

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

***Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev *in vivo* reportersüsteem translatsiooni analüüsimiseks pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Patrick Busch

Juhendaja PhD Tiina Tamm

Tartu 2025

# INFOLEHT

## ***Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev *in vivo* reportersüsteem translatsiooni analüüsimiseks pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Ribosoomid on valkudest ja RNA-st koosnevad makromolekulaarsed masinad. Ribosoomide elongatsioonikiiruse ja protsessiivsuse määramiseks *in vitro* kasutatakse *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalgust koosnevat reportersüsteemi. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada sarnane kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem, mida saaks kasutada ribosoomide translatsiooni hindamiseks *in vivo*. Selleks konstrueeriti pärmigenoomi integreeritavad plasmiidid, mis sisaldasid lutsiferaaside reportereid *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc*. Nende plasmiidide viimisel pärmigenoomi saadi tüved, mida kasutati ribosoomide elongatsioonikiiruse analüüsimiseks.

**Märksõnad:** ribosoom, *Renilla* lutsiferaas, *firefly* lutsiferaas, pagaripärm, reportersüsteem

**CERCS koodid:** P310 Proteiinid, ensümolooogia; P320 Nukleiinhappe süntees, proteiinisüntees; T490 Biotehnoloogia

## ***In vivo* reporter system based on *Renilla* and *firefly* luciferases for translation analysis in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Ribosomes are macromolecular machines composed of RNA and protein molecules. A reporter system consisting of *Renilla* and *firefly* luciferase fusion proteins was used to evaluate the ribosome elongation rates and processivity *in vitro*. This study aimed to develop a similar reporter system based on two luciferases that could be used to assess ribosome translation *in vivo*. To this end, integrated plasmids containing the luciferase reporters *Rluc-Fluc* and *Rluc-2xSNF7-Fluc* were constructed. Introducing these plasmids into the yeast genome yielded strains that were then used to analyse ribosome elongation rates.

**Keywords:** ribosome, *Renilla* luciferase, *firefly* luciferase, baker's yeast, reporter system.

**CERCS codes:** P310 Proteins, enzymology; P320 Nucleic acid synthesis, protein synthesis; T490 Biotechnology

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist .....	7
1.1.1. Ribosoomi peptidültransferaasi tsepter .....	7
1.2. rRNA modifikatsioonid .....	9
1.2.1. Box C/D snoRNP-d .....	11
1.2.2. Box H/ACA snoRNP-d.....	12
1.3. Konserveerunud rRNA modifikatsioonid pagaripärmi PTC-s .....	13
1.3.1. <i>S. cerevisiae</i> tüvi <i>3ΔsnR nop2* spb1*</i> .....	16
1.4. Lutsiferaasidel põhinevad reportersüsteemid .....	16
1.4.1. Kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem.....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärgid .....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Kasutatud söötmed .....	20
2.2.2. Töös kasutatud <i>S. cerevisiae</i> plasmiidid.....	21
2.2.3. Lutsiferaasi geenide paljundamiseks ja koloonia-PCR-iks kasutatud praimerid ...	22
2.2.4. Töös kasutatud <i>S. cerevisiae</i> ja <i>E. coli</i> tüved.....	22
2.2.5. Lutsiferaasi geenide paljundamine .....	24
2.2.6. Lutsiferaasi geenide ja vektorplasmidi pRS306-GAL <sub>prom</sub> -FBA1 <sub>term</sub> restriksioon .....	24
2.2.7. Lutsiferaasi geenide ligeerimine pRS306-GAL <sub>prom</sub> -FBA1 <sub>term</sub> vektorplasmidi .....	25
2.2.8. Transformatsioon <i>E. coli</i> tüvesse DH5α.....	25
2.2.9. Saadud bakterikolooniate kontroll.....	26
2.2.10. Bakterikolooniatest plasmiidse DNA eraldamine ja kontrollimine.....	26
2.2.11. Konstrueeritud plasmiidide lõikamine restriksiooniga .....	27
2.2.12. Plasmiidide transformatsioon pagaripärmi rakkudesse .....	27
2.3. Tulemused.....	31
2.3.1. Pärmigenoomi integreeritavate plasmiidide konstrueerimine .....	31

2.3.2. Lutsiferaaside geene ekspresseerivate pagaripärmi tüvede konstrueerimine .....	35
2.3.3. Esmase luminesentsi signaali määramine .....	39
2.3.4. Metsiktüübi ja mutantsete ribosoomide elongatsioonikiiruste võrdlemine .....	42
2.4. Arutelu .....	43
KOKKUVÕTE .....	47
SUMMARY .....	48
TÄNUSÕNAD .....	50
KASUTATUD KIRJANDUS .....	51
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	54
LISAD .....	55
Lisa 1. ....	55
Lisa 2. ....	56
Lisa 3. ....	57
LIHTLITSENTS .....	58

## KASUTATUD LÜHENDID

2xYT - kahekordne pärmiekstrakti ja trüptooni sööde

Amp - ampitsilliin

CFPS – rakuvaba valgusüntees (ingl *cell-free protein synthesis system*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

Fluc – firefly lutsiferaas

Gluc – *Gaussia* lutsiferaas

LB – Luria-Bertani sööde

Nluc - nanolutsiferaas

nt - nukleotiid

PEG - polüetüleenglükool

PTC – peptidüültransferaasne keskus

Rluc – *Renilla* lutsiferaas

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

snoRNA – väikese tuumakese RNA (ingl *small nucleolar RNA*)

TBE – Tris, boorhape, EDTA

TE – Tris, EDTA

TFA – esmane lutsiferaasi aktiivsuse teke (ingl *time of the first appearance*)

U – ühik (ingl *unit*)

YPD – pärmiekstrakti, peptooni ja dekstroosi sööde

rRNA – ribosomaalne RNA

tRNA – transport-RNA (ingl *transfer-RNA*)

mRNA – RNA matriitsahel (ingl *messenger-RNA*)

snoRNP – väikese tuumakese ribonukleoproteiinid (ingl *small nucleolar ribonucleoprotein*)

RLU – suhteline valguse ühik (ingl *Relative Light Unit*)

BSA - veise albumiin seerum (ingl *Bovine Serum Albumin*)

MCS – polülinker (ingl *Multiple Cloning Site*)

## SISSEJUHATUS

Ribosoomid on makromolekulaarsed masinad, mille peamiseks funktsiooniks on valgusüntees. Nende põhistruktuur koosneb ribosomaalsetest RNA molekulidest (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud). Ribosoomides on mitmed funktsionaalsed keskused: dekodeerimise keskus, transport-RNA-de (tRNA) seondumise kohad ja peptidüültransferaasne tšenter (PTC). PTC piirkonnas viiakse läbi peptidüül-tRNA ja aminoatsüül-tRNA vahelist estersideme aminolüüsi, mille tulemusena moodustub peptiidside (Simonović ja Steitz, 2009).

RNA modifikatsioonid on looduses laialt levinud. Nende põhifunktsiooniks on piiratud RNA topoloogiliste omaduste laiendamine. Need modifikatsioonid lisavad nukleotiididele vesiniksidemete tekkimise võimalust, mille tulemusena stabiliseerub RNA struktuur. Ribosoomis sisaldavate rRNA-de modifikatsioonid on klasterunud funktsionaalselt olulistesse regioonidesse nagu dekodeerimise keskus ja PTC (Sharma ja Lafontaine, 2015). Pagaripärmi ribosoomi PTC piirkonnas on neli universaalselt konserveerunud modifikatsiooni. Varasemalt on uuritud nende modifikatsioonide olulisust. Saadud tulemustest leiti, et nende puudumisel on pagaripärmi rakkudel aeglasem kasvukiirus ja madalam globaalne translatsioonitase, kuid suurenenud on rakkude temperatuuritundlikkus ja translatsioonitäpsus (Leppik jt., 2024).

Geeniekspressiooni uurimiseks on molekulaarbioloogias laialdaselt kasutusel kahel lutsiferaasil põhinevad süsteemid. Ribosoomide translatsiooni uurimiseks *in vitro* on välja töötatud *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev reportersüsteem (Kisly jt., 2021). Selles süsteemis kasutati reporterina *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalku. Selline kahel lutsiferaasil töötav reportersüsteem võimaldab uurida ning eristada translatsioonis initsiatsiooni ja elongatsiooni etappe. Lutsiferaase kodeerivate järjestuste vahele on võimalik sisestada lisajärjestusi, mille abil saab määrata ribosoomide elongatsioonikiirust.

Käesoleva töö põhieesmärgiks on töötada välja *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalgul põhinev reportersüsteem, millega saaks hinnata ribosoomide elongatsioonikiirust *in vivo*. Selle süsteemi loomiseks konstrueeriti lutsiferaaside geene sisaldavad plasmiidid. Need integreeriti pagaripärmi metsitüüpi tüvesse või mutantssesse tüvesse, millel puudusid rRNA modifikatsioonid PTC piirkonnas. Rakkudest mõõdeti lutsiferaaside aktiivsused ning hinnati metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide elongatsioonikiirusi.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Ülevaade eukarüootsest ribosoomist

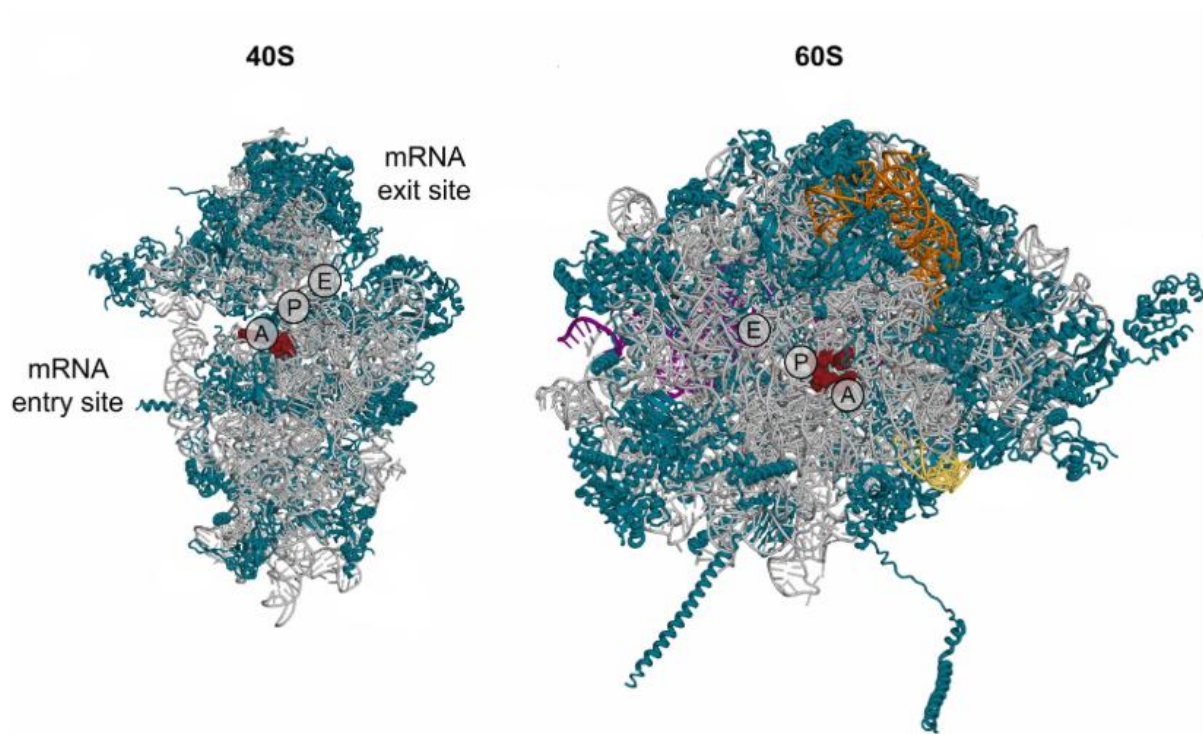
Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ribonukleoproteiinide kompleksid, mille põhistruktuur koosneb ribosomaalsetest RNA molekulidest (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud). Koos moodustavad need molekulaarse masina, mille peamiseks funktsiooniks on translatsiooniks vajaliku informatsiooni tõlkimine matriitsahelalt ehk mRNA (ingl *messenger*-RNA) pealt. Selle protsessi tulemusena sünteesitakse polüpeptiidi ahel.

