> , 2019
pSRT209	PGK1 promooteri kontrolli all reporteroperon, mis sisaldab RLuc'i, <i>wt</i> CrPV IGR-IRES-t ja FLuc'i kodeerivat järjestust	Landry <i>et al.</i> , 2009
pSRT210	PGK1 promooteri kontrolli all reporteroperon, mis sisaldab RLuc'i, CrPV IGR-IRES _{mut} ja FLuc'i kodeerivat järjestust	Landry <i>et al.</i> , 2009
pUC18-Fluc-RLuc	T7 promooteri kontrolli all reporter, mis sisaldab FLuc'i ja RLuc'i kodeerivat järjestust	Kisly <i>et al.</i> , 2019
pUC18-IGR-IRES (IGR IRES <i>wt</i>)	T7 promooteri kontrolli all <i>wt</i> CrPV IGR-IRES	TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool
pUC18-IGR-IRES-L1mut (IGR IRES L1 mut)	T7 promooteri kontrolli all mutantse L1.1 regiooniga CrPV IGR-IRES	TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool
pUC18-IGR-IRES-ΔPK (IGR IRES ΔPK)	T7 promooteri kontrolli all mutantsete PKI ja PKIII regioonidega CrPV IGR-IRES	TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool
pUC18-RLuc-IGR-IRES-FLuc (<i>wt</i> IGR IRES)	T7 promooteri kontrolli all reporteroperon, mis sisaldab <i>PGK1</i> 5'UTR-i, RLuc'i, <i>wt</i> CrPV IGR-IRES-t, FLuc'i ja polü(A) saba kodeerivat järjestust	Käesolev magistritöö
pUC18-RLuc-IGR-IRES _{mut} -FLuc (Mutantne IGR IRES)	T7 promooteri kontrolli all reporteroperon, mis sisaldab <i>PGK1</i> 5'UTR-i, RLuc'i, <i>wt</i> CrPV IGR-IRES _{mut} , FLuc'i ja polü(A) saba kodeerivat järjestust	Käesolev magistritöö

*Kõik plasmiidid sisaldavad bakterseliksiooniks vajalikku Amp^R geeni.

2.2.2. Söötmed ja puhvrid

Tabel 5. Rakukultuuride inkubeerimiseks kasutatud söötmed.

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	1,6% trüptoon, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Sambrook, Fritsch ja Maniatis, 1989
Luria-Betani (LB) agarsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar	Bertani, 1951

Plasmiidi selektsioonmarkerina lisati vedelsöötele antibiootikumi ampitsilliin (Amp) lõppkontsentratsioonis 100 µg/ml. Tardsöötele lisati plasmiidi selektsioonmarkerina antibiootikumi ampitsilliin lõppkontsentratsioonis 200 µg/ml.

Tabel 6. Töös kasutatud puhvrid.

Puhver	Koostis
1x TBE	90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA
10x PCR puhver	750 mM TrisHCl (pH 8,8), 200 mM NH ₂ SO ₄ , 0,1% TritonX 100, 5% Ficoll 400, 10 mM tartasiin
4x transkriptsioonipuhver	800 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 120 mM MgCl ₂ , 120 mM DTT, 8 mM spermidiin
RNA-puhver-SDS	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1,3% SDS
2x R puhver – 5 mM Mg ²⁺	60 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 4 mM DTT, 10 mM MgAc
2x R puhver – 7,5 mM Mg ²⁺	60 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 4 mM DTT, 15 mM MgAc
2x R puhver – 10 mM Mg ²⁺	60 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 4 mM DTT, 20 mM MgAc
10x R puhver – 5mM Mg ²⁺	300 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 1000 mM KCl, 20 mM DTT, 50 mM MgAc
10x R puhver – 7,5 mM Mg ²⁺	300 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 1000 mM KCl, 20 mM DTT, 75 mM MgAc
10x R puhver – 10 mM Mg ²⁺	300 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 1000 mM KCl, 20 mM DTT, 100 mM MgAc
4x translatsiooni eelpuhver	88 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 600 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc) ₂ , 8 mM DTT, 1 mM spermidiin
6x translatsioonipuhver	132 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 720 mM KOAc, 12 mM Mg(OAc) ₂ , 4,5 mM ATP, 0,6 mM GTP, 10,2 mM DTT, aminohapete segu, milles iga aminohappe kontsentratsioon 0,24 mM (Lisa 1)
6x translatsioonipuhver B	132 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 900 mM KOAc, 15 mM Mg(OAc) ₂ , 4,5 mM ATP, 0,6 mM GTP, 12 mM DTT, aminohapete segu, milles iga aminohappe kontsentratsioon 0,24 mM (Lisa 1)

2.2.3. Oligonukleotiidid

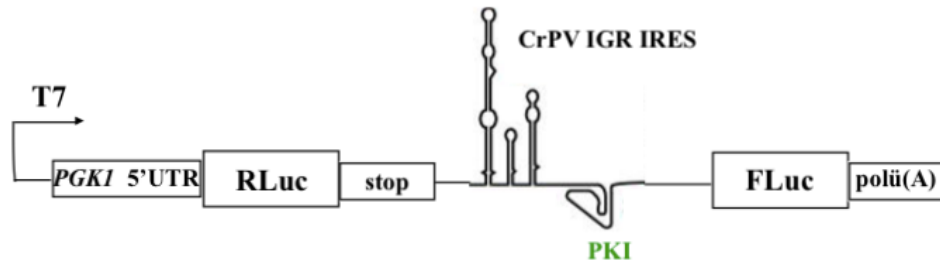
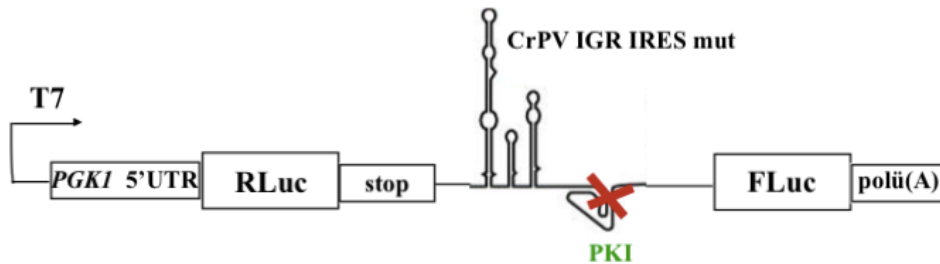
Tabel 7. Töös kasutatud oligonukleotiidid.

Praimeri nimi	5'-3' järjestus
RLuc mRNA 5'-ots DIR	CCACAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGTCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGACTTCGAAAGTTTATGATCCAG
FLuc rev SalI REV	TAGCTAGTCGACTTGTTATTACAATTTGGACTTTCCGCCCTTCTTGGCCTTTAT
RLuc control DIR	GAAAGGTGAAGTTCGTCGTCCAAC
IGR IRES rev NEW REV	GGTTGGATCCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTC

2.3. Metoodika

2.3.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc reportervektorite konstrueerimine

Töö käigus konstrueeritud kaks reportervektorit sisaldavad T7 RNA polümeraasi promooterit, *Renilla* lutsiferaasi ja *Firefly* lutsiferaasi geene ning kahte erinevat CrPV IGR IRES-e varianti. Reporter RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA sisaldab *PGK1* 5' UTR-i, *Renilla* lutsiferaasi (ingl *Renilla luciferase*) (RLuc), mis lõpeb stop-koodoniga, metsiktüüpi (*wt*) CrPV IGR IRES-t, AUG koodonita (Δ AUG) *Firefly* lutsiferaasi (ingl *Firefly luciferase*) (Fluc) ja polü(A)₃₀ järjestusi. Reporter RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc sisaldab *PGK1* 5' UTR-i *Renilla* lutsiferaasi, mis lõpeb stop-koodoniga, mutantset CrPV IGR IRES-t, AUG koodonita *Firefly* lutsiferaasi ja polü(A)₃₀ järjestusi (joonis 11). Mutantse CrPV IGR IRES-e järjestuses on tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise interaktsiooni mimikris osalevate pseudosõlme I (PKI) aluspaaride 1 (BP1) (G6189:C6214) ja 2 (BP2) (G6188:C6215) G-nukleotiidid vahetatud C-nukleotiidide vastu. Mutatsiooni tulemusena katkestatakse PKI struktuur, mistõttu vastavalt IGR IRES-elt translatsiooni ei initsieerida (Jan ja Sarnow, 2002). Vektorite konstrueerimiseks amplifitseeriti plasmiididelt pSRT209 ja pSRT210 regioonid, mis sisaldasid RLuc-i, vastavalt *wt* IGR-IRES-t või mutantset IGR-IRES-t ja FLuc-i kodeerivaid järjestusi. Reaktsioonis kasutati praimereid RLuc mRNA 5'-ots (dir) ja FLuc rev SalI (rev). Amplifitseeritud fragmendid sisestati plasmidi pUC18-Fluc T7 RNA polümeraasi promooteri ja polü(A)₃₀ järjestuste vahele.

A**B**

Joonis 11. RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc reporterite mudelid. (A) RLuc-IGR-IRES-FLuc ehk *wt* IGR IRES-st sisaldav reporter. **(B)** RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc ehk mutantset IGR IRES-t sisaldav reporter, mille PKI struktuuri katkestatust tähistab punane rist.

DNA fragmentide amplifitseerimine PCR meetodil

PCR-i reaktsioonid viidi läbi lõppmahus 50 µl *Eppendorf Mastercycler Nexus* termotsükleris tabelis 8 toodud tingimustel. PCR I reaktsioonisegu sisaldas matriitsina 0,3 ng pSRT209 või pSRT210 plasmiidset DNA-d, 5 µl 10x PCR puhvrit, 5 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2mM dNTP, 20 pmol praimerit RLuc mRNA 5'-ots (dir), 20 pmol praimerit FLuc rev SalI (rev), 0,5 µl Taq DNA polümeraasi (5U/µl) (*TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool*). PCR II reaktsioonisegu sisaldas 5 µl 10x PCR puhvrit, 5 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2mM dNTP, 20 pmol praimerit RLuc mRNA 5'-ots (dir), 20 pmol praimerit FLuc rev SalI (rev), 0,5 µl Taq DNA polümeraasi (5U/µl) (*TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool*) ja matriitsina 7 µl PCR I reaktsioonisegu, mis võiks eeldatavasti vastata ~ 1 ng DNA fragmentidele.

Tabel 8. PCR I ja II tingimused.

Etapp	PCR I, II	Temperatuur	Aeg (sek)	Tsükli arv
1	Algne denaturatsioon	+95°C	240	1
2	Denaturatsioon	+95°C	30	30
3	Praimerite seondumine	+55°C	30	
4	Elongatsioon	+72°C	180	
5	Lõplik elongatsioon	+72°C	600	1

Korrektse suurusega PCR produktide identifitseerimiseks ja puhastamiseks lahutati PCR-i produktid 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1xTBE puhvris. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses ja pikkuste hindamiseks 1 kb DNA markerit (*Solis Biodyne*). DNA fragmendid puhastati geelist *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga vastavalt tootjapoolsele protokollile. DNA kontsentratsioonid mõõdeti *NanoDrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

Restriktsioon

PCR-i fragmente ja plasmidi pUC18-T7-Fluc-polyA30 restrikteeriti vastavalt ensüümikombinatsioonidega HindIII + SalI ning HindIII + XhoI (*Thermo Fisher*) tootja poolt soovitatud puhvris 3h jooksul, temperatuuril 37°C. Restriktsiooniproduktid lahutati 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1xTBE puhvris. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses ja pikkuste hindamiseks 1kb DNA markerit (*Solis Biodyne*). DNA fragmendid puhastati geelist *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele. DNA kontsentratsioonid mõõdeti *NanoDrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

Ligatsioon

Restriktsiooniensüümidega töödeldud DNA fragmentide ja plasmidi kere ligeerimiseks valmistati reaktsioonisegu, lõppmahuga 20 µl, 1xT4 ligaasi puhvris (*Thermo Scientific*), mis sisaldas 60 ng DNA fragmenti, 240 ng plasmidi keret, 1 µl 25mM heksamiinkoobalt(III)kloriidi ja 5U T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Ligatsioonireaktsioon viidi läbi 1,5h vältel, toatemperatuuril.

Transformatsioon

Jääl sulatatud *E. coli* DH5α kompetentide rakususpensioonile lisati 10 µl ligatsioonisegu või 10 ng plasmiidset DNA-d ja inkubeeriti 30 minutit jääl. Inkubatsiooni järel tehti ühe minuti vältel rakkudele kuumašokk (ingl *heatshock*) temperatuuril +42°C. Sellele järgnevalt jahutati rakke 3-5 minutit jääl. Ligatsiooniseguga transformeerimise järel lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet ja inkubeeriti loksutil 2h, temperatuuril +37°C. Rakud koguti lauatsentrifuugis tsentrifuugimise teel (4000 rpm, 3 min). Supernatant eemaldati ja rakud resuspendeeriti 150 µl 2xYT söötmes. Rakususpensioon külvati ampitsilliini (200 µg/ml) sisaldavale LB

tardsöötmele ja inkubeeriti temperatuuril +37°C üleöö. Plasmiidse DNA-ga transformeerimisel külvati rakususpensioon transformatsioonijärgselt otse ampitsilliini (200 µg/ml) sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeeriti temperatuuril +37°C üleöö.

Konstrueeritud plasmiidide kontrollimine

Koloonia-PCR

Bakterikolooniad suspendeeriti 10 µl MQ vees ja lüüsi temperatuuril +95°C 5 min vältel. Rakususpensioonidele lisati 15 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas 2 µl 10xPCR puhvrit, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 10 pmol praimerit RLuc control (dir), 10 pmol praimerit IGR-IRES (rev), 0,3 µl Taq DNA polümeraasi (5U/µl) (*TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool*). PCR reaktsioon viidi läbi *Eppendorf Mastercycler Nexus* termotsükleris vastavalt tabelis 9 toodud tingimustele.

Tabel 9. Koloonia-PCR reaktsiooni tingimused.

Etapp		Temperatuur	Aeg (sek)	Tsüklite arv
1	Algne denaturatsioon	+95°C	60	1
2	Denaturatsioon	+95°C	40	24
3	Praimerite seondumine	+57°C	40	
4	Elongatsioon	+72°C	35	
5	Lõplik elongatsioon	+72°C	300	1

Konstruktide intaktsust hinnati koloonia-PCR reaktsioonil tekkinud DNA fragmentide pikkuste järgi 0,8% agarosgeelelektroforeesil 1xTBE puhvis. DNA fragmentide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses. DNA fragmentide pikkuste hindamiseks kasutati 100 bp DNA markerit (*Solis Biodyne*).

Plasmiidide puhastamine ja kontrollimine

Koloonia-PCR-i kontrollis positiivse tulemuse andnud bakterikolooniad inokuleeriti 2 ml 2xYT söötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin (lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) ja kasvatati loksutis temperatuuril +37°C. Üleöökultuurist puhastati plasmiidne DNA *FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-iga tootja poolt ette nähtud protokoll järgi. Plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks viidi läbi restriksioonanalüüsid ensüümikombinatsioonidega HindIII + XhoI ning BamHI + XhoI (*Thermo Fisher*) tootja poolt soovitatud puhvis 1h jooksul, temperatuuril +37°C. DNA fragmendid lahutati 0,8% agarosgeelelektroforeesil

1xTBE puhvris. Fragmentide pikkuste hindamiseks kasutati 1kb DNA markerit (*Solis Biodyne*). Korrekse restriksioonimustriga plasmiidide reporterit sisaldav regioon kontrolliti sekveneerimise teel.

2.3.2. Plasmiidse DNA lineariseerimine

Kõik *in vitro* transkriptsioonireaktsioonis kasutatud plasmiidseid DNA-d lineariseeriti restriksiooniensüümiga BamHI (*Thermo Fisher*) tootja poolt ette nähtud puhvris 5h vältel, temperatuuril +37°C. Plasmiidse DNA lineariseerimise hindamiseks lahutati ~200 ng restriksiooniprodukti 1% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvris. Lineariseeritud plasmiidse DNA visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi fluorestsentsi UV-valguses ja 100 bp DNA markerit (*Solis Biodyne*). Lineariseeritud DNA puhastamiseks fenool-kloroform meetodil lisati proovile 20 µl 3M NaOAc (pH 7,0). Seejärel lisati proovile sellega võrdne maht (~200 µl) fenool-kloroformi (pH 7,5) ning segati vortexil toatemperatuuril. Valgud tsentrifuugiti lauatsentrifuugis fenool-kloroformi faasi (13000 rpm, 10 min). Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi ja korrati töötlust fenool-kloroformiga. DNA sadestati 2,5 mahu 96% etanooli lisamisega, inkubeerides 1h, temperatuuril -20°C ja tsentrifuugides lauatsentrifuugis 13000 rpm, 10 minutit, toatemperatuuril. Supernatant eemaldati ja DNA sadet pesti 500 µl 70% etanooliga ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13000 rpm, 5 minutit. Supernatant eemaldati ja etanoolijääkide eemaldamiseks tsentrifuugiti DNA sadet lauatsentrifuugis 13000 rpm, 1 minuti vältel. DNA sadet kuivatati temperatuuril +37°C, 5 minutit. Puhastatud lineaarne DNA elueeriti 30 µl MQ vees ja DNA kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*) lainepikkusel 260 nm.