Kõik ribosoomid koosnevad kahest subühikust, seetõttu jagatakse neid sedimentatsiooni koefitsiendi alusel kaheks – suur subühik (60S) ja väike subühik (40S). Eukarüootides 60S subühik koosneb kolmest erinevast rRNA-st (5.8S, 5S ja 25S) ja 46-st r-valgust ning 40S subühik koosneb ühest 18S rRNA-st ja 33 r-valgust (Ben-Shem jt., 2011). Nendel kahel subühikul on omakorda olulised funktsioonid. 40S subühikus asub dekodeerimistsenter, mis vastutab õige startkoodoni ära tundmise ning mRNA koodoni ja aminoatsüül-tRNA antikoodoni täpse paardumise eest (Sergiev jt., 2018). 60S subühikus asub peptidüültransferaasne tsenter (PTC), mis vastutab peptiidsideme moodustumise eest aminohapete vahel (Green ja Noller, 1997) (Joonis 1). 40S ja 60S subühikud moodustavad koos transleeriva ribosoomi 80S. Translatsiooni initsiatsiooni elongatsiooni etapil on veel vajalikud tRNA-d (transport-RNA-d), mille küljes on aminohape. Ribosoomis on nende tRNA-de jaoks kolm seondumissaiti – A-, P- ja E-sait (Green ja Noller, 1997) (Joonis 1). A-saiti seonduvad aminoatsüül-tRNA-d, P-saiti seonduvad peptidüül-tRNA-d, mille küljes on kasvav peptiidahel ning E-saidist väljuvad deatsetüleeritud tRNA-d.

### 1.1.1. Ribosoomi peptidüültransferaasi tsenter

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ribosoomi suures subühikus asuvat 25S rRNA-d saab jaotada sekundaarstruktuuri põhjal seitsmeks domeeniks (0, I-VI) (*RibosomeGallery*, <http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery>). Domeenis V asub funktsionaalselt oluline regioon, PTC. Samuti asub domeenis V kasvava peptiidahela väljumistunneli algus (Tirumalai jt., 2021). PTC-s on funktsionaalselt olulised struktuurid nagu A-ling, mis seob A-saidis oleva aminoatsüül-tRNA 3' CCA otsa ja P-ling, mis seob P-saidis oleva peptidüül-tRNA

3' CCA otsa. Need struktuurid võimaldavad aminoatsüül-tRNA  $\alpha$ -aminorühmal reageerida peptidüül-tRNA karbonüül süsinikuga. Selle tulemusena toimub estersideme aminolüüs ning moodustub uus peptiidside (Simonović ja Steitz, 2009).



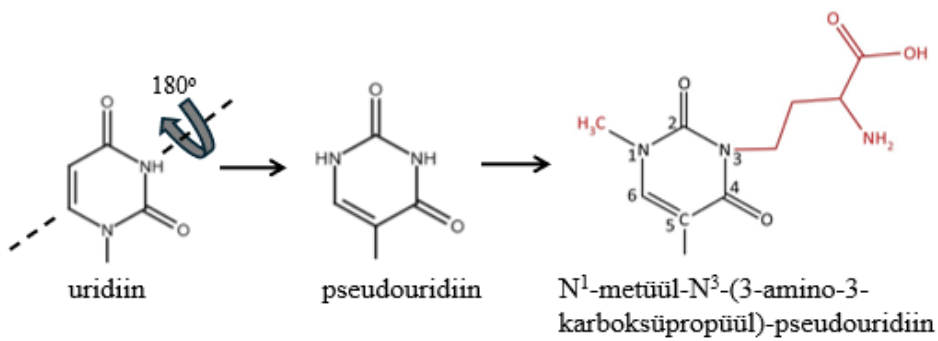
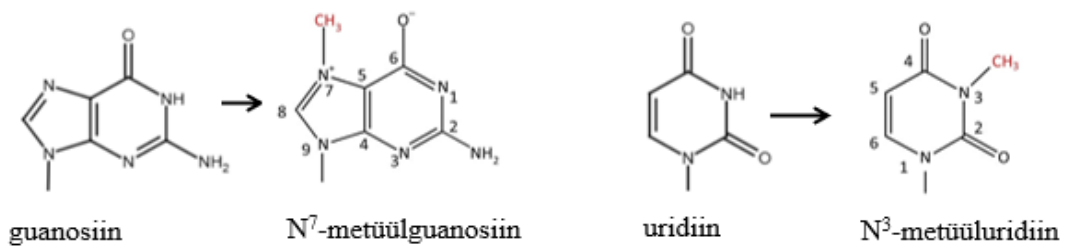
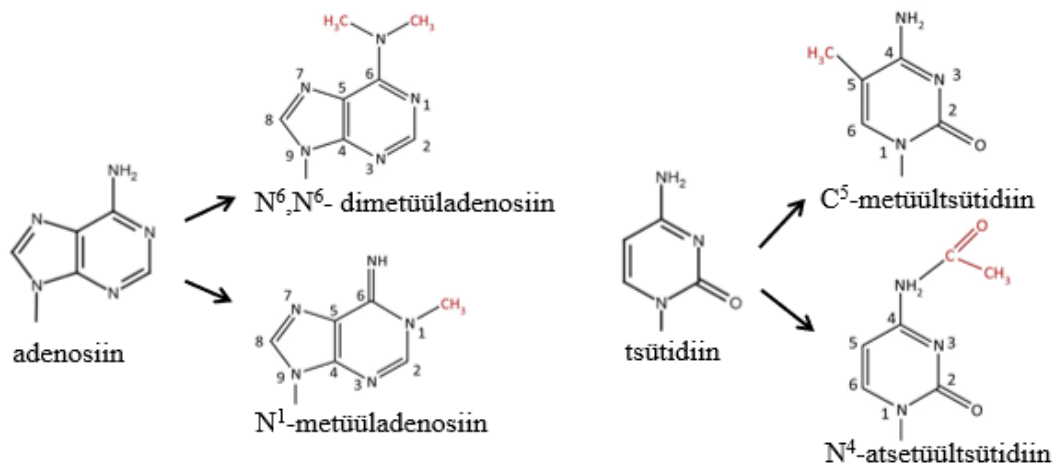
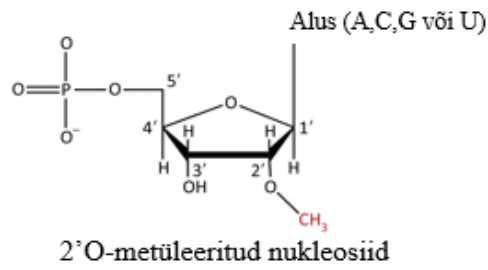
**Joonis 1. *S. cerevisiae* ribosoomi subühikud.** Eukarüoodi *S. cerevisiae* 40S väike subühik ja 60S suur subühik. rRNA on näidatud hallina ning r-valgud sinisena. Punasega on toodud väikses subühikus asuv dekodeerimistsenter ja suurel subühikul peptidüültransferaasne tsenter. Oranži ja lillaga on vastavalt märgitud 5S ja 5.8S rRNA. Lisaks on veel näidatud A-, P- ja E-saidid tRNA seondumiseks ning mRNA sisenemis- ja väljumiskohad. Joonis on kohandatud Kisly ja Tamm (2023) järgi.

## 1.2. rRNA modifikatsioonid

RNA modifikatsioonid on üldlevinud tunnus, mida leidub kõigis kolmes elu domeenis (Sergiev jt., 2018). Nende modifikatsioonide põhiliseks ülesandeks on optimeerida bioloogilisi funktsioone, laiendades piiratud RNA topoloogilisi omadusi. Need modifikatsioonid omakorda stabiliseerivad RNA struktuuri ja nende nukleotiidsete aluste interaktsioone teiste makromolekulidega tekitades juurde vesiniksidemeid (Sharma ja Lafontaine, 2015).

Ribosoomides leiduvad RNA-de modifikatsioonid on klasterdunud funktsionaalselt olulistesse regioonidesse nagu PTC, dekodeerimistsenter ja subühikute vahelised kontaktide piirkonnad (Sharma ja Lafontaine, 2015). Veel need modifikatsioonid optimiseerivad rRNA interaktsioone mRNA, tRNA ja translatsiooni faktoritega. Kuigi ribosoomi põhistruktuur on püsinud konserveerununa, on evolutsiooni käigus lisandunud rRNA modifikatsioonid juurde (Taoka jt., 2018).

On avastatud, et pagaripärmis metüültransferaasid modifitseerivad nukleotiidide üheksast erinevat kohast ja atsetüültransferaas modifitseerib ühest kohast. Ribosoomi suures ühikus on metüülrühmade lisamise tulemusena tekkinud kuus erinevat modifitseeritud nukleotiidi varianti ning väikse subühiku 18S rRNA-l on atsetüleerimise tulemusena tekkinud üks modifitseeritud nukleotiidi variant (Sharma ja Lafontaine, 2015). Nende modifikatsioonide põhiliseks funktsiooniks on lisada võimalust vesiniksidemete tekkimiseks. Metüültransferaasid võivad lisada metüülrühma riboosi 2' hüdroksüülrühma või puriini ja pürimidiini külge. Nende modifikatsioonide tulemusena sünteesitakse 2'O-metüleeritud nukleosiid, N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetüüladenosiin, N<sup>1</sup>-metüüladenosiin, N<sup>7</sup>-metüülguanosiin, C<sup>5</sup>-metüültsütidiin või N<sup>3</sup>-metüüluridiin. Atsetüültransferaas lisab atsetüülrühma tsütidiini külge, mille tulemusena sünteesitakse N<sup>4</sup>-atsetüültsütidiin (Joonis 2). Vesiniksideme lisab ka pseudouridüleerimine, mille käigus pööratakse uridiini 180° ümber aluse kuuenda süsiniku ja kolmanda lämmastiku telje. Selle modifikatsiooni tulemusena sünteesitakse pseudouridiin. Pseudouridiini külge võidakse veel lisada metüülrühm ja 3-amino-3-karboksüpropüül, mille käigus tekib N<sup>1</sup>-metüül-N<sup>3</sup>-(3-amino-3-karboksüpropüül)-pseudouridiin (Joonis 2). Nende modifikatsioonide käigus suurenevad aluste hüdrofoobsused ja lisanduvad vesiniksidemed, mis võivad soodustada lämmastikaluste vertikaalset interaktsiooni (ingl *base stacking*), stabiilse või alternatiivse RNA struktuuri tekkimist (Sharma ja Lafontaine, 2015).

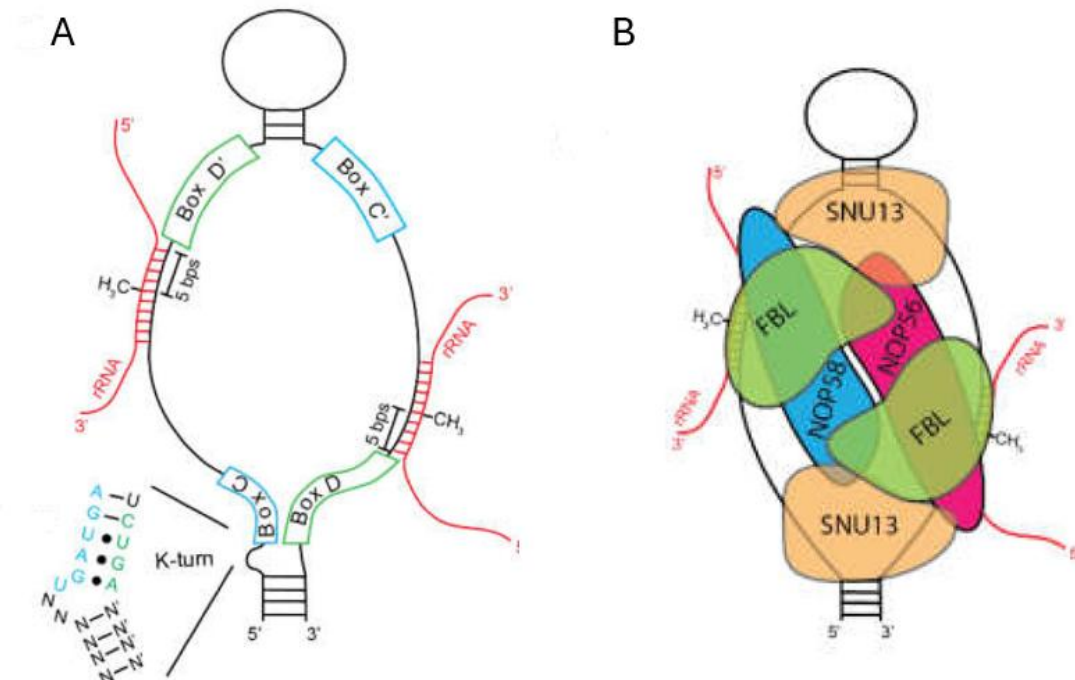


**Joonis 2. Pagaripärmi RNA modifikatsioonid.** Pagaripärmi üheksa modifitseeritud nukleotiidi varianti. Punasega on tähistatud aatomid, mida on lisatud modifikatsiooni tulemusena. Joonis kohandatud Sharma ja Lafontaine (2015) järgi.

Pseudouridiinid ( $\Psi$ ) ja 2'-O-metülatsioonid on kõige levinumad rRNA modifikatsioonid, mille lisamist viivad tavaliselt läbi väikesed tuumakese ribonukleoproteiinid (snoRNP-d). Need snoRNP-d koosnevad põhiliselt kahest komponendist – snoRNA-st, mille järjestus tunneb ära sihtmärk nukleotiidi, ja valgulisest kompleksist, mis viivad läbi nukleotiidi modifikatsiooni. snoRNP-del on oluline roll ribosoomide biogeneesis, kus protsessitakse rRNA-sid (Woolford ja Baserga, 2013). Lisaks võivad snoRNP-d reguleerida alternatiivset splaissimist sarnaselt miRNA-dele (Huang jt., 2022). Üldiselt jaotatakse modifikatsiooni tüübi ja konserveerunud snoRNA järjestuste elementide alusel snoRNP-d kahte suurde klassi: Box C/D ja Box H/ACA (Webster ja Ghalei, 2023).

### 1.2.1. Box C/D snoRNP-d

Box C/D snoRNP-d koosnevad konserveerunud järjestuste motiivide paarist, mis asuvad snoRNA juuksenõela struktuuri sisemises lingus ja valgulisest kompleksist, mis metüleerib rRNA riboosi 2' hüdroksüülrühma (Joonis 3). Box C/D snoRNA sisaldab kahte konserveerunud järjestuse motiivi: Box C, mille järjestuseks on RUGAUGA (R tähistab siin puriini) ja Box D, mis sisaldab järjestust CUGA. Need järjestused esinevad snoRNA-s kaks korda ning neid paare kutsutakse Box C/C' ja Box D/D'. Box C ja D järjestused on võimelised moodustama *K-turn* motiivi paardudes üksteisega. Box C/D snoRNA-d seovad valgulist kompleksi, mis koosneb kuuest konserveerunud subühikust: fibrillarini (FBL) (pagaripärmis Nop1), SNU13, NOP58 ja NOP56. SNU13 ja FBL on kompleksis kahe subühikuna. Katalüütiline subühik on FBL, mis metüleerib riboosi 2'-hüdroksüülrühma. SNU13 valk tunneb ära Box C ja D vahelise *K-turn* motiivi ning seondub sellega. Seejärel saab värvata ülejäänud Box C/D snoRNP faktorid (Ojha jt., 2020). Selle töö raames on olulised Box C/D snoRNA-d snR52 ja snR67 (vaata alampeatükki 2.2.4).

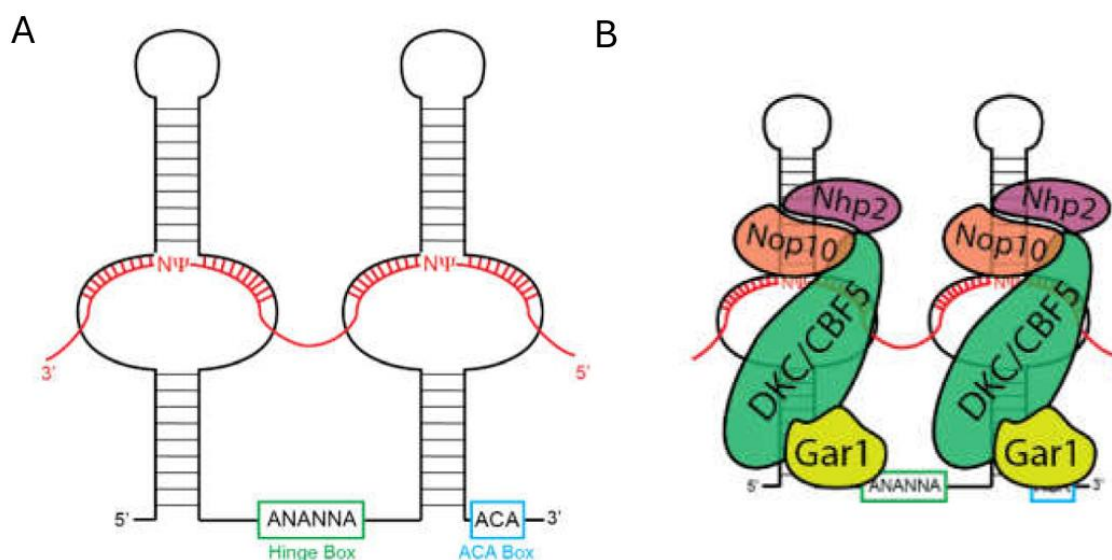


**Joonis 3. Ülevaade box C/D snoRNP struktuurist.** **A**, Box C/D sekundaarstruktuur, kus on näidatud Box C/C' (sinine), Box D/D' (roheline) ja seonduva rRNA (punane) asukohad. Box D/D'-st viie aluspaari kaugusel on näidatud metüleeritava nukleotiidi positsioon. **B**, Box C/D snoRNA külge seonduvad konserveerunud subühikud – NOP56, NOP58, (2x) FBL ja (2x) SNU13. Katalüütiline subühik on FBL. Joonis on kohandatud Ojha jt. (2020) järgi.

### 1.2.2. Box H/ACA snoRNP-d

Box H/ACA snoRNP-d viivad läbi uridiini isomerisatsiooni pseudouridiiniks ( $\Psi$ ). Pseudouridiini isomerisatsiooni käigus pööratakse uridiin  $180^\circ$  ümber aluse kuuenda süsiniku ja kolmanda lämmastiku telje tekitades juurde ühe vesiniksideme. Box H/ACA snoRNA koosneb kahest juuksenõela struktuurist, mis on omavahel eraldatud “hingega” ehk H box-iga, mis sisaldab konserveerunud ANANNA järjestust (Joonis 4). Box H/ACA snoRNA juuksenõela struktuurides esinevad veel sisemised lingud. Sarnaselt Box C/D-le, sisaldavad need sisemised lingud rRNA-ga seonduvaid järjestusi, mis juhivad snoRNP kompleksi modifitseeritava nukleotiidi positsioonile. Isomerisatsiooni reaktsioon toimub spetsiaalsetes positsioonides, mida nimetatakse “pseudouridüleerimise taskuteks” ning need asuvad juuksenõela struktuuris. Lisaks asub box H/ACA snoRNA 3' otsas konserveerunud järjestus ACA. Box H/ACA

snoRNA-ga seondub valguline kompleks, mis koosneb neljast konserveerunud subühikust: düskeriin (DKC1)/Cbf5, NHP2, NOP10 ja Gar1. Katalüütiline subühik on DKC1, mis viib läbi pseudouridüleerimise reaktsiooni (Ojha jt., 2020). Selle töö raames on oluline box H/ACA snoRNA snR34 (vaata alampeatükki 2.2.4).