2.3.3. mRNA süntees, puhastamine ja 5'-cap-imine

mRNA sünteesiks valmistati reaktsioonisegu lõppmahuga 50 µl, mis sisaldas 1 µg lineaarset DNA-d, 7,5 µl 25 mM rNTP, 2,5 µl 1M NH₄Cl, 12,5 µl 4x transkriptsioonipuhvrit, 1 µl Ribolock RNAasi inhibiitorit (40U/µl) (*Thermo Scientific*), 2,5 µl T7 RNA polümeraasi (100U/µl) (*TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool*). Reaktsioonisegu inkubeeriti 2h, temperatuuril +42°C. DNA eemaldamiseks lisati reaktsioonisegusse 1 µl DNaseI (10U/µl) (*Amresco*) ja inkubeeriti 20 minutit +37°C juures. Sünteesitud mRNA puhastamiseks fenool-kloroform meetodil lisati proovile 250 µl MQ vett, 450 µl RNA-puhver-SDS-i ja segati

vortexil. Seejärel lisati proovile 450 µl fenooli (pH 5,0), segati taaskord vortexil. Valgud tsentrifuugiti fenoolifaasi lauatsentrifuugis (13000 rpm, 10 min, +4°C). Vesifaas kanti uude reaktsioonituubi. Seejärel lisati vesifaasile 300 µl fenooli (pH 5,5), segati vortexil ning lisati 300 µl kloroformi ja segati teistkordselt vortexil. Peale seda tsentrifuugiti lahust lauatsentrifuugis 13000 rpm, 2 minutit, temperatuuril +4°C. Vesifaas kanti taaskord uude reaktsioonituubi. Fenooli eemaldamiseks lahusest korrati töötlust kloroformiga veelkord. mRNA sadestati 16 µl 5M NaCl ja 1 ml 96% etanooli lisamisega, inkubeerides -80°C juures 1h ja tsentrifuugides lauatsentrifuugis 13000 rpm, 10 minutit, temperatuuril +4°C. Supernatant eemaldati ja sadet pesti 150 µl 70% etanooli lahusega. Seejärel eemaldati taaskord supernatant ja sadet kuivatati toatemperatuuril 5 minutit. Puhastatud mRNA elueeriti 50 µl MQ vees ja mRNA kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*) lainepikkusel 260 nm. mRNA cap-iti kasutades *Vaccinia Capping System*-it (*New England Biolabs*) vastavalt tootja poolt ette nähtud protokollile. 5'-cap-itud mRNA puhastati *RNeasy Mini Kit*-iga (*QIAGEN*) tootja poolt ette nähtud protokoll järgi. Capitud mRNA kontsentratsioon mõõdeti *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

2.3.4. *In vitro* translatsiooni reaktsioon

In vitro translatsiooni reaktsiooniks RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA-lt segati 3,3 µl lõppmahus kokku MQ vesi ja 1000 ng 5'-cap-itud või „cap“-ita mRNA. Vesilahuses mRNA-d soojendati +25°C juures 10 minutit. Seejärel lisati mRNA-le 1 µl 4x translatsiooni eelpuhvrit, 6 µl 6x translatsiooni puhvrit B (Wang *et al.*, 2013), 3 µl 250 mM kreatiinfosfaati (*Sigma-Aldrich*), 1,2 µl 5 mg/ml kreatiin fosfokinaasi (*Sigma-Aldrich*) ja 1,5 µl Ribolock RNAasi inhibiitorit (40U/µl) (*Thermo Scientific*). *In vitro* translatsiooni reaktsiooniks RLuc-FLuc mRNA-lt segati kokku 5 µl 6x translatsiooni puhvrit, 3 µl 250 mM kreatiinfosfaati (*Sigma-Aldrich*), 1000 ng capitud mRNA-d, 1,2 µl kreatiin fosfokinaasi (5 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*) ja 1,5 µl Ribolock RNAasi inhibiitorit (40U/µl) (*Thermo Scientific*). Translatsioonisegu ja jääl sulatatud rakuvaba *wt* (TYSC309) või Δ*B12* (TYSC360) pärmiekstrakti (*TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool*) preinkubeeriti temperatuuril +25°C 5 minutit. Rakuvabad ekstraktid valmistas Ivan Kisly (*TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool*) vastavalt (Kisly *et al.*, 2021) artiklis kirjeldatud meetodile: ekstraktide valmistamine pärmide rakuvabaks translatsiooniks. Seejärel lisati 15 µl *wt* või Δ*B12* rakuvaba pärmiekstrakti

translatsioonisegule ja inkubeeriti +25°C juures. Seejuures võeti *Firefly* lutsiferaasi (FLuc) ja *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) aktiivsuse kõverate määramiseks ajapunktides 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min ja 80 min 2 µl reaktsioonist ja külmutati vedelas lämmastikus. *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaasi esimese signaali ilmumise aja määramiseks (ingl *time of first appearance*) (TFA) võeti RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA-de korral ajapunktides 2 min, 2,5 min, 3 min, 3,5 min, 4 min, 4,5 min ja 5 min 2 µl reaktsioonist ja külmutati vedelas lämmastikus. RLuc-FLuc mRNA korral võeti ajapunktides 1,5 min, 2 min, 2,5 min, 3 min ja 5 min, 5,5 min, 6 min, 6,5 min, 7 min, 7,5 min, 8 min ning 12 min ja 14 min 2 µl reaktsioonist ja külmutati vedelas lämmastikus. Reaktsiooniproovid sulatati jääl vahetult enne lutsiferaaside aktiivsuse mõõtmist. *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaasi aktiivsused mõõdeti *Dual-Luciferase Reporter Assay System*-i (Promega) abil, lisades teatud ajapunktis reaktsioonist väljavõetud 2 µl proovile vastavalt 50 µl LARII ning sellele järgnevalt 50 µl Stop&Glo reagenti. Luminestsents mõõdeti suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU) Tecan Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd.) plaadilugejas 96-kannulistel LUMITRAC (Greiner Bio-One) mikroplaatidel, integratsiooniajaga 10 sekundit. RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA-de korral analüüsiti nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita variantide puhul kahte sõltumatut mRNA transkripti, iga transkripti kohta nelja sõltumatut *in vitro* translatsiooni reaktsiooni. RLuc-FLuc mRNA korral analüüsiti ühte mRNA transkripti vähemalt kolmes *in vitro* translatsiooni reaktsioonis. *In vitro* translatsiooni reaktsiooni erinevates ajapunktides mõõdetud suhtelise valguse ühikutes mõõdetud keskmiste luminestsentside põhjal moodustati RLuc-i ja FLuc-i regressioonisirgete graafikud. Igale reaktsiooni ajapunktile arvutati veapiirid standardhällbena. 80 minuti jooksul läbi viidud *in vitro* translatsiooni reaktsiooni tulemusena saadud regressioonisirgete eksponentsiaalselt kasvavast osast määrati tõusud, mille keskmised võimaldasid hinnata translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust. Regressioonisirgete platoode nelja viimase ajapunkti (50-80 min) mõõdetud luminestsentsidest arvutati keskmised, mis võimaldasid hinnata üldist translatsiooni efektiivsust. 5 ja 14 minuti vältel läbi viidud *in vitro* translatsiooni reaktsiooni reaktsioonidest määrati TFA identifitseerimiseks keskmine taustluminestsents (ingl *background luminescence*) ning selle ülemine piir = keskmine taustluminestsents + 4*taustluminestsentsi standardhälve (Kisy *et al.*, 2021). Alates keskmise taustluminestsentsi ülemisest piirist identifitseeritakse vastavat luminestsentsi mitte enam taustana, vaid signaalina. Keskmise taustluminestsentsi ülemine piir *wt* ja Δ*EB12* ribosoomi sisaldavate rakuvabade pärmiekstraktide jaoks on vastavalt 71,21 RLU ja 70,11 RLU. TFA väärtus defineeriti kui regressioonisirge ja

taustluminestsentsi ülemise piiri ristumiskoht (Kisly *et al.*, 2021). Statistilise olulisuse määramiseks kasutati T-testi.

2.3.5. Ribosomaalsete subühikute *in vitro* assotsiatsiooni analüüs

Ribosomaalsete subühikute *in vitro* assotsiatsiooni analüüs viidi läbi 5 mM, 7,5 mM ja 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil. Selleks sulatati jääl 3U (A_{260}) *wt* (TYSC309) 40S ja 3U (A_{260}) *wt* (TYSC309) või $\Delta eB12$ (TYSC360) 60S ribosomaalseid subühikuid (*TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool*). Ribosomaalsed subühikud puhastas Ivan Kisly (*TÜMRI molekulaarbioloogia õppetool*) vastavalt (Kisly *et al.*, 2019) artiklis kirjeldatud meetodile: soolaga pestud ribosomaalsete subühikute valmistamine. Lisaks sulatati kolm 180 pmol-ist „cap“-ita IGR IRES *wt*, IGR IRES L1 mut või IGR IRES ΔPK mRNA alikvooti.

IGR IRES *wt* mRNA-s sisaldub metsiktüüpi CrPV IGR IRES, IGR IRES L1 mut mRNA-s on CrPV IGR IRES-e domeenis II paiknevas 60S ribosomaalse subühikuga seondumisel olulises PKII L1.1. regioonis GAUC (6038-6041) nukleotiidid muteeritud komplementaarseteks CUAG nukleotiidideks ning IGR IRES ΔPK mRNA-s on CrPV IGR IRES-e ja 40S ribosomaalse subühiku omavahelisel seondumisel oluliste domeenis III ja II paiknevate pseudosõlmede PKI GG (6214-6215) ja PKIII CAC (6148-6150) nukleotiidid muteeritud vastavalt komplementaarseteks CC ja GUG nukleotiidideks ja rikutud sellega vastavate pseudosõlmede moodustumine (Joonis 9).

3U (A_{260}) nii 40S kui ka 60S ribosomaalseid subühikuid jagati 1U (A_{260}) kaupa kolmeks alikvoodiks. Seejärel viidi 1U 40S ja 60S ribosomaalsete subühikute maht vastavalt 90 ja 150 μ l-ni 1x R puhvriga (150 μ l 10x R puhver – 5 mM Mg^{2+} , 3 μ l 1M DTT; lõppmaht 1500 μ l). 7,5 mM ja 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonidega alikvootide saamiseks lisati 40S ribosomaalsete subühikute lahustele vastavalt 1,125 või 2,25 μ l 200 mM MgAc lahust ja 60S ribosomaalsete subühikute lahustele vastavalt 1,875 ja 3,75 μ l 200 mM MgAc lahust. mRNA alikvootide mahud viidi MQ veega 30 μ l-ni ja mRNA-d denatureeriti temperatuuril +95°C 1 minuti jooksul. Sellele järgnevalt asetati mRNA-de vesilahused 5 minutiks jääle ja lisati vastavalt 30 μ l 5 mM, 7,5 mM või 10 mM MgAc kontsentratsiooniga 2x R puhvrit. Reaktsiooni läbiviimise eel inkubeeriti nii mRNA kui ka 40S ja 60S subühikute lahuseid +30°C juures 10 minutit. Esmalt segati kokku mRNA ja 40S ribosomaalsed subühikud ning inkubeeriti 5 minutit. Sellele järgnevalt lisati 60S ribosomaalsed subühikud ja inkubeeriti taaskord 5

minutit. Reassotsiatsioonireaktsioon peatati jääl inkubeerimisega, 5 minutit. 80S partiklite moodustumise analüüsimiseks kanti reaktsioonisegu vastavalt 5 mM, 7,5 mM või 10 mM MgAc kontsentratsiooniga lineaarsele 10-30% sahharoosigradiendile ja ultratsentrifuugiti *Beckman Coulter L90K* ultratsentrifuugi rootoris SW41, 20000 rpm 20h ($w^2t = 2,4 \times 10^{11} \text{ rad s}^{-1}$), temperatuuril 4°C. Ribosoomi fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivooluspektrofotomeetrit *GE Healthcare Monitor UVis-920* lainepikkusel 260 nm, peristaltilist pumpa kiirusel 1,5 ml/min ja isekirjutajat *LKB Bromma 2210 recorder* kaardistamise kiirusel 0,5 mm/s.

2.4. TULEMUSED

2.4.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc reportervektorite konstrueerimine ja kontrollimine

Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab ribosoomi vahelise silla eB12 puudumine CrPV IGR IRES-e järjestusest lähtuvat translatsiooni võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega. Selleks konstrueeriti kaks reportervektorit, sisaldavad kahte erinevat CrPV IGR IRES-e varianti: 1) RLuc-IGR-IRES-FLuc reporter, mis sisaldab üksteisele järgnevaid *PGK1* 5' UTR-i, *Renilla* lutsiferaasi (ingl *Renilla luciferase*) (RLuc), mis lõpeb stop-koodoniga, metsiktüüpi (*wt*) CrPV IGR IRES-t, AUG koodonita (Δ AUG) *Firefly* lutsiferaasi (ingl *Firefly luciferase*) (FLuc) ja polü(A)₃₀ kodeerivaid järjestusi (Joonis 11A); 2) RLuc-IRES_{mut}-FLuc reporter, mis sisaldab üksteisele järgnevalt järgnevalt *PGK1* 5' UTR-i, *Renilla* lutsiferaasi, mis lõpeb stop-koodoniga, mutantset CrPV IGR IRES-t, AUG koodonita (Δ AUG) *Firefly* lutsiferaasi ja polü(A)₃₀ kodeerivaid järjestusi (Joonis 11B). Mutantses CrPV IGR IRES-e järjestuses on tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise interaktsiooni jäljendamises osalevate pseudosõlme I (PKI) aluspaaride 1 (BP1) (G6189:C6214) ja 2 (BP2) (G6188:C6215) G-nukleotiidid (G6189, G6188) vahetatud C-nukleotiidide vastu. Selline mutatsioon katkestab PKI moodustumise ja kaob IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis oluline tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise interaktsiooni mimikri (Jan ja Sarnow, 2002).

Konstrueeritud reportervektorid võimaldasid *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmisel hinnata 5'-cap sõltuva translatsiooni aktiivsust ja *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmisel *wt* või mutantse CrPV IGR IRES järjestuse vahendatud translatsiooni aktiivsust.

Reportervektorite konstrueerimiseks amplifitseeriti plasmiididelt pSRT209 ja pSRT210 regioonid, mis sisaldasid *Renilla* lutsiferaasi, vastavalt *wt* CrPV IGR IRES-t või mutantset CrPV IGR IRES-t ja *Firefly* lutsiferaasi kodeerivaid järjestusi vastavalt peatükis 2.3.1 kirjeldatule. Amplifitseeritud DNA fragmendid restrikteeriti ensüümikombinatsiooniga HindIII + SalII ja ligeeriti seejärel plasmidi pUC18-Fluc T7 RNA polümeraasi promooterit ja polü(A)₃₀ järjestuste, restriksioonisaitide HindIII-XhoI vahele. Reporterjärjestuse olemasolu konstrueeritud plasmiidides kontrolliti koloonia-PCR-iga. Plasmiidide intaktsuse kontrollimiseks viidi läbi restriksioonanalüüs. Korrekse restriksioonimustriga plasmiidide reporterit sisaldav regioon kontrolliti sekveneerimise teel.

2.4.2. Konstrueeritud RLuc-IGR-IRES-FLuc reporter-mRNA-de *in vitro* translatsioon

RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IGR-IRES_{mut}FLuc reportervektoritelt transkribeeritava mRNA translatsioonilise aktiivsuse määramiseks *in vitro* tuli esmalt konstrueeritud reportervektorite DNA lineariseerida vastavalt peatükis 2.3.2. kirjeldatule. Seejärel viidi läbi *in vitro* transkriptsiooni ehk mRNA sünteesi reaktsioon vastavalt peatükis 2.3.3. kirjeldatule. Osa sünteesitud mRNA-st cap'iti vastavalt peatükis 2.3.3. kirjeldatule. *In vitro* translatsiooni reaktsioon viidi läbi nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita *wt* IGR IRES-t ja mutantset IGR IRES sisaldavate mRNA-dega (peatükk 2.3.4.). Reaktsioonis kasutati rakuvabasid pärmiekstrakte, mis sisaldasid metsiktüüpi ribosome (*wt*) või ribosome, mis ei ole suutelised moodustama ribosomaalsete subühikute vahelist silda eB12 (Δ eB12).

2.4.2.1. 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon

5'-cap-itud *wt* IGR IRES-t sisaldava mRNA-ga viidi *in vitro* translatsiooni reaktsioon läbi nii *wt* kui ka Δ eB12 rakuvabade pärmiekstraktidega. Valgusünteesi toimumist mõõdeti 80 minuti jooksul (Joonis 12).

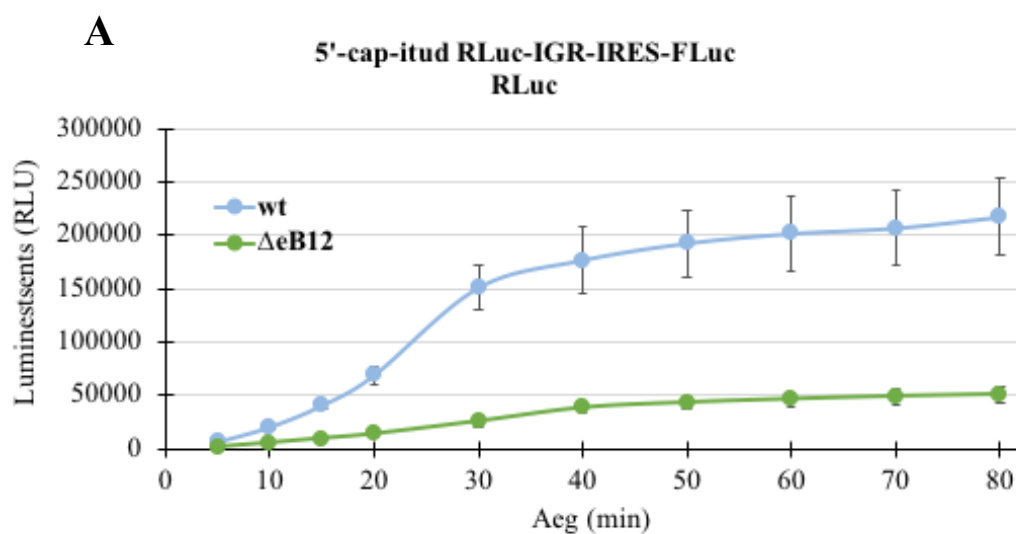
5'-cap-itud *wt* IGR IRES-t sisaldava mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsioonist määratud RLuc-i aktiivsuskõver võimaldab hinnata reporteri 5'-cap-ilt lähtuva translatsiooni initsiatsiooni. *wt* ja Δ eB12 ribosome sisaldavate pärmiekstraktide võrdlemiseks arvutati RLuc-i aktiivsuskõverate eksponentsiaalselt kasvavate osade tõusud ja määrati RLuc-i aktiivsuskõverate ajapunktide 50-80 min keskmised väärtused ehk platoonid (Joonis 12C, 12D, Lisa 2). Aktiivsuskõverate alusel määratud tõusud võimaldavad hinnata translatsiooni initsiatsiooni toimumise kiirust. Platoon väärtused võimaldavad hinnata üldist translatsiooni taset.

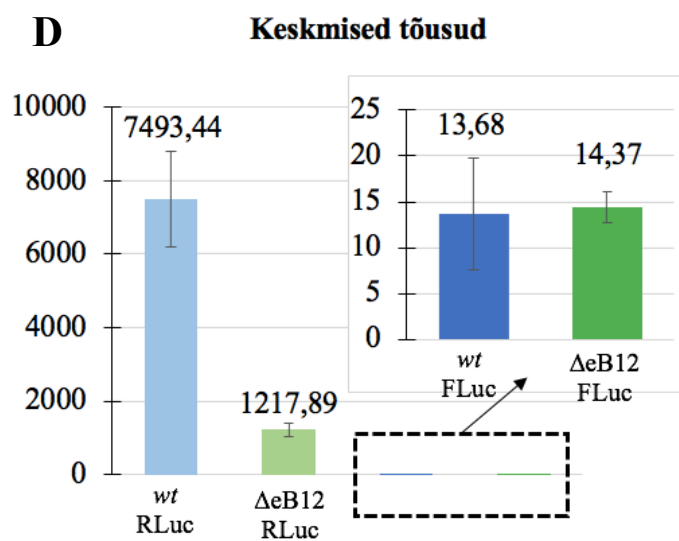
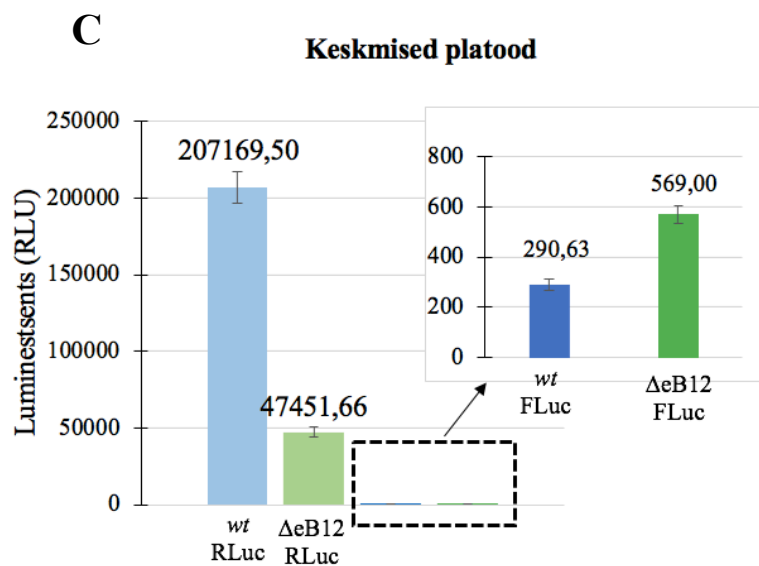
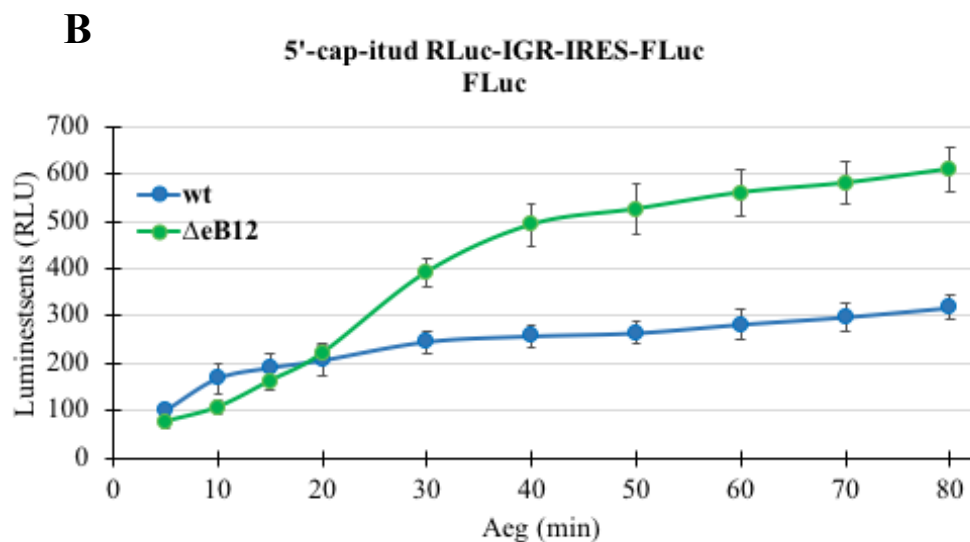
wt ja Δ eB12 pärmiekstraktides mõõdetud RLuc-i platoonide suhe näitab, et mutantseid Δ eB12 ribosome sisaldavas pärmiekstraktis toimub 5'-cap-sõltuv translatsioon 4,37 korda madalamal tasemel kui *wt* ribosome sisaldavas pärmiekstraktis (Joonis 12A ja 12C; Lisa 2). Lisaks sellele on näha erinevus ka RLuc-i aktiivsuskõverate tõusudes, mille suhe näitab, et Δ eB12 ribosome sisaldavas pärmiekstraktis on cap-sõltuv translatsiooni initsiatsioon vähenenud 6,15 korda võrreldes *wt* ribosome sisaldava pärmiekstraktiga (Joonis 12A, 12D; Lisa 2).

In vitro translatsioonireaktsioonis määratud FLuc-i aktiivsuskõver võimaldab hinnata reporteri IRES-vahendatud translatsiooni (Joonis 12B). Δ eB12 ja *wt* pärmiekstraktide saavutatavate

platoode suhte põhjal toimub Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis IRES-vahendatud translatsioon 1,96 korda kõrgemal tasemel ehk ligikaudu poole efektiivsemalt kui *wt* ribosoomi sisaldavas (Joonis 12B, 12C; Lisa 2). Samas FLuc-i aktiivsuskõverate tõusude keskmised väärtused, mis võimaldavad hinnata reporteri IGR IRES järjestuselt vahendatud translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust, on *wt* ja Δ eB12 pärmiekstraktide puhul sarnased (Joonis 12B, 12D; Lisa 2). Seega IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni efektiivsus on nii *wt* kui ka mutantseid Δ eB12 ribosoomi sisaldavatel pärmiekstraktidel samaväärne. Siiski on tähelepanuväärne, et *wt* ekstraktis jõuab IGR IRES-selt lähtuva FLuc-i aktiivsus platoonitasemeni tavapärase 50. minuti asemel juba reaktsiooni 10.-15. minuti vahel (Joonis 12B).

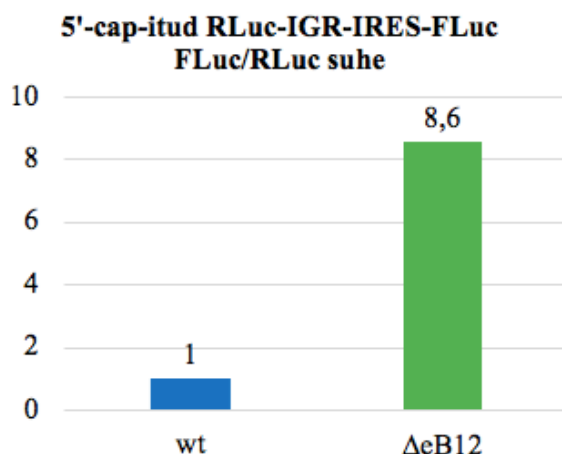
RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni 60. minutil mõõdetud FLuc-i ja RLuc-i aktiivsuste vahelise suhte põhjal on võimalik määrata kui mitu IRES-vahendatud initsiatsiooni leiab aset ühe 5'-cap-sõltuva translatsiooni initsiatsiooni kohta. Suhte põhjal selgub, et *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis leiab ühe 5'-cap-sõltuva translatsiooni initsiatsiooni kohta aset 0,0014 IRES-vahendatud initsiatsiooni. Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis on aga vastav arv 0,012 (Lisa 2). Seega initseeritakse Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis IGR IRES järjestuselt 8,6 korda sagedamini kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis (Joonis 13). Kokkuvõttes toimub Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis 5'-cap-ist lähtuv translatsioon madalamal tasemel ja IRES-vahendatud translatsioon kõrgemal tasemel kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis.





Joonis 12. 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon. Graafikute (A), (B) ja (C) y-teljel on luminesstsents suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU). Graafikute (A) ja (B) x-teljel on aeg minutites. Hele-, ja tumesinisega on kujutatud *wt* ribosoomi sisaldav rakuvaba pärmiekstrakt ja hele-, ja tumeroheliseaga Δ eB12 ribosoomi

sisaldav rakuvaaba pärmiekstrakt. (A) 5'-otsast lähtuvat translatsiooni hinnata võimaldava *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) luminesstsents. (B) IRES järjestuselt lähtuvat translatsiooni võimaldava *Firefly* lutsiferaasi (FLuc) luminesstsents. (C) RLuc-i ja FLuc-i luminesstsentsi regressioonisirgete keskmised platood. (D) RLuc-i ja FLuc-i luminesstsentsi regressioonisirgete keskmised tõusud. Joonisel on veapiiridena näidatud standardhälve 8 katse põhjal (peatükk 2.3.4.).



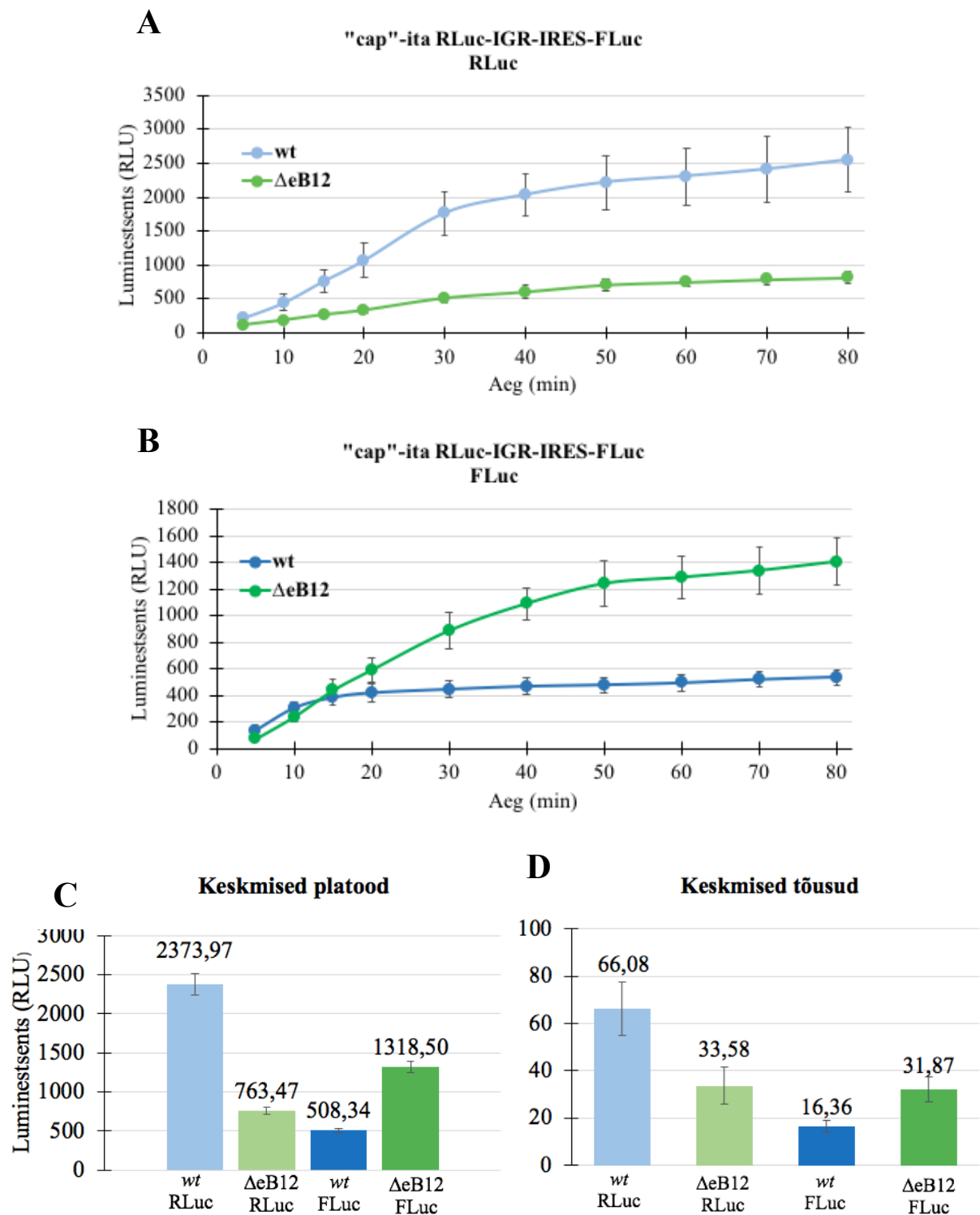
Joonis 13. FLuc-RLuc suhted 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni 60. reaktsiooniminutil. Joonisel kujutatud FLuc/RLuc suhted on normaliseeritud wt pärmiekstrakti suhtes.

2.4.2.2. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon

Lisaks analüüsiti translatsioonilist aktiivsust ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-lt, et vähendada eukarüootsetes rakkudes põhilise translatsiooni initsiatsiooni viisi, 5'-cap struktuurist sõltuva translatsiooni initsiatsiooni tugevat ribosoomi endale siduvat mõju. Sellise reporteri kasutamine võimaldas keskenduda IGR IRES-vahendatud translatsiooni analüüsimisele. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-ga viidi *in vitro* translatsiooni reaktsioon läbi nii wt kui ka ΔeB12 rakuvaabade pärmiekstraktidega. Valgusünteesi toimumist mõõdeti 80 minuti jooksul (Joonis 14).

„cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsioonide lõpptulemusena saavutatavad RLuc-i platood on võrrelduna 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonidega nii wt kui ka ΔeB12 ribosoomi sisaldavatel pärmiekstraktidel vastavalt 87 ja 62 korda madalamad (Joonised 12C, 14C; Lisad 2, 3). Seega FLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA „cap“-imata jätmine langetab tõepoolest RLuc-i translatsiooni taset, ent mingi spontaanne translatsiooni initsieerimine reporteri 5'-otsast siiski aset leiab ning reaktsiooni üldpilt on sarnane 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonile (Joonised 12A, 14A). wt ja ΔeB12 pärmiekstraktides mõõdetud RLuc-i platoode suhe näitab, et mutantseid ΔeB12 ribosoomi sisaldavas

pärmiekstraktis toimub 5'-otsast lähtuv translatsioon 3,11 korda madalamal tasemel kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis (Joonis 14A, 14C; Lisa 3). Lisaks on taaskord erinevus ka RLuc-i aktiivsuskõverate tõusudes, mille keskmiste suhe näitab, et Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis on reporteri 5'-otsast lähtuv translatsiooni initsiatsioon võrreldes *wt* ribosoomi sisaldava pärmiekstraktiga 4,04 korda vähenenud (Joonis 14A, 14D; Lisa 3). Võrrelduna 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonidega on ka RLuc-i tõusude keskmised nii *wt* ja kui ka Δ eB12 ribosoomi sisaldavates pärmiekstraktides vastavalt 113 ja 74 korda madalamad (Joonised 12A, 12D; 14A, 14D; Lisad 2, 3). „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni lõpptulemusena saavutatavad FLuc-i platoonid on võrrelduna 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonidega nii *wt* kui ka Δ eB12 ribosoomi sisaldavatel pärmiekstraktidel ligikaudu kaks korda kõrgemad (Joonised 12B, 12C; 14B, 14C; Lisad 2, 3). Seega RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA „cap“-imata jätmise tõstab tõepoolest FLuc-i translatsiooni taset, ent reaktsioonide üldpilt on taaskord sarnane 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonidele (Joonised 12B, 14B). Δ eB12 ja *wt* pärmiekstraktide saavutatavate platoode suhte põhjal toimub Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis IRES-vahendatud translatsioon 2,6 korda kõrgemal tasemel (Joonis 14B, 14C; Lisa 3). Võrreldes 5'-cap-itud mRNA-ga läbiviidud reaktsioonidega on ka FLuc-i aktiivsuskõverate tõusude keskmised väärtused, mis võimaldasid hinnata IGR IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust, nii *wt* kui ka Δ eB12 ribosoomi sisaldavatel pärmiekstraktidel üle kahe korra kõrgemad kuid omavahel taaskord sarnased (Joonised 12B, 12D; 14B, 14D; Lisad 2, 3). Ka „cap“-ita mRNA-ga jõuab *wt* ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti puhul IGR IRES-selt lähtuv FLuc-i aktiivsus platootasemeni tavapärase 50. minuti asemel juba reaktsiooni 10.-15. minuti vahel (Joonis 14B). Kokkuvõttes on Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis IGR IRES-elt lähtuv translatsioon efektiivsem kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis.



Joonis 14. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon. Graafikute (A), (B) ja (C) y-teljel on luminestsents suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU). Graafikute (A) ja (B) x-teljel on aeg minutites. Hele-, ja tumesinisega on kujutatud *wt* ribosoomi sisaldava rakuvaba pärmiekstrakti ning hele-, ja tumerohelisega $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldava rakuvaba pärmiekstrakti. **(A)** 5'-otsast lähtuvat translatsiooni hinnata võimaldava *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) luminestsents. **(B)** IGR IRES järjestuselt lähtuvat translatsiooni võimaldava *Firefly* lutsiferaasi (FLuc) luminestsents. **(C)** RLuc-i ja FLuc-i luminestsentsi regressioonisirgete keskmised platood. **(D)** RLuc-i ja FLuc-i luminestsentsi regressioonisirgete keskmised tõusud. Joonisel on veapiiridena näidatud standardhälve 8 katse põhjal (peatükk 2.3.4.).

2.4.2.3. RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon

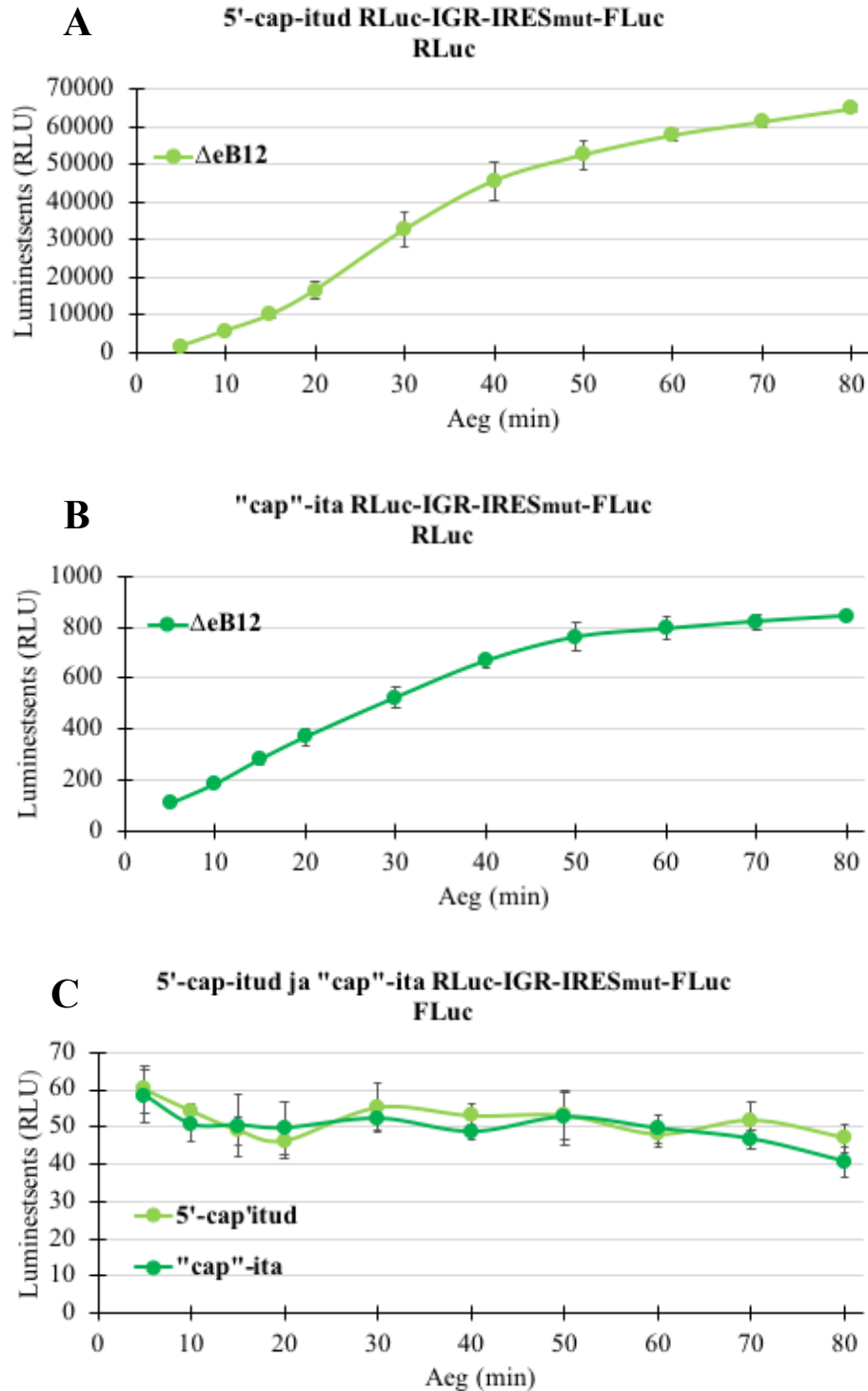
Mutantset IGR IRES-e järjestust sisaldava mRNA-ga viidi *in vitro* translatsiooni reaktsioonid läbi ainult ΔeB12 rakuvaba pärmiekstraktiga. Reaktsioonides kasutati nii 5'-cap struktuuriga kui ka „cap“-ita mRNA-sid. Lutsiferaaside aktiivsused määrati 80 minuti jooksul.

Kuna RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA 5'-otsast lähtuvat RLuc-i kodeeriv regioon on identne *wt* IGR IRES-t sisaldava reporteri mRNA vastava regiooniga, oli RLuc-i aktiivsuse mõõtmine RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA puhul reporteri kontrolliks.

5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni lõpuks saavutatav RLuc-i aktiivsus, mis võimaldas hinnata reporteri 5'-otsast lähtuva translatsiooni efektiivsust, on võrreldes 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-ga läbiviidud reaktsiooniga küll 1,25 korda kõrgem, kuid translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust hinnata võimaldavad RLuc-i aktiivsuskõverate tõusude keskmised on samaväärsed (Joonised 12A, 15A; Lisad 2, 4). „cap“-ita RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsioonis mõõdetud RLuc-i aktiivsuskõverate platoode ja tõusude keskmised väärtused on samaväärsed väärtustele, mis saadi RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-d kasutades (Joonised 14A, 15B; Lisad 2, 4). Seega on mutantset IGR IRES-t sisaldav reporter-mRNA kõigi eelduste kohaselt korrektne ja samaväärse kvaliteediga kui RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA.

Nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-lt määratud FLuc-i aktiivsused jäävad alla arvutusliku esmase signaali määratlemise piiri (Joonis 15C). Seega ei toimu RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA-lt IRES vahendatud translatsiooni initsiatsiooni.

Kokkuvõtteks, RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc reporteri translatsioonil saadud RLuc-i väärtused sarnased metsiktüüpi IGR IRES struktuuri sisaldava reporteri translatsioonil määratud väärtustega. FLuc-i signaali puudumine näitab IRES-vahendatud translatsiooni puudumist sellelt reporter mRNA-lt. Kasutatud mutatsioon rikub IGR IRES-e pseudosõlme I struktuuri. Tulemus on kooskõlas eelnevalt läbi viidud katsete tulemustega, mille kohaselt on korrektne PKI struktuur IGR IRES-elt lähtuva translatsiooni initsiatsiooni toimumiseks hädavajalik ning PKI struktuuri rikkumine viib rohkem kui 90%-lise translatsioonilise aktiivsuse langusele (Jan ja Sarnow, 2002; Hertz ja Thompson, 2011).



Joonis 15. RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA *in vitro* translatsioon ΔeB12 pärmiekstraktiga. Jooniste y-telgedel on luminesstsents suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU), x-telgedel on aeg minutites. **(A)** 5'-cap-itud mRNA 5'-otsast lähtuvat translatsiooni hinnata võimaldava *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) luminesstsents. **(B)** „cap“-ita mRNA 5'-otsast lähtuvat translatsiooni hinnata võimaldava *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) luminesstsents. **(C)** 5'-cap-itud ja „cap“-ita mRNA IGR IRES järjestuselt lähtuvat translatsiooni hinnata võimaldava *Firefly* lutsiferaasi (FLuc) luminesstsents. Joonisel on veapiiridena näidatud standardhälve 8 katse põhjal (peatükk 2.3.4.).

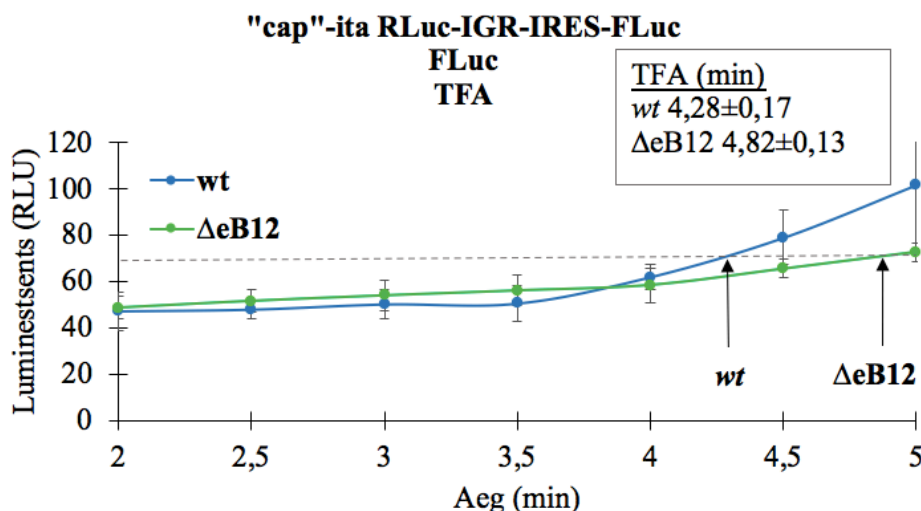
2.4.3. RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-FLuc mRNA-de *in vitro* translatsiooni TFA-de määramine

In vitro translatsiooni reaktsiooni luminesentsi esmase signaali aja (ingl *time of first appearance*) (TFA) määramine võimaldab hinnata ribosoomidel ühe translatsioonitsükli kolme faasi - initsiatsiooni, elongatsiooni ja terminatsiooni – läbimiseks kuluvat aega. IRES-vahendatud translatsioonil ühe translatsioonitsükli läbimiseks kuluva aja määramiseks kasutati „cap“-ita metsiktüüpi CrPV IGR IRES-t sisaldava reporteri (RLuc-IGR-IRES-FLuc) mRNA-d. 5'-cap sõltuva translatsioonil võimaldab ühe translatsioonitsükli läbimiseks kuluvat aega mõõdeti 5'-cap-itud mRNA abil, kus RLuc-i ja FLuc-i kodeerivad järjestused on samas lugemisraamis (RLuc-FLuc). Translatsioonireaktsioonis kasutati nii *wt* kui ka Δ B12 rakuvabasid pärmiekstrakte vastavalt peatükis 2.3.4. kirjeldatule.

2.4.3.1. RLuc-IGR-IRES-FLuc *in vitro* translatsiooni TFA määramine

IGR IRES järjestuselt lähtuva ühe translatsioonitsükli läbimiseks kuluva aja hindamiseks viidi *in vitro* translatsiooni reaktsioon läbi nii *wt* kui ka Δ B12 rakuvabade pärmiekstraktidega, kasutades „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-d. Translatsiooni toimumist analüüsiti 5 minuti jooksul. Luminesentsi esmase signaali aja, TFA, piir defineeriti kui luminesentsi regressioonisirge ja taustluminesentsi ülemise piiri ristumiskoht (peatükk 2.3.4.)

wt ribosoomi sisaldavas pärmiekstrakti translatsioonireaktsioonis on FLuc-i aktiivust võimalik määrata keskmiselt $4,28 \pm 0,17$ minutit peale reaktsiooni algust (Joonis 16). FLuc-i TFA sisaldab IGR IRES järjestuselt lähtuvale translatsiooni initsiatsioonile, FLuc-i elongatsioonile ja translatsiooni terminatsioonile kuluvat aega. Δ B12 ribosoomi sisaldaval pärmiekstraktil on FLuc-i aktiivsus määratav keskmiselt $4,82 \pm 0,13$ minutit peale reaktsiooni algust (Joonis 16). T-testi tulemustest selgub, et *wt* ja Δ B12 ribosoomide FLuc-i TFA-de keskmised väärtused on statistiliselt oluliselt erinevad ($p=0,0000209$). Seega on Δ B12 ribosoomid *wt* ribosoomidest IGR IRES järjestuselt lähtuva translatsioonitsükli lõikes aeglasemad.



Joonis 16. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA FLuc-i *in vitro* translatsiooni TFA-d. Graafikul on esitatud „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsioonil mõõdetud FLuc-i luminesstsents *wt* (tumesinine) ja $\Delta eB12$ (tumeroheline) ribosoomi sisaldavates pärmiekstraktides. Graafiku y-teljel on luminesstsents suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU), x-teljel on aeg minutites. Halli katkendliku joonega on märgitud esmase signaali määramise piir. Graafikul on nooltega märgitud ja eraldi kastis välja toodud luminesstsentsi signaali esmise ilmumise ajapunkt (ingl *time of first appearance*) (TFA) $\pm$ standardhälve. Graafikul on veapiiridena näidatud standardhälve 8 katse põhjal (peatükk 2.3.4.).

2.4.3.2. RLuc-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni TFA määramine

Reporter RLuc-FLuc mRNA puhul on lutsiferaasid RLuc ja FLuc ühes lugemisraamis. Seega kui RLuc-FLuc mRNA 5'-cap struktuurilt translatsioon initsieeritakse, järgneb sellele RLuc-i elongatsioon, mille järel on võimalik mõõta RLuc-i aktiivsus. Sellele järgnevad FLuc-i elongatsioon ja translatsiooni terminatsioon, mille järel valmib liitvalk ning on võimalik mõõta FLuc-i aktiivsus. 5'-cap-itud RLuc-FLuc mRNA-ga viidi *in vitro* translatsiooni reaktsioon läbi nii *wt* kui ka $\Delta eB12$ rakuvabade pärmiekstraktidega. Translatsiooni toimumist analüüsiti 14 minuti jooksul.