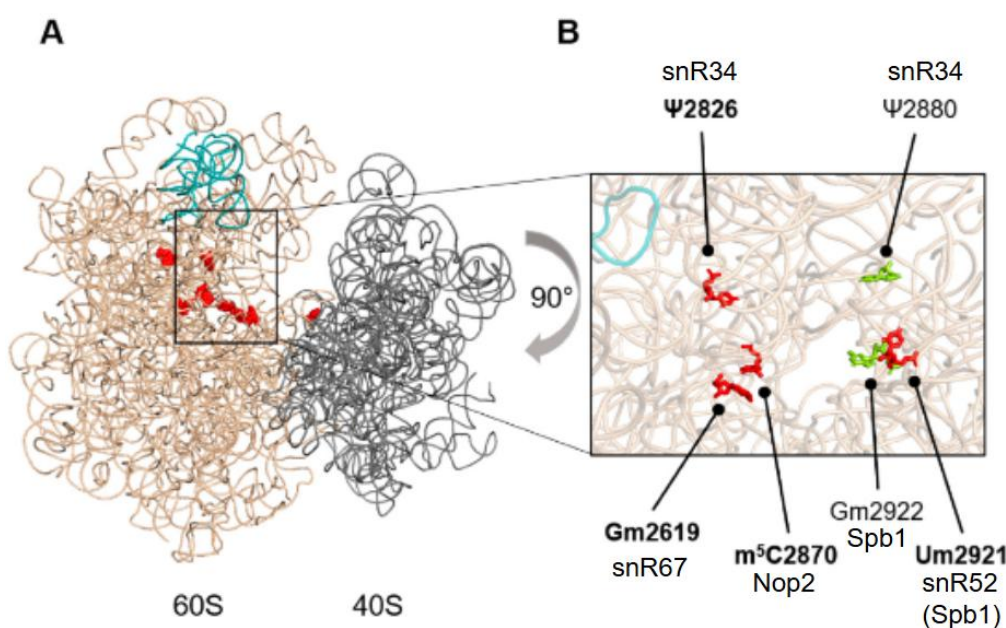
**Joonis 4. Ülevaade Box H/ACA snoRNP struktuurist. A**, Box H/ACA sekundaarstruktuur, kus on näidatud box H (roheline), box ACA (sinine) ja seonduva rRNA (punane) asukohad. **B**, Box H/ACA snoRNA külge seonduvad konserveerunud subühikud – DKC1, NOP10, NHP2 ja Gar1. Katalüütiline aktiivsus on DKC1 subühikul. Joonis on kohandatud Ojha jt. (2020) järgi.

### 1.3. Konserveerunud rRNA modifikatsioonid pagaripärmi PTC-s

Konserveerunud rRNA modifikatsioonid on klasterdunud olulistesse funktsionaalsetesse keskustesse nagu näiteks PTC, dekodeeriv tšenter ja subühikute vahelised kontaktide piirkonnad, mis näitab nende modifikatsioonide olulisust (Ojha jt., 2020). rRNA-de modifitseerimise tulemusena võib lisanduda alusele vesiniksideme tekke võimalus, mis stabiliseerib paardumisi teiste alustega ning suurendab aluste hüdrofoobsust, mis kaitseb nukleotiide ja stabiliseerib RNA heelikseid (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Veel soodustavad rRNA modifikatsioonid sekundaarstruktuuride teket näiteks lämmastikaluste vertikaalse interaktsiooni teel või blokeerides kanoonilisi Watson-Crick paardumisi muutes RNA topoloogiat. Selliste modifikatsioonide tulemusena stabiliseeritakse RNA-RNA või RNA-valk interaktsioone tagades RNA struktuuri jäikust (Sharma ja Lafontaine, 2015). Nagu ka ülejäänud ribosoomis on kõige levinumateks modifikatsioonideks PTC-s riboosi 2' O-metüleerimine ja pseudouridüleerimine. Nende modifikatsioonide puudumisel, mis on saavutatud asendades *NOPI* ja *CBF5* metsiktüüpi geenid, mutantsete alleelidega *nop1.3* ja *cbf5-D95A*, tekivad

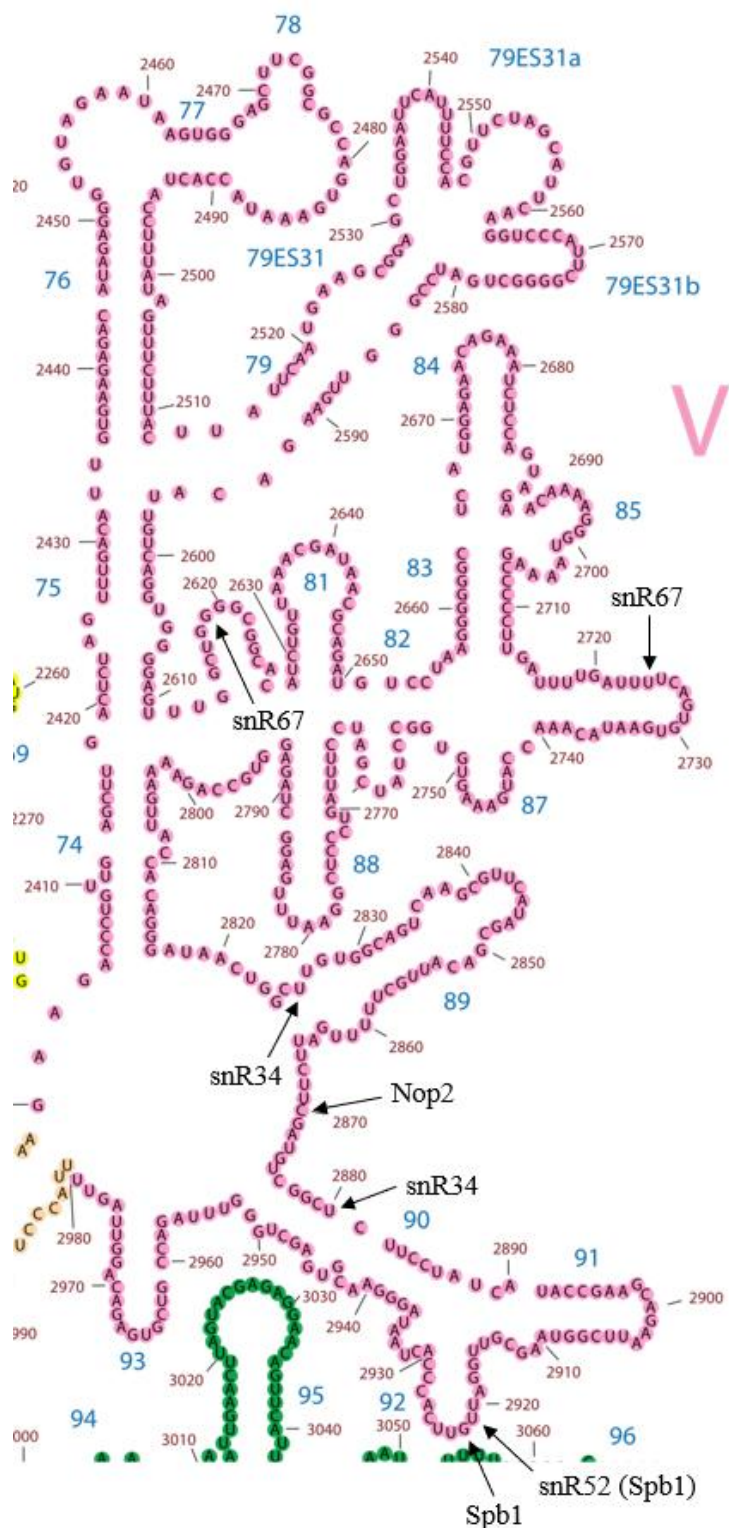
tugeva kasvuhäirega fenotüübid (Tollervey jt., 1993; Zebarjadian jt., 1999). Üksikute modifikatsioonide puudumisel, ühe snoRNA tühistamise tulemusena, mõju rakkude kasvule ja ribosoomi funktsionaalsusele on väga väike või olematu (Esguerra jt., 2008). Seega on RNA modifikatsioonidel kumulatiivne mõju ribosoomi efektiivsusele.

Suures subühikus PTC piirkonnas paikneb neli evolutsiooniliselt konserveerunud modifikatsiooni (Baudin-Baillieu ja Namy, 2021). Pagaripärmis vastutavad nende konserveerunud modifikatsioonide lisamise eest snoRNP-d ja kaks spetsiifilist ensüümi. Kolme snoRNA vahendusel, nagu snR34, snR52 ja snR67, katalüüsitakse järgmised modifikatsioonid: pseudouridiin positsioonil 2826 ( $\Psi$ 2826) ning uridiini ja guaniini metüülatsioonid positsioonidel 2921 ja 2619 (Um2921 ja Gm2619). Spetsiifiline ensüüm Nop2 katalüüsib C<sup>5</sup>-metüülsütidiini modifikatsiooni positsioonil 2870 (m<sup>5</sup>C2870) ning Spb1 metüleerib guaniini positsioonil 2922 (Leppik jt., 2024) (Joonis 5 ja Joonis 6). Samas on Spb1 võimeline lisama metüülrühma positsiooni U2921, juhul kui puudub snR52 (Bonnerot jt., 2003).



**Joonis 5. *S. cerevisiae* 80S ribosoom ja konserveerunud modifikatsioonid PTC piirkonnas.**

**A,** *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosoom. 60S ja 40S subühiku rRNA on toodud välja vastavalt beeži ja hallina. **B,** Suurendatud vaade 60S ribosoomi PTC piirkonnast, kus konserveerunud modifikatsioonid on toodud punasena ja mitte-konserveerunud modifikatsioonid on toodud rohelisena. Märgitud on snoRNA-d ja ensüümid, mis vastavalt vahendavad või viivad läbi nende modifikatsioonide lisamist. Joonis on kohandatud Leppik jt. (2024) järgi.



**Joonis 6. Seitse modifikatsiooni *S. cerevisiae* PTC sekundaarstruktuuril.** Nooltega on tähistatud modifikatsioonide asukohad ja nende sünteesiks vajalikud snoRNA-d ning ensüümid.

Joonis on kohandatud veebilehe *RibosomeGallery* (<http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery>) järgi.

### 1.3.1. *S. cerevisiae* tüvi *3ΔsnR nop2\* spb1\**

Et uurida PTC piirkonnas olevate konserveerunud modifikatsioonide funktsiooni, konstrueeriti pagaripärmi mutantne tüvi *3ΔsnR nop2\* spb1\** (TYSC906), millel puudusid snoRNA geenid *snR34*, *snR52* ja *snR65* ning ekspresseerusid *nop2* ja *spb1* ensümaatilisel inaktiivsed variandid (Leppik jt., 2024). Geenid *NOP2* ja *SPB1* on pagaripärmis eluks hädavajalikud ning nende eemaldamine toob kaasa letaalse kasvufenotüübi (de Beus jt., 1994; Kressler jt., 1999). Selle tõttu asendati metüültransferaasidel Nop2 aspartaathape positsioonil 52 alaniiniga, glutamiinhape positsioonil 679 lüsiiniga ning Spb1 tsüsteiinid positsioonidel 424 ning 478 alaniiniga. Aminohappeliste asenduste tulemusena puudus nendel ensüümidel metüültransferaasne aktiivsus. Tüve *3ΔsnR nop2\* spb1\** fenotüübi analüüsimisel selgus, et võrreldes metsiktüübiga oli kasvukiirus 3 korda aeglasem, globaalse translatsiooni tase 2,6 korda madalam ning tüvi on külmatundlik. Nendest tulemustest järeldati, et PTC piirkonnas olevad konserveerunud rRNA-de modifikatsioonid on vajalikud ribosoomide optimaalseks translatsiooniks (Leppik jt., 2024). Töös kasutatakse seda tüve (TYSC906) ribosoomide elongatsioonikiiruse hindamiseks (vaata alampeatükki 2.2.4).