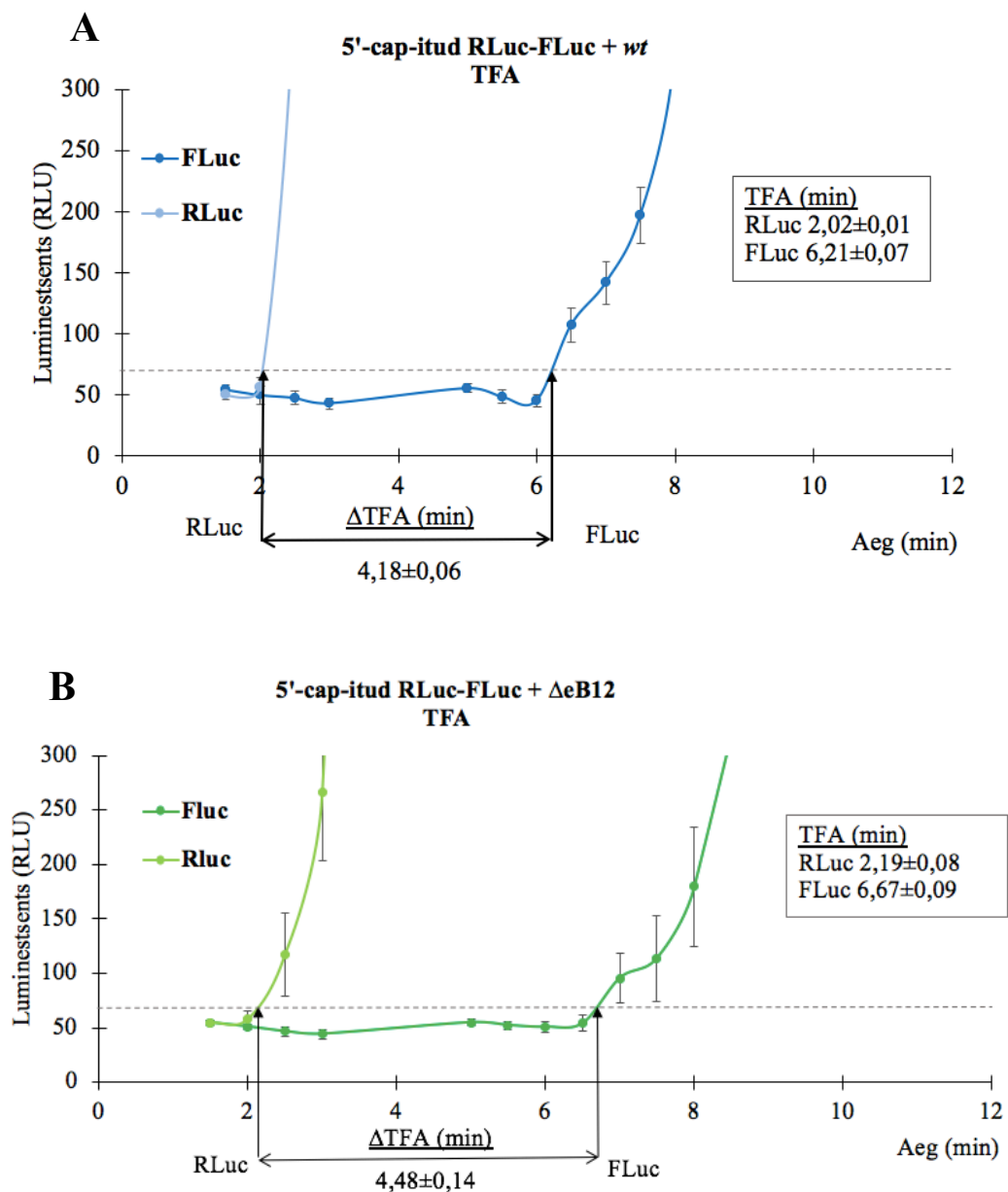
5'-cap-itud RLuc-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni analüüs *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis näitas, et RLuc-i aktiivsust on võimalik määrata 2,02 ± 0,01 minutit pärast reaktsiooni algust (Joonis 17A). RLuc-i TFA sisaldab 5'-cap struktuurilt lähtuval translatsiooni initsiatsioonile ja RLuc-i elongatsioonile kuluvat aega. FLuc-i aktiivsus on määratav 6,21 ± 0,07 minuti möödumisel (Joonis 17A). FLuc-i TFA sisaldab nii 5'-cap struktuurilt lähtuval translatsiooni initsiatsioonile, liitvalgu RLuc-FLuc elongatsioonile ja translatsiooni terminatsioonile kuluvat aega. Lahutades FLuc-i esmise aktiivsuse määramise ajast RLuc-i esmise aktiivsuse määramise aja, on võimalik määrata FLuc-i elongatsiooniks ja

translatsiooni terminatsiooniks kuluv aeg, ΔTFA . *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis on ΔTFA $4,18 \pm 0,06$ minutit (Joonis 17A). Sellele järgnevalt, võttes aluseks, et „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA FLuc-i TFA, mis sisaldab nii IGR IRES järjestuselt lähtuvaks translatsiooni initsiatsiooniks, FLuc-i elongatsiooniks ja translatsiooni terminatsiooniks kuluvat aega, on $4,28$ minutit (Joonis 16). Lahutades sellest väärtusest vaid FLuc-i elongatsiooni ja translatsiooni terminatsioonietappe sisaldava ΔTFA väärtuse, on võimalik hinnata, et IGR IRES järjestuselt lähtuva translatsiooni initsiatsioonietapp võtab *wt* ribosoomi sisaldaval pärmiekstraktis aega $6 \pm 10,82$ sekundit.

5'-cap struktuurilt lähtuval translatsiooni initsiatsioonile ja RLuc-i elongatsioonile kuluvat aega näitav RLuc-i TFA on $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldavas ekstraktis $2,10 \pm 0,08$ minutit (Joonis 17B). 5'-cap struktuurilt lähtuval translatsiooni initsiatsioonile, liitvalgu RLuc-FLuc elongatsioonile ja translatsiooni terminatsioonile kuluvat aega näitav FLuc-i TFA on $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldaval pärmiekstraktis $6,67 \pm 0,09$ minutit (Joonis 17B). Seega on FLuc-i elongatsiooniks ja translatsiooni terminatsiooniks kuluv aeg ΔTFA $4,48 \pm 0,14$ minutit (Joonis 17B). Seejärel, võttes taaskord aluseks, et „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA FLuc-i TFA, mis sisaldab IGR IRES järjestuselt lähtuva translatsiooni initsiatsiooni, FLuc-i elongatsiooni ja translatsiooni terminatsioonietappe, on $4,82$ minutit (Joonis 16). Lahutades sellest väärtusest vaid FLuc-i elongatsiooni ja translatsiooni terminatsioonietappe sisaldava ΔTFA väärtuse, on võimalik hinnata, et IGR IRES järjestuselt lähtuva translatsiooni initsiatsioonietapp võtab $\Delta eB12$ ribosoomidel aega $20,4 \pm 11,46$ sekundit. Kahjuks ei ole IGR IRES järjestuselt lähtuva FLuc-i translatsiooni initsiatsioonietapile kuluva aja arvutustulemuste laiade standardhälbe piiride tõttu võimalik teha põhjanevaid järeldusi *wt* ja $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldavate pärmiekstraktide initsiatsioonikiiruse erinevuse kohta.

Statistiliselt oluliselt erinevad ($p=0,0002948$) on aga *wt* ja $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldavate pärmiekstraktide RLuc-FLuc mRNA *in vitro* translatsioonil arvutuslikult määratud FLuc'i elongatsiooniks ja translatsiooni terminatsiooniks kuluvad ajad (ΔTFA -d). Sealjuures, teades, et *Firefly* lutsiferaasis sisaldub 550 aminohapet, on võimalik FLuc-i aminohapete arvu ja ΔTFA vahelise suhte põhjal määrata maksimaalne elongatsioonikiirus (ah/s) nii *wt* kui ka $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldavatele pärmiekstraktidele. Minimaalsed elongatsioonikiirused (sest ΔTFA sisaldab ka terminatsioonifaasi, millele kuluv aeg pole teada) *wt* kui ka $\Delta eB12$ ribosoomi sisaldavatele pärmiekstraktidele on vastavalt $2,19$ ah/s ja $2,05$ ah/s. Kokkuvõttes

on $\Delta eB12$ ribosoomid *wt* ribosoomidest ühe translatsioonitsükli elongatsiooni- ja terminatsioonifaaside lõikes aeglasemad.



Joonis 17. RLuc-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni TFA-d. Graafikutel on esitatud 5'-cap-itud RLuc-FLuc mRNA *in vitro* translatsioonil mõõdetud RLuc-ide ja FLuc-ide luminescents *wt* (A) ja $\Delta eB12$ (B) ribosoomide sisaldavates pärmiekstraktides. Graafikute y-teljel on luminescents suhtelise valguse ühikutes (ingl *relative light unit*) (RLU), x-teljel on aeg minutites. Hallide katkendlike joontega on märgitud esmise signaali määratlemise piir. Graafikutel on nooltega märgitud ja eraldi kastis välja toodud luminescentsi signaali esmise ilmumise ajapunkt (ingl *time of first appearance*) (TFA) $\pm$ standardhälve. Lisaks on näidatud ka FLuc'i ja RLuc'i TFA-de vahe (ΔTFA) $\pm$ standardhälve. **(A)** RLuc-i (helesinine) ja FLuc-i (tumesinine) luminescents *wt* ribosoomide sisaldavas rakuvabas pärmiekstraktis. **(B)** RLuc-i (heleroheline) ja FLuc-i (tumeroheline) luminescents $\Delta eB12$ ribosoomide sisaldavas rakuvabas pärmiekstraktis. Graafikutel on veapiiridena näidatud standardhälve vastavalt (A) 3 ja (B) 8 katse põhjal (peatükk. 2.3.4.)

2.4.4. Ribosoomi subühikute *in vitro* assotsiatsioon

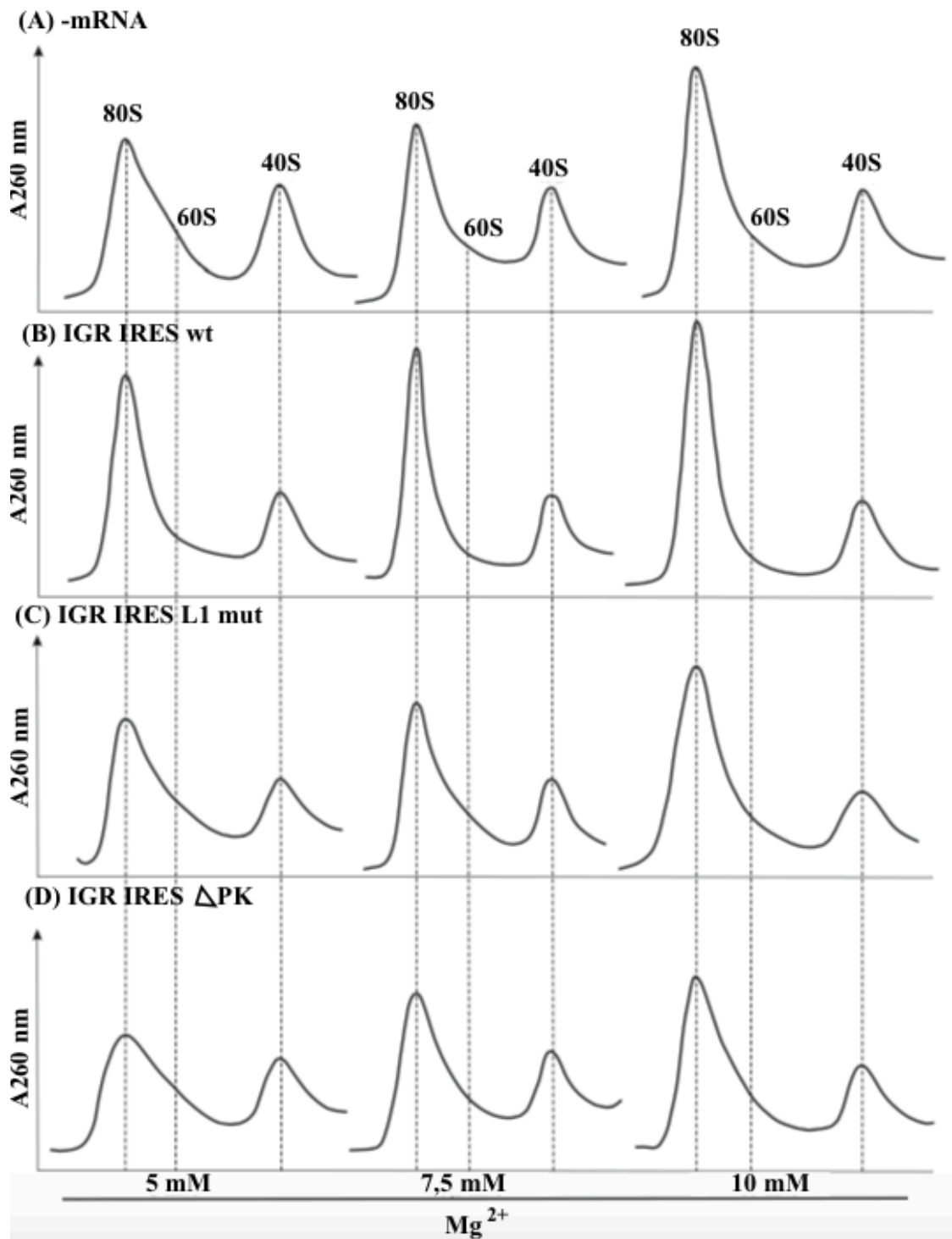
Varasemalt läbi viidud ribosoomi subühikute *in vitro* assotsiatsiooni katsetest on teada, et ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 deletsiooniga (Δ eB12) 60S subühikud ei ole 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil võimelised *wt* 40S subühikutega assotsieeruma (Kisly *et al.*, 2016; Tamm *et al.*, 2019). Kui aga re-assotsiatsiooni reaktsioon viia läbi 20 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil ja lisada reaktsiooni ka tRNA-d, toimub 80S partiklite moodustumine (Kisly *et al.*, 2016).

Eelkatsed on näidanud, et metsiktüüpi CrPV IGR IRES-e reaktsiooni lisamisel, toimub Δ eB12 60S ja *wt* 40S subühikute efektiivne assotsieerumine (Pavel Volõnkin, andmed avaldamata). Selgitamaks CrPV IGR IRES-e mutatsioonide mõju 80S ribosoomi moodustumisele *in vitro*, inkubeeriti IGR IRES-e variantide L1 mut ja Δ PK ning kontrollina IGR IRES *wt* variandi RNA-sid *wt* (TYSC309) 40S ja *wt* (TYSC309) või Δ eB12 (TYSC360) 60S ribosomaalsete subühikutega 5 mM, 7,5 mM ja 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil vastavalt peatükis 2.3.5. kirjeldatule. RNA-d sünteesiti ja puhastati vastavalt peatükis 2.3.3. kirjeldatule. Ribosoomiprofiilide analüüsimiseks formeeriti 10%-30% sahharoosgradiendid, mis olid vastavalt 5 mM, 7,5 mM ja 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsiooniga. Moodustatud sahharoosigradiendites lahutati ultratsentrifuugimise teel reaktsioonisegus sisalduvad ribosomaalsed partiklid vastavalt peatükis 2.3.4. kirjeldatule.

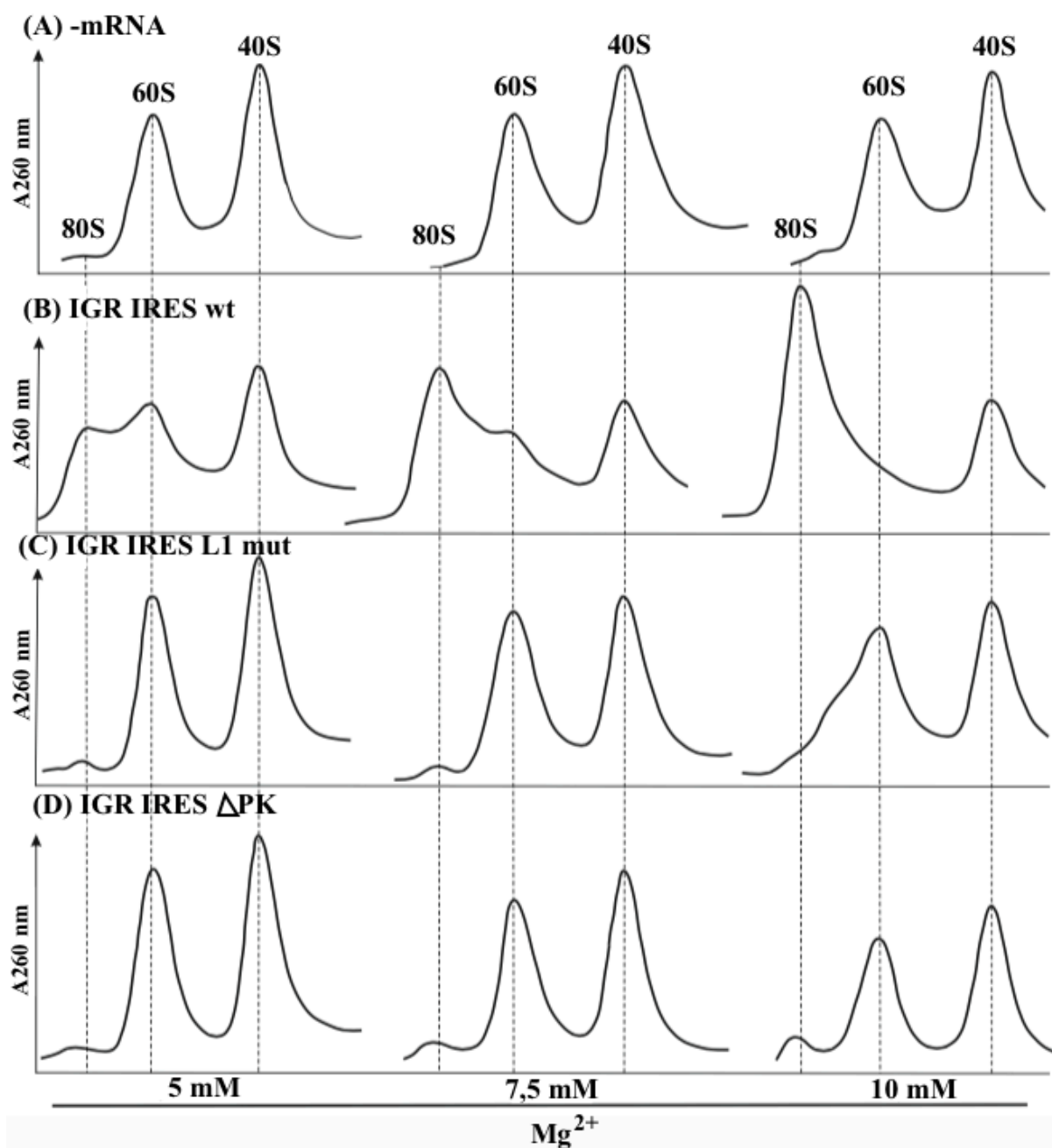
Metsiktüüpi (*wt*) 40S ja 60S ribosomaalsed subühikud on võimelised moodustama 80S partikli ka ilma lisatud RNA osaluseta juba 5 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil (Joonis 18; Kisly *et al.*, 2016). Lisades reaktsioonisegusse IGR IRES *wt* RNA on 5 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil nähtav 80S partiklite piik kitsam ja kõrgem, mis annab mõista suurema hulga 40S ja 60S subühikute assotsieerumisest. Mg^{2+} -ioonide kontsentratsiooni kasvades muutub nii RNA osaluseta kui ka IGR IRES *wt* RNA osalusega reaktsioonides 80S partiklite piik kitsamaks ja kõrgemaks, mis näitab taaskord assotsieerunud subühikute hulga suurenemist. IGR IRES L1 mut ja IGR IRES Δ PK RNA-de lisamisel reaktsiooni, on moodustuvad 80S partiklid kõigil kolmel analüüsitud Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil sarnaselt ilma RNA-ta läbi viidud reaktsioonidele. Seega ei oma IGR IRES L1 mut ja IGR IRES Δ PK RNA-d võrreldes IGR IRES *wt* RNA-ga metsiktüüpi 40S ja 60S ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni soodustavat efekti.

wt 40S ja Δ eB12 60S ribosomaalsed subühikud ei ole võimelised ilma RNA osaluseta 80S partikleid moodustama mitte ühelgi analüüsitud Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil (Joonis 19;

Kisly *et al.*, 2016). Lisades reaktsioonisegusse IGR IRES *wt* RNA, on 80S partiklite piigi kindlapiirilist moodustuma hakkamist näha juba 5 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil. Subühikute assotsiatsioon toimub efektiivselt 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil. Seega IGR IRES *wt* RNA on võimeline iseenesest mitte assotsieeruvad *wt* 40S ja Δ eB12 60S ribosomaalsed subühikud omavahel kokku tooma. Mutantsete IGR IRES RNA-de analüüs näitab, et valdav osa 40S ja 60S subühikuid on ka 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil siiski vabadena ning ei moodusta 80S partikleid. IGR IRES L1 mut RNA 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonil on aga 80S partiklite piigi kõrval lisaks nähtav 60S piigi küljelt välja kasvav küür, mis kujutab endast nõrga subühikute vahelise interaktsiooniga 80S partikleid. Kokkuvõttes kaotavad mutatsioonid IRES struktuuris ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni soodustava efekti ja IGR IRES Δ PK ja IGR IRES L1 mut struktuurid ei ole võimelised *wt* 40S ja Δ eB12 60S ribosomaalseid subühikuid efektiivselt assotsieerima.



Joonis 18. *wt* 40S ja *wt* 60S ribosomaalsete subühikute *in vitro* assotsiatsioon. Joonisel on märgitud 80S partikli ja 60S ning 40S subühikute piigid. Sedimentatsioon sahharoosigradiendis on iga ribosoomiprofiili jaoks paremalt vasakule. Analüüsitud Mg^{2+} -ioonide kontsentratsioonide muutumine suunal 5mM-7,5mM-10mM toimub vasakult paremale. y-teljel on märgitud A_{260} nm. **(A)** RNA puudu. **(B)** IGR IRES *wt* RNA. **(C)** IGR IRES L1 mut RNA. **(D)** IGR IRES Δ PK RNA. Katseid on korratud 4 korda: kaks korda kahe individuaalse mRNA transkriptiga.



Joonis 19. wt 40S ja ΔB12 60S ribosomaalsete subühikute *in vitro* assotsiatsioon. Joonisel on märgitud 80S partikli ja 60S ning 40S subühikute piigid. Sedimentatsioon sahharoosigradiendis on iga ribosoomiprofiili jaoks paremalt vasakule. Analüüsitud Mg²⁺-ioonide kontsentratsiooni muutumine suunal 5mM-7,5mM-10mM toimub vasakult paremale. y-teljel on märgitud A₂₆₀ nm. **(A)** RNA puudu. **(B)** wt IGR IRES RNA. **(C)** IGR IRES L1 mut RNA. **(D)** IGR IRES ΔPK RNA. Katseid on korratud 4 korda: kaks korda kahe individuaalse mRNA transkriptiga.

2.5. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 puudumine CrPV IGR IRES-e järjestuse variantidelt lähtuvat translatsiooni ja ribosomaalsete subühikute assotsieerumist võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega.

Magistritöö tulemustest nähtub, et Δ eB12 ribosoomi sisaldav pärmiekstrakt on RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsioonis mRNA 5'-otsast lähtuva RLuc-i translatsioonis *wt* ribosoomi sisaldavast ekstraktist ebaefektiivsem. Selle peamiseks põhjuseks on Δ eB12 ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti tugev 5'-cap struktuurist sõltuva translatsiooni initsiatsiooni defekt. Initsiatsioonidefekt ilmneb translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust hinnata võimaldanud 5'-cap-itud mRNA RLuc-i aktiivsuskõvera keskmisest tõusust, mis moodustab ainult 16% *wt* ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti keskmisest tõusust (Joonis 12A, 12D; Lisa 2). 5'-cap struktuurist sõltuva translatsiooni initsiatsiooni defekt ilmneb ka eB12 sillale struktuurselt sarnase subühikutevahelise silla eB13 deletsioonimutandi rakuvaba pärmiekstraktiga läbi viidud *in vitro* translatsiooni reaktsioonis (Kisly *et al.*, 2019). Sarnaselt eB12 silda moodustavale r-valgule eL19, omab ka eB13 silda moodustav r- Valk, eL24 pikka C-terminaalset α -heeliksit (Ben-Shem *et al.*, 2011). Siiski ei ole Δ eB13 ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti puhul ilmnev initsiatsiooni defekt niivõrd ulatuslik, sest eelnimetatud ekstraktis moodustab FLuc-i aktiivsuskõvera keskmine tõus 60% kontroll-pärmiekstrakti keskmisest tõusust (Kisly *et al.*, 2019). Seega avaldab ribosomaalsete subühikute vahelise eB12 silla ribosoomist puudumine 5'-cap-ist lähtuval translatsiooni initsiatsioonile 2,1 korda tugevamat mõju kui ehituslikult sarnase eB13 silla puudumine. eB12 silla deleteerimisele sarnane initsiatsioonidefekt, mil FLuc-i aktiivsuskõvera keskmine tõus moodustab vähem kui 20% kontroll-ekstrakti keskmisest tõusust, ilmneb Δ eL24 pärmiekstrakti puhul, millest puudub terve eL24 valk (Kisly *et al.*, 2019).

RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA „cap“-ita jätmine vähendab mRNA 5'-otsast lähtuva translatsiooni efektiivsust ja võimaldab selle tõttu suurenenud vabade ribosomaalsete subühikute hulga arvelt IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsuse ligikaudu kahekordset kasvu ning seda nii *wt* kui ka Δ eB12 ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti puhul (Joonised 12, 14). Olenemata sellest, kas reporteri mRNA on 5'-cap-itud või „cap“-ita, on IRES-vahendatud translatsioonis Δ eB12 ribosoomi sisaldav pärmiekstraktis efektiivsem kui *wt* ribosoomi sisaldavas ekstraktis (Joonised 12B, 14B). Δ eB12 ribosoomi sisaldava pärmiekstrakti IGR IRES-elt lähtuva translatsiooni suurem efektiivsus võrreldes *wt* ribosoomi sisaldava

pärmiekstraktiga nähtub ka *in vivo* reportersüsteemis läbi viidud katsete tulemustest (Pavel Volõnkin, andmed avaldamata).

Ometigi nähtub „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA-ga läbi viidud *in vitro* translatsiooni TFA-de määramisest, et Δ eB12 ribosoomid on IRES-elt lähtuva initsiatsiooni-, FLuc-i elongatsiooni- ja terminatsioonifaasi sisaldava translatsioonitsükli läbimisel *wt* ribosoomidest keskmiselt 1,13 korda aeglasemad (Joonis 15). Δ eB12 ribosoomide aeglasem translatsioonitsükli läbimise kiirus nähtub ka 5'-cap-itud RLuc-FLuc mRNA-ga läbi viidud *in vitro* translatsiooni TFA-de määramise tulemustest. Viimasest selgub, et Δ eB12 ribosoomid on 5'-cap sõltuvat initsiatsiooni-, RLuc-i elongatsiooni-, FLuc-i elongatsiooni- ja terminatsioonifaasi sisaldava translatsioonitsükli läbimisel *wt* ribosoomidest keskmiselt 1,07 korda aeglasemad (Joonis 17). Selle põhjuseks võib olla eB12 silla puudumisest põhjustatud ribosoomi subühikute ebastabiilsem omavaheline seondumine, mistõttu jõuab vähem ribosoomide enne mRNA-lt „maha kukkumist“ reporter-valgu lõpuni sünteesida. Sellest tulenevalt ilmub ka reporter-valgu puhul mõõdetav esmane luminesentsi signaal hiljem. Ainult FLuc-i elongatsiooni ja translatsiooni terminatsioonifaasi läbimiseks kuluvat aega sisaldava Δ TFA põhjal määratud translatsiooni minimaalsetest elongatsioonikiirustest selgus, et Δ eB12 ribosoomid on *wt* ribosoomidest translatsioonitsükli elongatsioonifaasis 1,07 korda aeglasemad. Sarnaselt on elongatsioonikiirus on määratud ka Δ eB13 ribosoomide sisaldavale pärmiekstraktile, millest selgus, et Δ eB13 ribosoomid on kontroll-ribosoomidest translatsiooni elongatsiooni-faasis 1,3 korda aeglasemad (Kisly *et al.*, 2019). Seega avaldab ribosomaalsete subühikute vahelise eB12 silla ribosoomist puudumine 5'-cap-ist lähtuvale translatsiooni elongatsioonile vähem mõju kui eB13 silla puudumine.

Põhjus, miks Δ eB12 ribosoomide sisaldavas pärmiekstraktis toimub IRES-vahendatud translatsioon efektiivsemalt seisneb aga selles, et Δ eB12 ekstraktis initsieeritakse IRES-elt 8,6 korda sagedamini, võrrelduna *wt* ribosoomide sisaldava ekstraktiga (Joonis 13). Tulemusega kooskõlas on ka *in vivo* reportersüsteemis läbi viidud katsete tulemus, mille kohaselt initsieerivad Δ eB12 ribosoomide sisaldavad pärmirakud IGR IRES-järjestuselt 13 korda sagedamini kui *wt* ribosoomide sisaldavad pärmirakud (Pavel Volõnkin, andmed avaldamata).

Huvitav on aga asjaolu, et kui tavapäraselt, *in vitro* translatsiooni reaktsiooni omapärast tulenevalt, saavutatakse RLuc-i ja FLuc-i aktiivsuste platootase alates reaktsiooni 50. minutist ehk reaktsiooni kolmandas viiendikus, siis nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA reaktsioonil *wt* ribosoomide sisaldava pärmiekstraktiga jõuab IRES-selt lähtuval *in vitro* translatsioonil FLuc-i aktiivsus platootasemeni juba reaktsiooni 10.-15. minuti vahel. See

tähendab, et peale 10.-15. minutit märkimisväärset translatsiooni enam *wt* ribosoomide sisaldavalt pärmiekstraktilt ei toimu. On võimalik, et ennaklikult saabuv FLuc-i aktiivsuse platootase võib tuleneda sellest, et *wt* ribosoomid läbivad translatsiooni initsiatsiooni- ja elongatsioonifaasid, kuid ei läbi efektiivselt terminatsiooni- ja ribosomaalsete subühikute taaskasutuse faasi ning jäävad reaktsiooni kulgedes lõpuks ridamisi mRNA-le pidama. Selle tagajärjel on mRNA *wt* ribosoomide poolt hõivatud ja uutel *wt* ribosoomidel ei ole vastavalt mRNA-lt enam translatsiooni alustada. RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA reaktsioonil Δ eB12 ribosoomidega saavutatakse platootase nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita mRNA puhul tavapärasel 50. minutil. Seega annab eB12 silla puudumine, mis on oluline ribosomaalsete subühikute stabiilsel seondumisel 80S ribosoomiks, Δ eB12 ribosoomidele antud katsetingimustel eelise. On võimalik, et ebastabiilsem subühikute vaheline seondumine hõlbustab ribosomaalsete 40S ja 60S subühikute dissotsieerumist mRNA-lt, mistõttu on Δ eB12 ribosoomid võimelised mRNA-le takerdumise järel sellelt lahkuma ja uuesti translatsiooni initsieerima, saavutades sellest tulenevalt ka kõrgema translatsiooni efektiivsuse.

Kirjandusest on teada, et mõned ribosoomivalgud on CrPV IGR IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsel initsiatsioonil olulised. Nende hulgas on näiteks 40S subühiku valk eS25, mille ribosoomist puudumine kaotab CrPV IGR IRES-e võime 40S subühikuga seonduda ja sellest tulenevalt ei toimu ka IRES-vahendatud translatsiooni (Landry *et al.*, 2009). Lisaks on teada ka 60S subühiku valk uL1, mille ribosoomist puudumine vähendab IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsust ligikaudu 20% (Shi *et al.*, 2017). Siiani ei ole aga leitud r-valku, mille puudumine tõstaks IRES-vahendatud translatsiooni efektiivsust, nagu seda teeb silda eB12 moodustava valgu eL19 C-terminaalse α -heeliksi deleteerimine.