## 1.4. Lutsiferaasidel põhinevad reportersüsteemid

Bioluminestsents on organismide poolt toodetud kiirgav valgus. Looduses on see nähtus evolutsiooniliselt konserveerunud peamiselt meres elavatel organismidel ning mõningatel seentel, bakteritel ja putukatel. Bioluminestsentsi süsteem koosneb lutsiferaasi ensüümist, mis oksüdeerib lutsiferiini molekuli, mille tulemusena tekib molekulil ergastatud olek ning hiljem madalamale energiale üle minnes tekib valgusreaktsioon. Lutsiferaasi-lutsiferiini paarid kiirgavad valgust erinevatel lainepikkustel, mis võimaldab seda süsteemi rakendada erinevates uuringutes. Bioluminestsentsi põhjal on reportersüsteeme välja töötatud geeniekspressiooni uurimiseks, valk-valk interaktsioonide tuvastamiseks, *in vivo* rakukomponentide visualiseerimiseks jne. Kuna lutsiferaas-lutsiferiini reaktsioonidel on madal toksilisus ja kõrge tundlikkus, siis on see süsteem leidnud laialdast kasutust *in vitro* reportersüsteemides. Näiteks *firefly* lutsiferaasi ja selle substraati kasutatakse biokeemilistel analüüsidel, et määrata ATP taset (Syed ja Anderson, 2021).

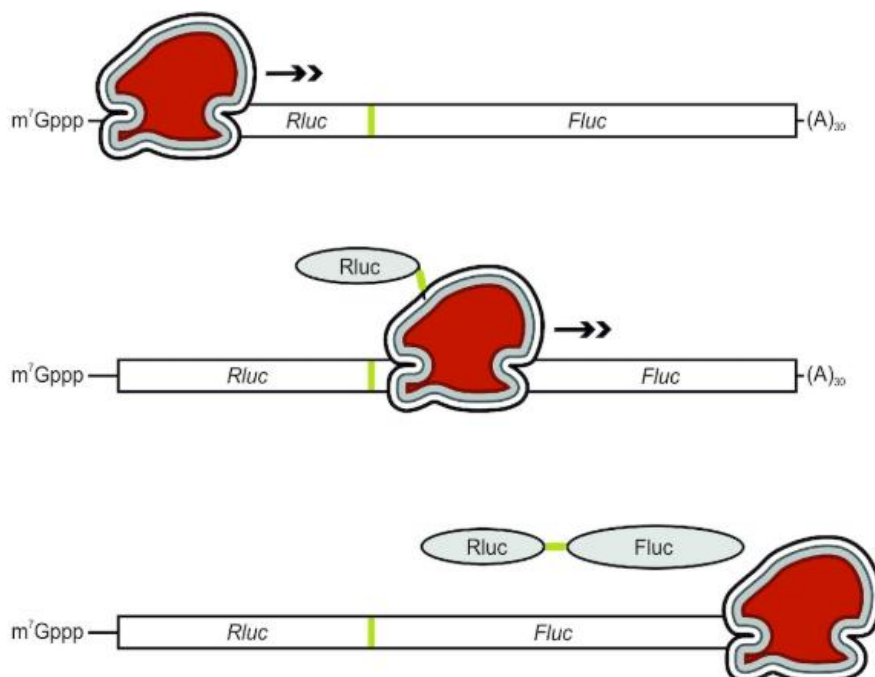
Eukarüootsetes süsteemides on kõige laialdasemalt on kasutusel *Renilla* (Rluc) ja *firefly* (Fluc) lutsiferaasid. Rluc on pärit organismist *Rotylenchulus reniformis* ning Fluc on pärit jaanimardikast *Photinus pyralis*. Fluc katalüüsib substraadi oksüdeerumist ATP ja magneesium ioonide juuresolekul, mille tulemusena eraldub kollakas-roheline valgus lainepikkusel 560 nm (Kirkpatrick jt., 2019). Rluc ei vaja substraadi katalüüsiks ATP-d ning reaktsiooni toimumiseks on vaja veel kaltsium ioone (Kaskova jt., 2016). Hapniku juuresolekul eraldub sinine valgus (Azad jt., 2021). Neid reportereid kasutatakse tavaliselt geeniekspressiooni uurimiseks prokarüootsetes ja eukarüootsetes süsteemides (Syed ja Anderson, 2021). Kasutusel on ka *Gaussia* lutsiferaasil (Gluc) ja nanolutsiferaasil (Nluc) põhinevad reporterid. Gluc on pärit organismist *Gaussia princeps* ning selle substraadi eelistus ja reaktsioon on sarnane Rluc-ile. Gluc lutsiferaasi sekreteeritakse imetajarakkudest aktiivsel kujul, mistõttu pole vaja rakke lõhustada. See on suureks eeliseks, kuna võimaldab uurida kasvu või valgu interaktsioone elusrakkudes. Nluc on pärit organismist *Oplophorus gracilirostris*. Võrreldes Rluc ja Fluc reporteridega on Nluc väiksema suurusega valk ning omab suuremat stabiilsust. Samuti on selle luminesentsi signaal 150 korda tugevam Rluc ja Fluc signaalist (Azad jt., 2021).

#### **1.4.1. Kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem**

Kahel lutsiferaasil põhinevad süsteemid kasutavad kahte eraldi mõõdetavat lutsiferaasi ning neid kasutatakse laialdaselt geeniekspressioon kvantiseerimiseks. Sellistes süsteemides kasutatakse tavaliselt reporteritena *Renilla* (Rluc) ja *firefly* (Fluc) lutsiferaase. Nende reporterite suureks eeliseks on see, et need kasutavad erinevaid substraate, mis võimaldab viia läbi reaktsiooni ühes ja samas tuubis. Analüüsiks võivad Rluc ja Fluc geenid asuda plasmiidis või genoomis. Neid lutsiferaaside geene saab ekspresseerida kontrollpromootorite või uuritavate promootorite alt, mille regulatsiooni tahetakse uurida (Azad jt., 2021).

*In vivo* valgusünteesil on tihti kitsaskohaks transleerivad ribosoomid ja elusrakkude varieeruvus. Seetõttu on kasutusele võetud rakuvabad valgusünteesi süsteemid (ingl CFPS ehk *cell-free protein synthesis system*), mis võimaldavad paremini kontrollida reaktsioonis translatsiooni tingimusi (Kisly jt., 2021). CFPS süsteemid põhinevad lüüsitud rakkudest saadud ekstraktidel (González-Ponce jt., 2025). Molekulaarbioloogia õppetoolis on töötatud välja kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem translatsiooni elongatsiooni mõõtmiseks *in vitro*. Selles süsteemis kasutati reporteritena Fluc ja Rluc lutsiferaase, mis olid ühendatud liitvalgus lisajärjestusega (*spacer* järjestus) (Joonis 7). Eukarüootsetes süsteemides võtavad Rluc ja Fluc

translatsiooni ajal, mis võimaldab eristada translatsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni etappe. Translatsioon algab Rluc sünteesiga ning ensüüm muutub aktiivseks kui ribosoomide on lõpetanud Rluc domeeni sünteesi. Selle lutsiferaasi aktiivsuse teke peegeldab aega, mis kulus translatsiooni initsiatsiooniks ja *Renilla* lutsiferaasi valgu sünteesiks. *Firefly* lutsiferaasi luminesentsi signaal on tuvastatav pärast seda kui liitvalg vabastatakse ribosoomilt. Seega *firefly* lutsiferaasi aktiivsuse teke kirjeldab aega, mis kulus initsiatsiooniks, liitvalgu sünteesiks ja terminatsiooniks (Kisly jt., 2021).

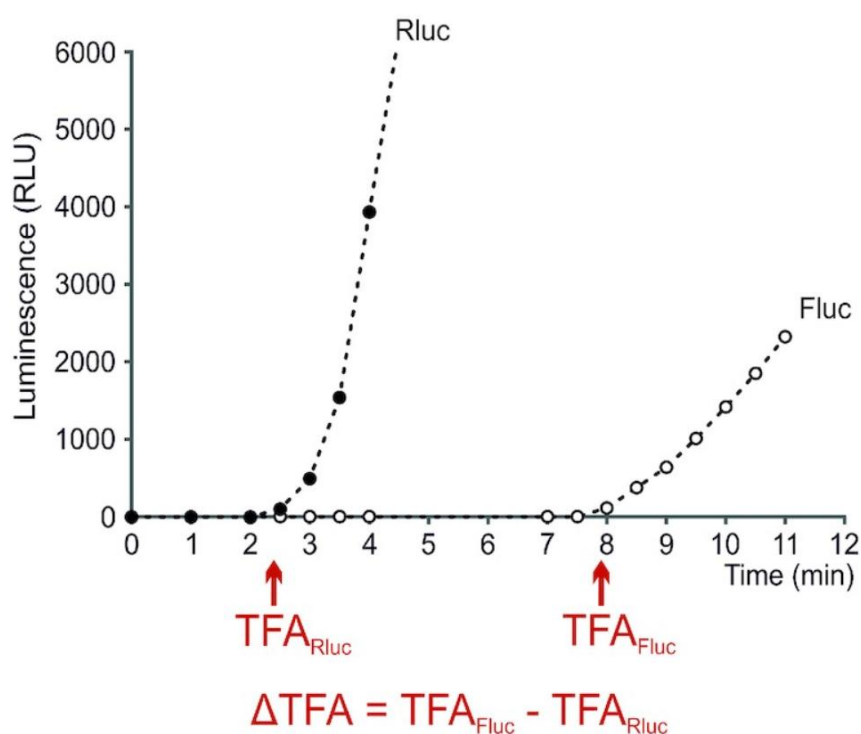


**Joonis 7. *Renilla*-*firefly* lutsiferaasi liitvalgu süntees.** *Renilla* lutsiferaasi voltub kotranslatsiooniliselt. Rluc aktiivsuse teke kirjeldab aega, mis kulus initsiatsiooniks ja *Renilla* lutsiferaasi osa transleerimiseks. *Firefly* lutsiferaas muutub aktiivseks ribosoomidelt vabanemisel. Fluc aktiivsuse teke kirjeldab aega, mis kulus initsiatsiooniks, liitvalgu sünteesiks ja terminatsiooniks. Lisajärjestuse asukoht on tähistatud rohelisega. Joonis on kohandatud Kisly jt. (2021) järgi.

Mõõdetud *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside aktiivsuste kaudu saab määrata esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimise aja ehk TFA (ingl *time of the first appearance*). Selle määramiseks on esmalt vaja arvutada taustsignaali keskmine ja selle standardhälbe (ingl *background*). Kasutades saadud keskmist väärtust ja standardhälvet saab määrata taustsignaali ülemise piiri valemiga:

$$\text{Keskmine taustsignaal} + 4 \text{ korda taustsignaali standardhälve}$$

Visualiseerides graafikul taustsignaali ülemist piiri ja lutsiferaaside aktiivsusi, saab nende joonte lõikepunkti järgi määrata esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimiseks kulunud aja ehk TFA. Lahutades *firefly* lutsiferaasi TFA väärtusest *Renilla* TFA väärtus, saab arvutada  $\Delta$ TFA, mis väljendab vahejärjestuse (*spacer*) ja *firefly* lutsiferaasi domeeni sünteesiks kulunud aega (Joonis 8). Veel on võimalik vahejärjestusse sisestada lisajärjestusena spetsiifilisi koodoneid või valgudomeene kodeerivaid järjestusi. Seejärel saab määratud TFA väärtuste kaudu arvutada  $\Delta$ TFA ehk aja, mis kulus lisajärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi domeeni sünteesiks. Lahutades lisajärjestust sisaldav lutsiferaaside liitvalgu  $\Delta$ TFA ja lihtsalt lutsiferaaside liitvalgu  $\Delta$ TFA, saab määrata lisajärjestuse sünteesimiseks kulunud aega.



**Joonis 8. Skemaatiline joonis *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside TFA määramise ning  $\Delta$ TFA arvutamise kohta.** *Renilla* TFA kirjeldab aega, mis kulus translatsiooni initsiatsiooniks ja *Renilla* valgudomeeni sünteesiks. *Firefly* TFA kirjeldab aega, mis kulus translatsiooni initsiatsiooniks, elongatsiooniks ja terminatsiooniks. Lahutades *firefly* lutsiferaasi TFA väärtusest *Renilla* lutsiferaasi väärtuse, saab teada aja, mis kulus *firefly* lutsiferaasi või lisajärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi sünteesiks ja translatsiooni terminatsiooniks. Joonis on kohandatud Kisly jt. (2021) järgi.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Kahel lutsiferaasil põhinevat reportersüsteemi on edukalt kasutatud *in vitro* rakuvabas süsteemis (Kisly jt., 2021). See reportersüsteem võimaldab määrata ribosoomide elongatsioonikiirust ja protsessiivsust. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada sarnane süsteem, mida saaks kasutada ribosoomide aktiivsuse hindamiseks *in vivo*.

Seega olid töö järgmised eesmärgid:

1. Konstrueerida *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside geene sisaldavad reporterplasmiidid ning integreerida need plasmiidid metsiktüüpi ja mutandi TYSC906 pärmi genoomi.
2. Analüüsida saadud tüvedes *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside ekspressiooni toimumist ajas.
3. Määrata lutsiferaaside esmase aktiivsuse tekkimise aeg ning hinnata metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide aktiivsuse erinevust.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud söötmed

Pagaripärmi *S. cerevisiae* rakkude kasvatamiseks kasutati YPD söödet (1% *Bacto* pärmiekstrakt, 2% *Bacto* pepton, 2% glükoos)(Sherman, 2002). Transformeeritud pärmitüvede kasvatamiseks kasutati selektiivset täissöödet SC-URA (*Synthetic complete media*), mis sisaldas 0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudus uratsiil ning süsiniku allikana lisati kas 2% glükoosi või 3% raffinoosi. Tardsööde SC-URA valmistamiseks lisati eelpool kirjeldatud komponentidele 20 g/l agarit (*Neogen*). Pärmirakke kasvatati 30 °C juures. Vedelkultuure aereeriti loksutil 180 pööret/min.

Bakteri *E. coli* DH5a tüve kasvatamiseks kasutati 2xYT söödet (1,6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Transformeeritud bakteritüvede selekteerimiseks kasutati tardsöödet LB (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 1,5% agar) kuhu oli lisatud ampitsilliini kontsentratsiooniga 100 µg/ml. Bakteriakke kasvatati 37 °C juures. Vedelkultuure aereeriti loksutil 180 pööret/min.

## 2.2.2. Töös kasutatud *S. cerevisiae* plasmiidid

Ribosoomide translatsiooni kiiruse ja täpsuse analüüsimiseks *in vitro* töötati molekulaarbioloogia õppetoolis välja kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem (Kisly jt., 2021). Selleks konstrueeriti plasmiidid pUC18-Dual ja pUC18-Dual146 (Tabel 1). Käesolevas töös konstrueeriti nende plasmiidide baasil kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem, et analüüsida ribosoomide elongatsioonikiirust *in vivo*. Lutsiferaaside geene sisaldavad järjestused sisestati vektorplasmidi pRS306-GAL<sub>prom</sub>-FBA1<sub>term</sub>. Selle tulemusena saadi plasmiidid pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub> (Tabel 1). Viimases plasmiidis asub lutsiferaasi geenide vahel järjestus, mis kodeerib kaks Snf7 valgudomeeni, mis koosnevad kahest 73 aminohappe pikkuselise  $\alpha$ -heeliksist (2xSnf7).

**Tabel 1. Kasutatud plasmiidid**

Plasmiid	Vektor	Insert	Promootor	Terminaator	Marker	Päritolu
pUC18-Dual	pUC18	<i>Rluc-Fluc</i>	T7 RNA Pol	-	AmpR	Kisly jt. 2021
pUC18-Dual146	pUC18	<i>Rluc-2xSNF7-Fluc</i>	T7 RNA Pol	-	AmpR	Kisly jt. 2021
pRS306-GAL <sub>prom</sub> -FBA1 <sub>term</sub>	pRS306	-	<i>GAL1,10</i>	<i>FBA1</i>	AmpR, <i>URA3</i>	Labori kollektsoon
pRS306-GAL <sub>prom</sub> -Rluc-Fluc-FBA1 <sub>term</sub>	pRS306	<i>Rluc-Fluc</i>	<i>GAL1,10</i>	<i>FBA1</i>	AmpR, <i>URA3</i>	Selles töös valmistatud
pRS306-GAL <sub>prom</sub> -Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1 <sub>term</sub>	pRS306	<i>Rluc-2xSNF7-Fluc</i>	<i>GAL1,10</i>	<i>FBA1</i>	AmpR, <i>URA3</i>	Selles töös valmistatud

### 2.2.3. Lutsiferaasi geenide paljundamiseks ja koloonia-PCR-iks kasutatud praimerid

Et luua kahel lutsiferaasil põhinev *in vivo* reportersüsteem, paljundati lutsiferaaside geenid plasmiididelt pUC18-Dual ja pUC18-Dual146 kasutades praimereid Fluc-Rev-XhoI ja Rluc-Forw-BamHI (Tabel 2). Koloonia polümeraas ahelreaktsioonis kasutati praimereid Fluc-Short-Rev ja Rluc-control-Forw (Tabel 2), et selekteerida välja DH5 $\alpha$  transformandid, kes sisaldasid lutsiferaasi geenidega plasmidi.

**Tabel 2. Töös kasutatud praimerid**

Praimeri nimi	Järjestus
Fluc-Rev-XhoI	5'- TAG CTA CTC GAG TTG TTA TTA CAA TTT GGA -3'
Rluc-Forw-BamHI	5'- CCA CGG ATC CGT CAA GGA AGT AAT TAT CTA C -3'
Fluc-Short-Rev	5'- GGT TGG ATC CGT GAT GTT CAC CTC GAT ATG TGC ATC -3'
Rluc-control-Forw	5'- GAA AGG TGA AGT TCG TCG TCC AAC -3'

### 2.2.4. Töös kasutatud *S. cerevisiae* ja *E. coli* tüved

Katsete läbiviimiseks kasutati pagaripärmi metsiktüüpi tüve TYSC309 ja mutantset tüve TYSC906 (Tabel 3). Tüves TYSC906 on deleteeritud *snR34*, *snR52* ja *snR67* geenid ning Spb1 ja Nop2 ekspresseeruvad katalüütiliselt mitteaktiivsete variantidena. Tüvede TYSC920 ja TYSC929 saamiseks sisestati tüve TYSC309 genoomi vastavalt plasmiidid pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub>. Tüvede TYSC946 ja TYSC948 saamiseks sisestati tüve TYSC906 genoomi vastavalt plasmiidid pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub>. Plasmiidide konstrueerimiseks kasutati *E. coli* DH5 $\alpha$  tüve (genotüüp -  $\Delta(\textit{argF-lac})169$ ,  $\phi 80\textit{dlacZ58(M15)}$ ,  $\Delta\textit{phoA8}$ , *glnX44(AS)*, *deoR481*, *rfbC1*, *gyrA96(NalR)*, *recA1*, *endA1*, *thiE1*, *hsdR17*).