CrPV IGR IRES-e struktuuri ja teatud järjestuselementide olulisust translatsiooni initsieerimisel kinnitavad ribosomaalsete subühikute *in vitro* assotsiatsioonikatsete tulemused. IGR IRES Δ PK RNA puhul on mutatsioonidega rikutud IGR IRES-e pseudosõlmede I ja III moodustumine. Mõlemad pseudosõlmed on olulised esmajoones translatsiooni initsiatsiooni esimeses etapis, IGR IRES struktuuri seondamisel ja korrektsel paigutamisel 40S ribosomaalsele subühikule (Jan ja Sarnow, 2002). PKI ja PKIII tüviaas struktuuride katkestamine (ingl *disruption*) kaotab täielikult topeltnutantse Δ PK IRES-e võime 40S subühikuga seonduda (Jan ja Sarnow, 2002). Sellega kooskõlas on nii *wt* 40S ja 60S kui ka *wt* 40S ja Δ eB12 60S subühikutega läbi viidud assotsiatsioonikatsete tulemused, millest selgub, et IGR IRES Δ PK RNA reaktsiooni lisamisel on reaktsioonide üldpilt sarnane ilma RNA-ta läbi viidud reaktsioonide üldpildile (Joonised 18, 19). IGR IRES L1 mut RNA puhul on

muteeritud 60S subühiku L1 kühmuga seonduva IGR IRES-e pseudosõlme II aas-struktuuri L1.1. piirkond (Joonis 9). See piirkond on peamine 60S subühiku seondamise eest vastutav piirkond (Fernandez *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2016). L1 mut IRES on võimeline 40S subühikuga seonduma, kuid ei ole sellele järgnevalt võimeline seonduma 60S subühikuga (Kerr *et al.*, 2018). *wt* 40S ja 60S subühikutega läbi viidud assotsiatsioonikatse tulemused meenutavad aga ilma RNA-ta läbi viidud reaktsioonide üldpilti (Joonis 18). On teada, et CrPV IGR IRES seondub 40S subühikuga kõrge afiinsusega, mis translatsiooni initsiatsiooniks kuluvas ajaskaalas pole pöörduv (Johnson *et al.*, 2017). Kui aga *wt* 40S subühikuga seondunud IGR IRES L1 mut RNA ei seonu järgnevalt *wt* 60S subühikuga ka pikema aja vältel, on võimalik, et mutantne IRES siiski 40S subühikult dissotsieerub. Seejärel on vabanenud *wt* 40S subühik võimeline ise-eneslikult assotsieeruma *wt* 60S subühikuga ja reaktsiooni lõpuks meenutabki vastav reaktsioonipilt ilma RNA-ta läbi viidud reaktsioonipilti. *wt* 40S ja ΔE12 60S ribosomaalsete subühikutega läbi viidud assotsiatsioonikatsete tulemustest nähtub, et 40S subühikuga seondunud IGR IRES L1 mut RNA on võimeline mutantse 60S subühikuga moodustama nõrgalt assotsieerunud 80S subühikuid (Joonis 19). Seega ei ole IGR IRES järjestuse L1.1. piirkonna intaktsus mutantsete ΔE12 60S subühikute seondamisel hädavajalik ning IGR IRES L1 mut RNA teadmata põhjusel vähesel määral võimeline *wt* 40S ja ΔE12 60S ribosomaalseid subühikuid assotsieerima.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab ribosomaalsete subühikute vahelise silla eB12 puudumine ribosoomist CrPV IGR IRES-e järjestuse variantidelt lähtuvat translatsiooni ja ribosomaalsete subühikute assotsieerumist *in vitro* võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega. Selleks konstrueeriti kaks reportervektorit, mis sisaldavad kahte erinevat CrPV IGR IRES-e varianti: 1) RLuc-IGR-IRES-FLuc reporter, mis sisaldab *Renilla* lutsiferaasi (ingl *Renilla luciferase*) (RLuc), metsiktüüpi (*wt*) CrPV IGR IRES-t ja *Firefly* lutsiferaasi (ingl *Firefly luciferase*) (FLuc) kodeerivaid järjestusi; 2) RLuc-IRES_{mut}-FLuc reporter, mis sisaldab *Renilla* lutsiferaasi, mutantset CrPV IGR IRES-t ja *Firefly* lutsiferaasi kodeerivaid järjestusi. Mutantses CrPV IGR IRES-e järjestuses on tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise interaktsiooni mimikris osalevate pseudosõlme I (PKI) aluspaaride 1 (BP1) (G6189:C6214) ja 2 (BP2) (G6188:C6215) G-nukleotiidid (G6189, G6188) vahetatud C-nukleotiidide vastu. Selline mutatsioon katkestab PKI moodustumise ja kaob IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsioonis oluline tRNA antikoodoni ja mRNA koodoni vahelise interaktsiooni mimikri, mis on oluline IRES-vahendatud translatsiooni initsiatsiooniks (Jan ja Sarnow, 2002). Reportervektoritelt sünteesitud nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc ja RLuc-IRES_{mut}-FLuc mRNA-ga viidi läbi *in vitro* translatsiooni reaktsioonid rakuvabade pärmiekstraktidega, mis sisaldasid *wt* ribosoomi või ribosoomi, mis ei ole suutelised moodustama ribosomaalsete subühikute vahelist silda eB12 (Δ eB12). Tugevast translatsiooni initsiatsiooni defektist põhjustatuna toimub mRNA 5'-otsast lähtuv translatsioon Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA puhul vastavalt 4,37 ja 3,11 korda madalamal tasemel, kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis. Lisaks initsiatsioonidefektile esineb Δ eB12 ribosoomi sisaldaval pärmiekstraktis defekt ka translatsiooni elongatsioonifaasis, millest tulenevalt on Δ eB12 ribosoomide elongatsioonikiirus 1,07 korda aeglasem *wt* ribosoomide elongatsioonikiirusest. Ühe translatsioonitsükli lõikes, mis sisaldab initsiatsiooni-, elongatsiooni- ja terminatsioonifaasi, on Δ eB12 ribosoomi sisaldav pärmiekstrakt nii 5'-cap sõltuvas translatsiooni kui ka IRES-vahendatud translatsiooni puhul vastavalt 1,07 ja 1,13 korda aeglasem, kui *wt* ribosoomi sisaldav pärmiekstrakt. Sellest olenemata toimub Δ eB12 ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis IRES-vahendatud translatsioon nii 5'-cap-itud kui ka „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA puhul vastavalt 1,96 ja 2,6 korda kõrgemal tasemel, kui *wt* ribosoomi sisaldavas pärmiekstraktis. Kõrgemat IRES-vahendatud translatsiooni taset

seletab asjaolu, et Δ eB12 ribosoomid initsieerivad IRES järjestuselt võrreldes *wt* ribosoomidega 8,6 korda sagedamini.

CrPV IGR IRES struktuuri intaktsuse olulisust translatsiooni initsieerimisel kinnitavad *wt* 40S ja *wt* või Δ eB12 60S ribosomaalsete subühikutega läbi viidud *in vitro* assotsiatsioonikatsete tulemused. Assotsiatsiooni katsetes kasutati varasemalt konstrueeritud vektoreid, millelt sünteesitavad RNA-d sisaldavad kolme erinevat CrPV IGR IRES-e varianti: 1) IGR IRES *wt*, milles sisaldub metsiktüüpi IGR IRES; 2) IGR IRES Δ PK, milles on IGR IRES-e ja 40S ribosomaalse subühiku omavahelisel seondumisel oluliste pseudosõlmede PKI GG (6214-6215) ja PKIII CAC (6148-6150) nukleotiidid muteeritud vastavalt komplementaarseteks CC ja GUG nukleotiidideks ja rikutud sellega vastavate pseudosõlmede moodustumine; 3) IGR IRES L1 mut, milles on IGR IRES-e 60S ribosomaalse subühikuga seondumisel olulises PKII L1.1. regioonis GAUC (6038-6041) nukleotiidid muteeritud komplementaarseteks CUAG nukleotiidideks. *In vitro* assotsiatsioonikatsetest selgus, et IGR IRES L1 mut ja IGR IRES Δ PK RNA-d ei oma võrreldes IGR IRES *wt* RNA-ga metsiktüüpi 40S ja 60S ribosomaalsete subühikute assotsiatsiooni soodustavat efekti. IGR IRES Δ PK RNA ei oma soodustavat efekti ka *wt* 40S ja Δ eB12 60S ribosomaalsete subühikute assotsiatsioonil. Seevastu IGR IRES L1 mut RNA on 10 mM Mg^{2+} -ioonide kontsentratsiooni juures võimeline moodustama nõrga subühikute vahelise interaktsiooniga 80S partikleid.

Kokkuvõttes on eB12 sild justkui IRES-vahendatud translatsiooni negatiivne regulaator, sest silla puudumisel muutub CrPV IGR IRES järjestuselt vahendatud translatsioon ligikaudu 2 korda efektiivsemaks.

The importance of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal intersubunit bridge eB12 in IRES-mediated translation

Carolin Kattel

SUMMARY

The aim of this thesis was to study how the lack of the bridge eB12 between ribosomal subunits in the ribosome affects translation from CrPV IGR IRES sequence variants and association of ribosomal subunits in vitro compared to wild-type ribosomes. For this, reporter vectors containing two different variants of CrPV IGR IRES were constructed: the first being the RLuc-IGR-IRES-FLuc reporter containing *Renilla luciferase* (RLuc), wild-type (WT) CrPV IGR IRES, and *Firefly luciferase* (FLuc) coding sequences; and the second being the RLuc-IRES_{mut}-FLuc reporter containing *Renilla luciferase*, mutant CrPV IGR IRES, and *Firefly luciferase* coding sequences. In the mutant CrPV IGR IRES sequence, the G-nucleotides (G6189, G6188) of pseudo-knot I (PKI) base pairs 1 (BP1) (G6189:C6214) and 2 (BP2) (G6188:C6215) (that participate in the tRNA anticodon and mRNA codon interaction mimicry) were exchanged for C-nucleotides. Such a mutation disrupts PKI formation and eliminates the interaction mimicry between the tRNA anticodon and the mRNA codon, which is important in initiating IRES-mediated translation (Jan and Sarnow, 2002). In vitro translation reactions were carried out with RLuc-IGR-IRES-FLuc and RLuc-IRES_{mut}-FLuc mRNA (both 5'-cap and non-cap) as well as cell-free yeast extracts, containing *wt* ribosomes or ribosomes that are not able to form the bridge eB12 (Δ eB12) between the ribosomal subunits.

Due to a strong translation initiation defect, translation from the 5'-end of mRNA in yeast extract containing Δ eB12 ribosomes occurs at 4.37 and 3.11 times lower for both 5'-cap and non-cap RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA, respectively, compared to yeast extract containing *wt* ribosomes. In addition to the initiation defect, the yeast extract containing Δ eB12 ribosomes also has a defect in the translation elongation phase, as a result of which the elongation rate of Δ eB12 ribosomes is 1.07 times slower than the elongation rate of *wt* ribosomes. For one translation cycle (containing the initiation, elongation, and termination phases), the yeast extract containing Δ eB12 ribosomes is 1.07 and 1.13 times slower (for both 5'-cap-dependent translation and IRES-mediated translation, respectively) than yeast extract containing *wt* ribosomes. Nevertheless, IRES-mediated translation in yeast extract that contains Δ eB12 ribosomes (for both 5'-cap and non-cap RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA) is 1.96- and 2.6-fold higher, respectively, than for yeast extract that contains *wt* ribosomes. The higher level of

IRES-mediated translation is explained by the fact that Δ eB12 ribosomes initiate 8.6 times more frequently from the IRES sequence than *wt* ribosomes do.

The importance of the integrity of the CrPV IGR IRES structure in initiating translation is confirmed by the results of in vitro association assay with *wt* 40S and *wt* or Δ eB12 60S ribosomal subunits. In the association assay, previously constructed vectors were used, from which the RNAs to be synthesized contain three different variants of CrPV IGR IRES: the first being the IGR IRES *wt* that contains wild-type IGR IRES; the second being the IGR IRES Δ PK, in which the nucleotides of the PKI GG (6214-6215) and PKIII CAC (6148-6150) of the pseudo-knots important for the binding of the IGR IRES and the 40S ribosomal subunit have been mutated to complementary CC and GUG nucleotides, respectively (in turn, the formation of the corresponding pseudo-nodes is disrupted); the third being the IGR IRES L1 mut, in which the GAUC (6038-6041) nucleotides (in the PK II L1.1 region that is essential for binding of IGR IRES to the 60S ribosomal subunit) are mutated to complementary CUAG nucleotides. In vitro association tests showed that IGR IRES L1 mut and IGR IRES Δ PK RNA do not have an association-promoting effect on wild-type 40S and 60S ribosomal subunits compared to IGR IRES WT RNA. IGR IRES Δ PK RNA also has no beneficial effect on the association of *wt* 40S and Δ eB12 60S ribosomal subunits. In contrast, IGR IRES L1 mut RNA is capable of forming 80S particles with weak subunit interaction at a concentration of 10 mM Mg^{2+} -ions. In conclusion, the eB12 bridge appears to be a negative regulator of IRES-mediated translation, because in the absence of the bridge, CrPV IGR IRES sequence-mediated translation becomes much more efficient.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid, Tiina Tamme ja Margus Leppikut suurepärase juhendamise ja kannatlikkuse eest. Veel sooviksin tänada Ivan Kislyt nii praktilise juhendamise kui ka katsete õnnestumisse panustatud aja eest.

Samuti soovin tänada oma vanemaid, Marika Bauerit ja Tõnu Kattelit, lõppematu toetuse eest õpingute vältel. Tänan ka molekulaarbioloogia ja üldise mikroobibiokeemia meeldivat ja toetavat seltskonda.

KASUTATUD ALLIKAD

Artiklid

Abeyrathne, P. D., Koh, C. S., Grant, T., Grigorieff, N., Korostelev, A. A. (2016). Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome. *eLife*. 5:e14874.

Agirrezabala, X., Frank, J. (2009). Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 42(3), 159–200.

Aitken, C. E., Beznoskova, P., Vlckova, V., Chiu, W. L., Zhou, F., Valasek, L. S., Hinnebusch, A. G., Lorsch, J. R. (2016). Eukaryotic translation initiation factor 3 plays distinct roles at the mRNA entry and exit channels of the ribosomal preinitiation complex. *eLife*. 5, e20934.

Algire, M. A., Maag, D., Lorsch, J. R. (2005). Pi release, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Molecular cell*. 20(2), 251–262.

Andersen, C. B., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., ... , Beckmann, R. (2006). Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature*, 443, 663–668.

Archer, S. K., Shirokikh, N. E., Hallwirth, C. V., Beilharz, T. H., Preiss, T. (2015). Probing the closed-loop model of mRNA translation in living cells. *RNA biology*. 12, 248–254.

Armache, J. P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., Becker, T., ... , Beckmann, R. (2010). Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-A cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 19754–19759.

Aylett, C. H., Boehringer, D., Erzberger, J. P., Schaefer, T., Ban, N. (2015). Structure of a yeast 40S-eIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex. *Nature structural & molecular biology*. 22, 269–271.

Babaylova, E., Graifer, D., Malygin, A., Stahl, J., Shatsky, I., Karpova, G. (2009). *Nucleic acids research*. 37(4), 1141–1151.

Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H., Dinman, J. D., Dragon, ... , Yusupov M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current opinion in structural biology*. 24, 165–169.

Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S. V., Londei, P., Ermler, U., Tampe, R. (2011). Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108, 3228–3233.

- Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T. V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P. A., Vos, M. R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P., Spahn, C. M. (2015). Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell*. 161(4), 845–857.
- Bertram, G., Bell, H. A., Ritchie, D. W., Fullerton, G., Stansfield, I. (2000). Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA*. 6(9), 1236-1247.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. 334, 1524-1529.
- Bock, L. V., Blau, C., Vaiana, A. C., Grubmüller, H. (2015). Dynamic contact network between ribosomal subunits enables rapid large-scale rotation during spontaneous translocation. *Nucleic acids research*. 43, 6747–6760.
- Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., Dokudovskaya, S. S., Lavrik, I. N. (1995). Structure and function of 5S rRNA in the ribosome. *Biochemistry and cell biology*. 73, 869-876.
- Bowen, A. M., Musalgaonkar, S., Moomau, C. A., Gulay, S. P., Mirvis, M., Dinman, J. D. (2015). Ribosomal protein uS19 mutants reveal its role in coordinating ribosome structure and function. *Translation*. 3, e1117703.
- Brilot, A. F., Korostelev, A. A., Ermolenko, D. N., Grigorieff, N. (2013). Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 20994–20999.
- Budkevich, T., Giesebrecht, J., Altman, R. B., Munro, J. B., Mielke, T., Nierhaus, K. H., Blanchard, S. C., Spahn, C. M. (2011). Structure and Dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex. *Molecular cell*. 44, 214-224.
- Bulygin, K., Chavatte, L., Frolova, L., Karpova, G., Favre, A. (2005). The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30, and S15. *Biochemistry*. 44, 2153–2162.
- Cigan, A. M., Feng, L., Donahue, T. F. (1988). tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science*. 242, 93-97.
- Costantino, D., and Kieft, J.S. (2005). A preformed compact ribosome-binding domain in the cricket paralysis-like virus IRES RNAs. *RNA*. 11, 332–343.
- Costantino, D. A., Pfingsten, J. S., Rambo, R. P., Kieft, J. S. (2008). tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nature Structural & Molecular Biology*. 15, 57–64.
- Dever, T. E., Dinman, J. D., Green, R. (2018). Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 10(8), a032649.
- Dever, T. E., Kinzy, T. G., Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 203, 65-107.