**Tabel 3. Kasutatud pagaripärmi tüved**

Tüve tähistus	Nimi	Genotüüp	Päritolu
TYSC309	WT	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Labori kolleksioon
TYSC906	<i>3ΔsnR nop2* spb1*</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1:: hphMX6 Δnop2:: natMX6 [pRS314-spb1(D52A,E679K)] [pRS315-nop2(C424A, C478A)]</i>	Leppik jt. 2024
TYSC920	WT-Rluc-Fluc	<i>MATa ura3-52::GAL1pr-RLuc-FLuc-FBA1term-URA3 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Selles töös valmistatud
TYSC929	WT-Rluc-2xSnf7-Fluc	<i>MATa ura3-52::GAL1pr-RLuc-2xSNF7-FLuc-FBA1term-URA3 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Selles töös valmistatud
TYSC946	Mut-Rluc-Fluc	<i>MATa ura3-52::GAL1pr-RLuc-FLuc-FBA1term-URA3 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1:: hphMX6 Δnop2:: natMX6 [pRS314-spb1(D52A,E679K)] [pRS315-nop2(C424A, C478A)]</i>	Selles töös valmistatud
TYSC948	Mut-Rluc-2xSnf7-Fluc	<i>MATa ura3-52::GAL1pr-RLuc-2xSNF7-FLuc-FBA1term-URA3 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔsnR34 ΔsnR52 ΔsnR67 Δspb1:: hphMX6 Δnop2:: natMX6 [pRS314-spb1(D52A,E679K)] [pRS315-nop2(C424A, C478A)]</i>	Selles töös valmistatud

## 2.2.5. Lutsiferaasi geenide paljundamine

*In vivo* reportesüsteemis kasutatavate plasmiidide konstrueerimiseks paljundati lutsiferaasi geenide *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* järjestused. Viidi läbi polümeraas ahelreaktsioon (PCR) praimeritega Fluc-Rev-XhoI ja Rluc-Forw-BamHI (Tabel 2). Reaktsiooni kogumaht oli 50 µl, mis sisaldas 1X puhvrit (5x *Phusion GC Buffer*, *Thermo Scientific*), 0,2 mM nukleotiidide segu, 25 pmol pärisuuna praimerit, 25 pmol vastassuuna praimerit (Praimerid on toodud Tabelis 3), 1 ng matriits DNA-d (pUC18-Dual või pUC18-Dual146) ja 1 U DNA polümeraasi (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, *Thermo Scientific*). Reaktsioon viidi läbi kasutades masinat *Eppendorf Mastercycler Nexus* ja programmi:

Algne denaturatsioon:	94 °C, 3 minutit	} 30 tsükli
Denaturatsioon:	94 °C, 20 sekundit	
Praimerite seondumine:	55 °C, 20 sekundit	
Ahela süntees:	72 °C, 1 minut ja 55 sekundit	
Lõplik ahela süntees:	72 °C, 4 minutit	

PCR produktide analüüsimiseks kasutati 0,9% agarosgeelelektroforeesi 1x TBE puhvris (89 mM Tris, 89 mM boorhape, 2 mM EDTA). Agarosgeelile lisati etiidium-bromiidi (EtBr, 1 µg/ml). DNA pikkusmarkerina kasutati *GeneRuler 1 kb DNA Ladderit* (*Thermo Scientific*). Elektroforees kestis 45 minutit pingel 90 V. DNA fragmendid puhastati agarosgeelist, kasutades *FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit-i*. Kõik etapid tehti vastavalt tootja (*Favorgen*) poolt ette nähtud protokollile.

## 2.2.6. Lutsiferaasi geenide ja vektorplasmiiidi pRS306-GAL<sub>prom</sub>-FBA1<sub>term</sub> restriksioon

Puhastatud DNA fragmendid ja vektorplasmiiid pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> (pRS306) lineariseeriti restriктаasidega BamHI (*Thermo Scientific*) ja XhoI (*Thermo Scientific*). Puhastatud DNA fragmentide reaktsiooni lõppmaht oli 50 µl, mis sisaldas 42 µl puhastatud DNA-d, 1x BamHI-Lsp1109I puhvrit (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, *Thermo Scientific*), 15 U BamHI (*Thermo Scientific*) ning 15 U XhoI (*Thermo Scientific*) restriктаase. Vektorplasmiiidi restriksioonisegu lõppmaht oli 50 µl, mis sisaldas 7 µl plasmiidset DNA-d, 1x BamHI-Lsp1109I puhvrit (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, *Thermo*

*Scientific*), 15 U BamHI (*Thermo Scientific*) ning 15 U XhoI (*Thermo Scientific*) restriktase. Reaktsioone inkubeeriti 3 tundi 37 °C juures. Restriksioonisegul, mis sisaldas vektorplasmidi, lisati 30 minutit enne inkubatsiooni lõppu 1U aluselist fosfataasi (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific*). Restriktaasidega töödeldud DNA fragmente ja vektorplasmidi analüüsiti 0,9% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvril. DNA pikkusmarkerina kasutati *GeneRuler 1 kb DNA Ladderit (Thermo Scientific)*. Elektroforees kestis 45 minutit pingel 90 V. DNA fragmendid puhastati agarosgeelist kasutades *FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit-i*. Kõik etapid tehti vastavalt tootja (*Favorgen*) poolt ette nähtud protokollile.

### **2.2.7. Lutsiferaasi geenide ligeerimine pRS306-GAL<sub>prom</sub>-FBA1<sub>term</sub> vektorplasmidi**

Plasmiidide pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub> konstrueerimiseks viidi läbi ligeerimise reaktsioon. Reaktsiooni lõppmaht oli 10 µl ning see sisaldas 1 U T4 DNA ligaasi (*T4 DNA Ligase, Thermo Scientific*); 1x T4 DNA ligaasi puhvrit (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, *Thermo Scientific*); 4 µl lineariseeritud PCR produkti; 4 µl lineariseeritud vektorplasmidi. Ligeerimise reaktsioon kestis 1 tund temperatuuril 20 °C.

### **2.2.8. Transformatsioon *E. coli* tüvesse DH5α**

Transformatsioonil kasutati *E. coli* tüve DH5α kompetentseid rakke (valmistatud molekulaarbioloogia laboris). 50 µl kompetentsetele bakterirakkudele lisati 5 µl ligatsiooni reaktsiooni. Segu inkubeeriti 30 min jääl ning seejärel 1 minut ja 30 sekundit 42 °C juures. Rakud jääle kolmeks minutiks. Rakususpensioonile lisati 500 µl LB söödet ja asetati loksutile (pöõretel 800 rpm) 1 tunniks temperatuuril 37 °C. Rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimisega (3 min, 5000 rpm) lauatsentrifuugis (*Heraeus instruments Biofuge pico*). Seejärel eemaldati 350 µl supernatanti ning alles jäänud rakususpensioon külvati ampitsilliini (100 µg/ml) sisaldavale LB tardsöõtlele. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 37 °C.

### 2.2.9. Saadud bakterikolooniate kontroll

Et kontrollida, kas saadud bakterikolooniad sisaldavad lutsiferaasi geenidega *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* plasmide, viidi läbi koloonia PCR. Polümeraasi ahelreaktsiooniks valmistati segu, mis sisaldas 1x PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween) 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 10 pmol *Rluc-control-Forw* ja 10 pmol *Fluc-Short-Rev* praimerit (Tabel 2), 2,5 U *Taq* polümeraasi (puhastatud Biokeemia laboris) ning 2 µl bakterikultuuri, mille kolooniaid saadi eelnevalt LB+Amp tassidelt. Polümeraasi ahelreaktsiooni viidi läbi kasutades masinat *Eppendorf Mastercycler Nexus* ja programmi:

Algne denaturatsioon:	94 °C, 3 minutit	} 30 tsükli
Denaturatsioon:	94 °C, 20 sekundit	
Praimerite seondumine:	55 °C, 20 sekundit	
Ahela süntees:	72 °C, 1 minut ja 15 sekundit	
Lõplik ahela süntees:	72 °C, 4 minutit	

Paljundatud DNA fragmentide analüüsimiseks kasutati 0,9% agarosgeelelektroforeesi 1x TBE puhvris. DNA pikkusmarkerina kasutati *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (*Thermo Scientific*). Paljundatud DNA fragmentide *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* suurused olid vastavalt 504 ja 942 nt.

### 2.2.10. Bakterikolooniatest plasmidse DNA eraldamine ja kontrollimine

Kolooniad, mis sisaldasid lutsiferaasi geenidega plasmide, külvati 2 ml 2xYT söötmesse, millesse oli lisatud ampitsilliin (100 µg/ml). Bakterirakke kasvatati loksutis üleöö temperatuuril 37 °C. Plasmidid puhastati üleöö kultuuridest kasutades *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*-i. Kõik etapid tehti vastavalt tootja (*Favorgen*) poolt ette nähtud protokollile. DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga (*NanoDrop 2000c Spectrophotometer*, *Thermo Scientific*). Saadud DNA kontsentratsioonid olid vahemikus 200-400 ng/µl. Puhastatud plasmidide lutsiferaaside geene sisaldavad regioonid kontrolliti sekveneerimise teel (Tartu Ülikooli tuumiklabori teenus).

### 2.2.11. Konstrueeritud plasmiidide lõikamine restriктаasiga

Konstrueeritud plasmiididel puudub pagaripärmi spetsiifiline replikatsiooniks vajalik järjestus *ARS*, mille tõttu neid plasmide pärmirakkudes ei paljundata. Selleks, et need plasmiidid säiliks pärmirakkudes, oli neid vaja sisestada genoomi *URA3* lookusesse. Integreerimiseks kasutati plasmiidide *URA3* markergeenis asuvat *NcoI* restriksioonisaiti. Konstrueeritud plasmide lõigati restriктаasiga *NcoI* (*Thermo Scientific*). Restriksioonisegu lõppmaht oli 50 µl ning see sisaldas 15 U *NcoI* restriктаas (10 U/µl, *Thermo Scientific*); 1X Tango puhvrit (33 mM Tris-atsetaat (pH 7.9), 10 mM magneesium atsetaat, 66 mM kaalium atsetaat, 0.1 mg/ml BSA, *Thermo Scientific*); 4 µg plasmiidset DNAd. Restriksioon kestis 5 tundi temperatuuril 37 °C.

Reaktsiooni toimumist analüüsiti 0,9% agarosgeelelektroforeesil 1x TBE puhvris. Lineariseeritud DNA puhastamiseks kasutati *FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit*-i. Kõik etapid tehti vastavalt tootja (*Favorgen*) poolt ette nähtud protokollile. DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga (*NanoDrop 2000c Spectrophotometer*, *Thermo Scientific*). Saadud lineariseeritud plasmiidide pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub> DNA kontsentratsioonid jäid vahemikku 100,0 - 134,0 ng/µl.

### 2.2.12. Plasmiidide transformatsioon pagaripärmi rakkudesse

Plasmiidide sisestamiseks pagaripärmi genoomi kasutati LiOAc transformatsiooni meetodit (Knop jt., 1999). Üksik pärmikoloonia külvati 3 ml YPD vedelsöötmesse ning kasvatati loksutil üleöö 30 °C juures. Üleöö kasvanud kultuuridest tehti lahjendused YPD vedelsöötmesse (OD<sub>600</sub> = 0,3-0,4) ning kasvatati 30 °C juures eksponentsiaalse kasvufaasini (OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8).

Transformatsiooniks koguti 25 ml pärmikultuuri tsentrifugimise teel (*Hettich Zentrifugen Rotina 420R*) toatemperatuuril (2 min, 3200 rpm). Seejärel pesti rakke 25 ml steriilse H<sub>2</sub>O-ga ning 25 ml 1x LiOAc-TE lahusega (100mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA). Rakusademele lisati 150 µl 1x LiOAc-TE lahust ning sade suspendeeriti pipetiga. Rakkudele lisati 25 µl *carrier*-DNA-d (10 mg/ml), mis oli eelnevalt denatureeritud 6 minutit 95 °C juures ja jahutatud jääl. 50 µl kompetentsetele rakkudele lisati 5 µl lineariseeritud plasmiidset DNA-d ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Pärast inkubeerimist lisati 300 µl PEG-LiOAc-TE lahust (40% PEG 4000, 100mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA), segati ja

inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisati 30 µl DMSO-d (*Dimethyl sulfoxide*), segati ja inkubeeriti 10 minutit 42 °C juures. Rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel (3 min, 3000 rpm) lauatsentrifuugis (*Heraeus instruments Biofuge pico*). Seejärel eemaldati supernatant, rakusade suspendeeriti 200 µl steriilses H<sub>2</sub>O-s ning külvati SC-URA selektiivtassidele. Tasse inkubeeriti 2-4 päeva 30 °C juures.