- Dresios, J., Panopoulos, P., Suzuki, K., Synetos, D. (2003). A dispensable yeast ribosomal protein optimizes peptidyltransferase activity and affects translocation. *The journal of biological chemistry*. 278, 3314-3322.
- Fernandez, I. S., Bai, X. C., Murshudov, G., Scheres, S. H., Ramakrishnan, V. (2014). Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell*. 157, 823–831.
- Filbin, M. E., Kieft, J. S. (2009). Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Current Opinion in Structural Biology*. 19, 267–276.
- Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., Kisselev, L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA*. 2, 334–341.
- Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., Tatkov, S. I., Kisselev, L. L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA*. 5(8), 1014-1020.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., ... , Frank, J. (2003). Study of the structural Dynamics of the E. coli 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*. 113, 789-801.
- Green, R., Samaha, R., Noller, H. (1997). Mutations at nucleotides G2251 and U2585 of 23 S rRNA perturb the peptidyl transferase center of the ribosome. *Journal of molecular biology*. 266(1), 40–50.
- Gromadski, K. B., Schummer, T., Stringaard, A., Knudsen, C. R., Kinzy, T. G., Rodnina, M. V. (2007). Kinetics of the interactions between yeast elongation factors 1A and 1B α , guanine nucleotides, and aminoacyl-tRNA. *The journal of biological chemistry*. 282, 35629-35637.
- Gulen, B., Petrov, A. S., Okafor, C. D., Vander Wood, D., O'Neill, E. B., Hud, N. V., Williams, L. D. (2016). Ribosomal small subunit domains radiate from a central core. *Scientific Reports*, 6:20885.
- Hellen, C. U. T. (2018). Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 10(10), a032656.
- Hertz, M. I., Thompson, S. R. (2011). In vivo functional analysis of the Dicistroviridae intergenic region internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research*. 39(16), 7276-7288.
- Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C. Trowitzsch, S., Preis, A., Kötter, P., Berninghausen, O., Becker, T., Beckmann, R., Tampe, R. (2017). Structure of the 40S–ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat Struct Mol Biol*. 24, 453–460.
- Hussain, T., Llacer, J. L., Fernandez, I. S., Munoz, A., Martin-Marcos, P., Savva, C. G., Lorsch, J. R., Hinnebusch, A. G., Ramakrishnan, V. (2014). Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex. *Cell*. 159, 587-607.

- Jackson, R. J., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11(2), 113-127.
- Jan, E., Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *Journal of Molecular Biology*. 324, 889–902.
- Jennings, M. D., Kershaw, C. J., Adomavicius, T., Pavitt, G. D. (2017). Fail-safe control of translation initiation by dissociation of eIF2a phosphorylated ternary complexes. *eLife*. 6, e24542.
- Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., Ramakrishnan, V. (2010). Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release. *Proc Natl Acad Sci*. 107, 8593–8598.
- Kanamori, Y., Nakashima, N. (2001). A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation. *RNA*. 7, 266–274.
- Kapp, L. D., Lorsch, J. R. (2004). GTP-dependent recognition of methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of molecular biology*. 335(4), 923-936.
- Kerr, C. H., Wang, Q. S., Moon, K.-M., Keatings, K., Allan, D. W., Foster, L. J., Jan, E. (2018). IRES-dependent ribosome repositioning directs translation of a +1 overlapping ORF that enhances viral infection. *Nucleic acids research*. 46(22), 11952-11967.
- Khairulina, J., Graifer, D., Bulygin, K., Ven'yaminova, A., Frolova, L., Karpova, G. (2010). Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation. *Biochimie*. 92, 820–825.
- Kipper, K., Hetenyi, C., Sild, S., Remme, J., Liiv, A. (2009). Ribosomal intersubunit bridge B2a is involved in factor-dependent translation initiation and translational processivity. *Journal of molecular biology*. 385, 405–422.
- Kisly, I., Gulay, S. P., Mäeorg, U., Dinman, J. D., Remme, J., Tamm, T. (2016). The functional role of eL19 and eB12 intersubunit bridge in the eukaryotic ribosome. *Journal of molecular biology*. 428(10), 2203-2216.
- Kisly, I., Kattel, C., Remme, J., Tamm, T. (2021). Luciferase-based reporter system for *in vitro* evaluation of elongation rate and processivity of ribosomes. *Nucleic acids research*. 49(10), e59.
- Kisly, I., Remme, J., Tamm, T. (2019). Ribosomal protein eL24, involved in two intersubunit bridges, stimulates translation initiation and elongation. *Nucleic acids research*. 47(1), 406-420.
- Klein, D. J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *Journal of molecular biology*. 340, 141-177.

- Landry, D. M., Hertz, M. I., Thompson, S. R. (2009). PS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes & development*. 23(23), 2753-2764.
- Liu, Q., Fredrick, K. (2013). Contribution of intersubunit bridges to the energy barrier of ribosomal translocation. *Nucleic acids research*. 41, 565–574.
- Llacer, J. L., Hussain, T., Marler, L., Aitken, C. E., Thakur, A., Lorsch, J. R., Hinnebusch, A. G., Ramakrishnan, V. (2015). Conformational differences between open and closed states of the eukaryotic translation initiation complex. *Molecular cell*. 59, 399-412.
- Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., Korostelev, A. A. (2017). Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity. *Nature*. 546, 113-117.
- Majumdar, R., Maitra, U. (2005). Regulation of GTP hydrolysis prior to ribosomal AUG selection during eukaryotic translation initiation. *EMBO J*. 24(21), 3737-3746.
- McCaughan, K. K., Brown, C. M., Dalphin, M. E., Berry, M. J., Tate, W. P. (1995). Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci*. 92, 5431–5435.
- Merrick, W. C., Pavitt, G. D. (2018). Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 10(12), a033092.
- Meskauskas, A., Harger, J. W., Jacobs, K. L., Dinman, J. D. (2003). Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*. 9, 982-992.
- Moazed, D., Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*. 342(6246), 142-148.
- Muhs, M., Hilal, T., Mielke, T., Skabkin, M. A., Sanbonmatsu, K. Y., Pestova, T. V., Spahn, C. M. (2015). Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES. *Molecular Cell*. 57, 422–432.
- Musalgaonkar, S., Moomau, C. A., Dinman, J. D. (2014). Ribosomes in the balance: structural equilibrium ensures translational fidelity and proper gene expression. *Nucleic acids research*. 42, 13384–13392.
- Murray, J., Savva, C. G., Shin, B. S., Dever, T. E., Ramakrishnan, V., Fernandez, I. S. (2016). Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *eLife*. 5, e13567.
- Nilsson, O. B., Hedman, R., Marino, J., Wickles, S., Bischoff, L., Johansson, M., Müller-Lucks, A., Trovato, ... , O'Brien, E. P. (2015). Cotranslational protein folding inside the ribosome exit tunnel. *Cell Rep.*. 12, 1533-1540.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289, 920-930.

- Noller, H. F., Hoffarth, V., Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256(5062), 1416–1419.
- Noller, H. F., Lancaster, L., Zhou, J., Mohan, S. (2017). The ribosome moves: RNA mechanics and translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 24, 1021–1027.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. 292, 897–902.
- O’Leary, S. E., Petrov, A., Chen, J., Puglisi, J. D. (2013). Dynamic recognition of the mRNA cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. *Structure*. 21, 2197–2207.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Molecular cell*. 26(1), 41–50.
- Pavitt, G. D., Ramaiah, K. V., Kimball, S. R., Hinnebusch, A. G. (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes & development*. 12(4), 514–526.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Gulen, B., Waterbury, C. C., ... , Williams, L. D. (2014). Secondary structures of rRNAs from all three domains of life. *PLOS ONE*. 9(2), e88222.
- Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O’Leary, S. E., Puglisi, J. D. (2016). Multiple parallel pathways of translation initiation on the CrPV IRES. *Molecular Cell*. 62, 92–103.
- Pisarev, A. V., Hellen, C. U., Pestova, T.V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*. 131, 289–299.
- Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., Skabkina, O. V., Rakotondrafara, A. M., Hentze, M. W., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell*. 37, 196–210.
- Pisareva, V. P., Pisarev, A. V., Fernandez, I. S. (2018). Dual tRNA mimicry in the Cricket Paralysis Virus IRES uncovers an unexpected similarity with the Hepatitis C Virus IRES. *eLife*. 7, e34062.
- Poirot, O., Timsit, Y. (2016). Neuron-like networks between ribosomal proteins within the ribosome. *Scientific reports*. 6, 26485.
- Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D. E., Berninghausen, O., Green, R., Becker, T., Beckmann, R. (2014). Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell Rep*. 8, 59–65.
- Rakauskaite, R., Dinman, J. D. (2006). An arc of unpaired "hinge bases" facilitates information exchange among functional centers of the ribosome. *Molecular and cellular biology*. 26, 8992–9002.

- Ratje, A. H., Loerke, J., Mikolajka, A., Br  nner, M., Hildebrand, P., ... , Spahn, C. M. T. (2010). Head swivel on the ribosome facilitates translocation via intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature*. 468, 713-716.
- Reblova, K., Sponer, J., Lankas, J. (2012). Structure and mechanical properties of the ribosomal L1 stalk three-way junction. *Nucleic acids research*. 40, 6290-6303.
- Rodnina, M. V., Beringer, M., Wintermeyer, W. (2007). How ribosomes make peptide bonds. *Trends in biochemical sciences*. 32, 20-26.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and cellular biology*. 10, 1134-1144.
- Sergiev, P. V., Kiparisov, S. V., Burakovsky, D. E., Lesnyak, D. V., Leonov, A. A., Bogdanov, A. A., Dontsova, O.A. (2005). The conserved A-site finger of the 23S rRNA: just one of the intersubunit bridges or a part of the allosteric communication pathway? *Journal of molecular biology*. 353, 116–123.
- Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., Hegde, R. S. (2016). Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes. *Cell*. 167(5), 1229-1240.
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K. M., Genuth, N. R., R  st, H. L., Teruel, M. N., Barna, M. (2017). Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Molecular cell*. 67 (1), 3-4.
- Shin, B. S., Katoh, T., Gutierrez, E., Kim, J. R., Suga, H., Dever, T. E. (2017). Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic acids research*. 45(14), 8392-8402.
- Smith, M. W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergeiev, P. V., Dinman, J. D. (2001). Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 21, 8264-8275.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* – tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*. 107, 373-386.
- Sokabe, M., Fraser, C. S., (2014). Human eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAⁱ ternary kompleks and eIF3 stabilize the 43S preinitiation complex. *Journal of biological chemistry*. 289(46), 31827-31836.
- Sun, Q., Vila-Sanjurjo, A., O'Connor, M. (2011). Mutations in the intersubunit bridge regions of 16S rRNA affect decoding and subunit-subunit interactions on the 70S ribosome. *Nucleic acids research*. 39, 3321-3330.
- Svidritskiy, E., Brilot, A. F., Koh, C. S., Grigorieff, N., Korostelev, A. A. (2014). Structures of yeast 80S ribosome-tRNA complexes in the rotated and nonrotated conformations. *Structure*. 22, 1210-1218.

Tamm, T., Kisly, I., Remme, J. (2019). Functional interactions of ribosomal intersubunit bridges in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 213(4), 1329-1339.

Taylor, D. J., Nilsson, J., Merrill, A. R., Andersen, G. R., Nissen, P., Frank, J. (2007). Structures of modified eEF2:80S ribosome complexes reveal the role of GRP hydrolysis in translocation. *EMBO J.* 26(9), 2421-2431.

Tchorzewski, M., Krokowski, D., Boguszewska, A., Liljas, A., Grankowski, N. (2003). Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A- P2B heterocomplex. *Biochemistry*. 42, 3399–3408.

Tourigny, D. S., Fernandez, I. S., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2013). Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science*. 340, 1235490.

Trabuco, L. G., Schreiner, E., Eargle, J., Cornish, P., Ha, T., Luthey-Schulten Z., Schulten, K. (2010). The role of L1 stalk-tRNA interaction in the ribosome elongation cycle. *Journal of molecular biology*. 402, 741-760.

Unbehaun, A., Borukhov, S. I., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes & development*. 18, 3078–3093.

Valasek, L. S., Zeman, J., Wagner, S., Beznoskova, P., Pavlikova, Z., Mohammad, M. P., Hronova, V., Herrmannova, A., Hashem, Y., Gunisova, S. (2017). Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle. *Nucleic acids research*. 45, 10948-10968.

Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2010). The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Science*. 330, 835-838.

Wang, Q. S., Au, H. H. T., Jan, E. (2013). Methods for studying IRES-mediated translation of positive-strand RNA viruses. *Methods*. 59(2), 167-179.

Wawiora, L., Molestak, E., Szajwai, M., Michalec-Wawiora, B., Molon, M., Borkiewicz, L., Grela, P., Boguszewska, A., Tchorzewski, M. (2017). Multiplication of ribosomal P-stalk proteins contributes to the fidelity of translation. *Molecular and cellular biology*. 37(17): e00060-17.

Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular cell*. 2, 135-140.

Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Sarnow, P. (2000a). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell*. 102, 511–520.

Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., Sarnow, P. (2000b). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Molecular and cellular biology*. 20(14), 4990-4999.

Yamamoto, H., Unbehaun, A., Loerke, J., Behrmann, E., Collier, M., Bürger, J., Mielke, T., Spahn, C. M. T. (2014). Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA. *Nature structural & molecular biology*. 21(8), 721-727.

Yamamoto, H., Unbehaun, A., Spahn, C. M. T. (2017). Ribosomal chamber music: toward an understanding of IRES Mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences*. 42, 655–668.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller, H. F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883–896.

Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtormov, S., Kisselev, L., Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J*. 14, 4065–4072.

Raamatud ja diplomitööd

Kisly, I. The pleiotropic functions of ribosomal proteins eL19 and eL24 in the budding yeast ribosome. 2019. Tartu Ülikool.

Nierhaus, K. H., Spahn, C., Burkhardt, N., Dabrowski, M., Diedrich, G., Einfeldt, E., Kamp, D., ..., Schafer, M. A. The ribosome structure, function, antibiotics, and cellular interactions. 2000. ASM Press, Washington, DC.

LISAD

Lisa 1. Aminohapete segu koostis.

Aminohape	Kogus
Ala (168 mM)	1,44 µl
Arg (168 mM)	1,44 µl
Asn (168 mM)	1,44 µl
Asp (168 mM)	1,44 µl
Gln (168 mM)	1,44 µl
Glu (168 mM)	1,44 µl
Gly (168 mM)	1,44 µl
His (168 mM)	1,44 µl
Ile (168 mM)	1,44 µl
Lys (168 mM)	1,44 µl
Met (168 mM)	1,44 µl
Phe (168 mM)	1,44 µl
Pro (168 mM)	1,44 µl
Ser (168 mM)	1,44 µl
Thr (168 mM)	1,44 µl
Val (168 mM)	1,44 µl
Trp (168 mM)	1,44 µl
Tyr (168 mM)	1,44 µl
Leu (140 mM)	1,72 µl
Cys (168 mM)	1,44 µl

Lisa 2. 5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni RLuc-i ja FLuc-i regressioonisirgete platoode, tõusude ja 60. reaktsiooniminutite keskmised ($\pm$ standardhälbed) *wt* ja Δ B12 pärmiekstraktides.

5'-cap-itud RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA	<i>wt</i> pärmiekstrakt		Δ B12 pärmiekstrakt	
	RLuc	FLuc	RLuc	FLuc
Platoo keskmine (RLU $\pm$ standardhälve)	207169,5 $\pm$ 10254,91	290,63 $\pm$ 22,27	47451,66 $\pm$ 3328,47	569 $\pm$ 35,53
Tõusude keskmine ($\pm$ standardhälve)	7493,44 $\pm$ 1300,49	13,68 $\pm$ 6,11	1217,89 $\pm$ 182,21	14,37 $\pm$ 1,68
60. reaktsiooniminuti keskmine luminescents (RLU $\pm$ standardhälve)	201849,8 $\pm$ 34678,59	282,38 $\pm$ 31,45	46485,5 $\pm$ 6436,81	560 $\pm$ 48,41

Lisa 3. „cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni RLuc-i ja FLuc-i regressioonisirgete platoode ja tõusude keskmised ($\pm$ standardhälbed) *wt* ja Δ B12 pärmiekstraktides.

„cap“-ita RLuc-IGR-IRES-FLuc mRNA	<i>wt</i> pärmiekstrakt		Δ B12 pärmiekstrakt	
	RLuc	FLuc	RLuc	FLuc
Platoo keskmine (RLU $\pm$ standardhälve)	2373,97 $\pm$ 140,79	508,34 $\pm$ 26,27	763,47 $\pm$ 46,84	1318,5 $\pm$ 70,72
Tõusude keskmine ($\pm$ standardhälve)	66,08 $\pm$ 11,25	33,58 $\pm$ 7,81	16,36 $\pm$ 2,66	31,87 $\pm$ 5,31

Lisa 4. RLuc-IGR-IRES_{mut}-FLuc mRNA *in vitro* translatsiooni reaktsiooni RLuc-i regressioonisirgete platoode ja tõusude keskmised ($\pm$ standardhälbed) Δ B12 pärmiekstraktis

RLuc-IGR-IRES _{mut} -FLuc mRNA	Δ B12 pärmiekstrakt	
	5'-cap-itud mRNA RLuc	„cap“-ita mRNA RLuc
Platoo keskmine (RLU $\pm$ standardhälve)	59145,25 $\pm$ 5048,12	805,59 $\pm$ 49,36
Tõusude keskmine ($\pm$ standardhälve)	1372,86 $\pm$ 214,94	15,94 $\pm$ 0,94

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Carolin Kattel (02.06.1996),

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

“ Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikutevahelise silla eB12 olulisus
IRES-vahendatud translatsioonis“,

mille juhendajateks on PhD Tiina Tamm ja PhD Margus Leppik,

1.1. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace lisamise
eesmärgil kuni autoriõiguste kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu
Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i
litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida,
levitada ja üldsusele suunata ning keelab tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil,
alates **11.08.2024** kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Carolin Kattel 11.08.2021