### 2.2.13. Proovide võtmine lutsiferaasi aktiivsuste kontrollimiseks

Et kontrollida, kas konstrueeritud pärmitüvedes ekspresseeruvad *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasid, külvati transformatsioonil saadud pärmikolooniaid 3 ml SC-URA+raffinoos söötmesse ning vedelkultuure kasvatati loksutil üleöö temperatuuril 30 °C. Seejärel tehti üleöökultuuridest lahjendused 5 ml SC-URA+raffinoos söötmesse ( $OD_{600} = 0,35$ ) ning kasvatati 30 °C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600} \approx 0,7$ ). *GAL1,10* promootori aktivatsiooniks lisati rakukultuuridele galaktoosi lõppkontsentratsiooniga 3%. Rakke kasvatati loksutis 30 °C juures (180 rpm) ning kultuuris võeti proovid enne indutseerimist ning 20 ja 40 minuti möödumisel. Rakud (500 µl kultuuri) koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel (1 min, 13 000 rpm) lauatsentrifuugis (*Heraeus instruments Biofuge pico*). Seejärel eemaldati 475 µl supernatanti ja rakusade külmutati N<sub>2</sub>-s, et hiljem analüüsida lutsiferaaside aktiivsusi.

### 2.2.14. Proovide võtmine esmase lutsiferaasi signaali aktiivsuse tekkimise määramiseks

Aja määramiseks, mis kulub *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasi esmase aktiivsuse (TFA, ingl *time of the first appearance*) tekkimiseks, külvati üksikud pärmikolooniaid 3 ml SC-URA+raffinoos söötmesse ning kultuure kasvatati loksutil üleöö temperatuuril 30 °C. Üleöökultuuridest tehti lahjendused tiheduseni  $OD_{600} = 0,35$ . Lahjenduskultuure, mille maht oli 13 ml, kasvatati loksutis 30 °C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600} \approx 0,7$ ). Seejärel viidi 10 ml kultuuri 50 ml tsentrifuugi tuubidesse (*Greiner*) ja lisati galaktoosi lõppkontsentratsiooniga 3%. Rakke kasvatati loksutavas termoblokis (*Eppendorf ThermoMixer C*) 30 °C juures pöõretel 750 rpm. Lutsiferaaside ekspressiooni analüüsimiseks võeti 500 µl proovid iga 2 minuti järel 30 minuti jooksul. Rakud koguti toatemperatuuril tsentrifuugimise teel (1 min, 13 000 rpm) lauatsentrifuugis (*Heraeus instruments Biofuge pico*) ning seejärel eemaldati 475 µl supernatanti. Rakusade külmutati vedelas N<sub>2</sub>-s, et hiljem mõõta lutsiferaaside aktiivsused ja määrata lutsiferaaside esmase signaali tekkimiseks kuluv aeg.

### 2.2.15. Lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmine

Lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmiseks kasutati *Promega Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System Kit*-i. Mõõtmised viidi läbi luminomeetriga (*Tecan Infinite® M200 Pro*) kasutades *Tecan i-control 1.7* programmi (integratsiooni aeg 10 000 ms, temperatuur 25 °C). Igale proovile lisati 500 µl eelmainitud *kit*-ist 1X passiivset lüüsipuhvrit ning proove segati *vortexil* 15 sekundit, inkubeeriti toatemperatuuril 1 minut ning segati *vortexil* veel korra. Mikrotiiterplaadi (96 kannuga valge polüstüreen plaat, *Greiner*) kannu lisati 5 µl lüsaati ja 40 µl LARII substraati, segati pipeteerides ning mõõdeti *firefly* lutsiferaasi aktiivsus luminomeetriga. Pärast seda lisati kannu 40 µl *Stop&Glo* substraati ning mõõdeti *Renilla* lutsiferaasi aktiivsus.

### 2.2.16. Lutsiferaasi ekspresioonide analüüs

Tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi *Excel*. *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside esmase aktiivsuse ehk TFA määramiseks koostati tabel lutsiferaaside signaalide tugevustega ja proovide võtmise ajapunktidega. Seejärel määrati lutsiferaasi reaktsioonide maksimaalne taustsignaal ehk *background*. Selleks arvutati tausta keskmine väärtus ja standardhälve nendest ajapunktidest, mille ajal ei detekteeritud lutsiferaaside aktiivsust (Joonis 8).

Aeg	948/Fluc	948/Rluc
0	180	508
2	296	884
4	206	535
6	164	470
8	175	586
10	248	865
12	260	1217
14	389	2011

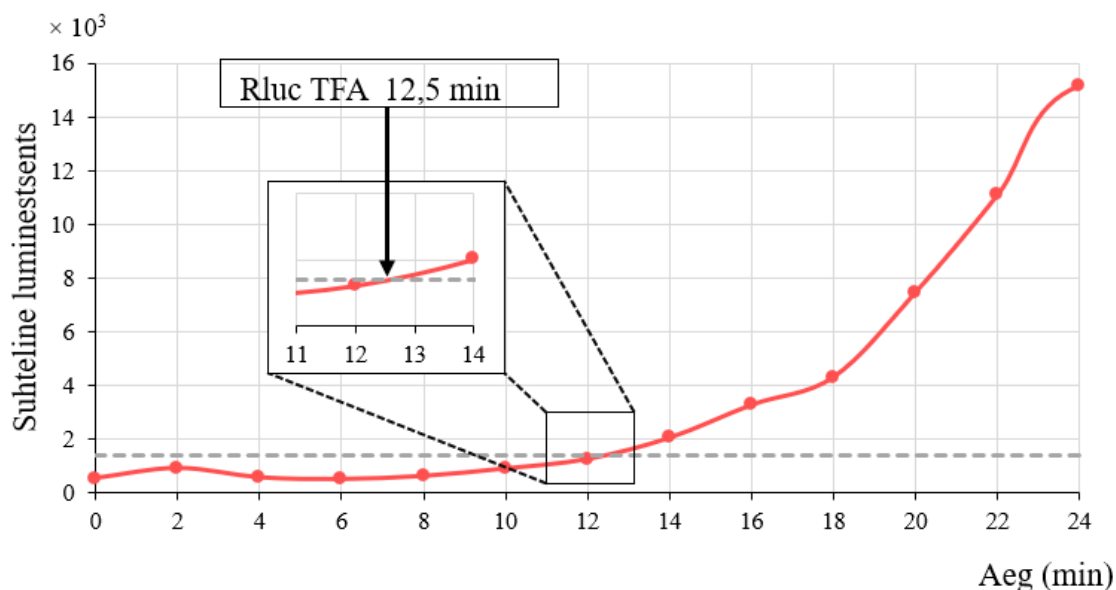
Nende keskmine on *background*

#### Joonis 8. Näide lutsiferaasi tausta signaali arvutamisest

Kasutades saadud keskmist väärtust ja standardhälvet saab määrata maksimaalse taustsignaali väärtuse kasutades valemit:

$$\text{Keskmine taustsignaal} + 4 \text{ korda taustsignaali standardhälve}$$

Esmase lutsiferaasi aktiivsuse ajahetke määramiseks esitati andmeid graafikul, mille x-teljel olid proovide võtmise ajapunktid ning y-teljel oli lutsiferaasi aktiivsuse signaali tugevus. Lisades graafikule maksimaalse taustsignaali väärtuse saab määrata TFA (Joonis 9).



**Joonis 9. Näide TFA määramisest.** Näitena on toodud tüve TYSC948 TFA määramine. Graafikul on pideva joonena esitatud mõõdetud *Renilla* lutsiferaasi aktiivsus ning punktiirjoonena on toodud maksimaalse taustsignaali väärtus. Noolega on näidatud kahe joone ristumiskoht, mis tähistab esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimise aega.

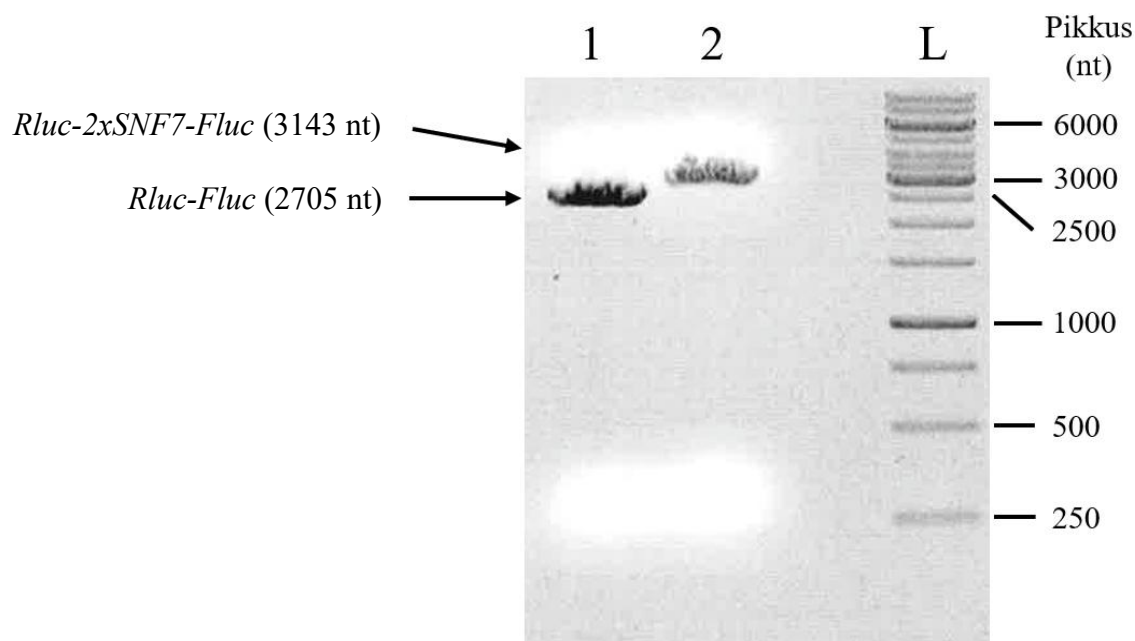
Seega saab graafikuid analüüsides teada *Renilla* lutsiferaasi TFA, mis näitab kui palju aega kulus translatsiooni initsiatsiooniks ja *Renilla* lutsiferaasi valgu sünteesiks. Samasugune analüüs viidi läbi *firefly* lutsiferaasi TFA määramiseks, mis näitab kui palju aega kulus üheks translatsiooni tsükliks (initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon). Lahutades omavahel *firefly* lutsiferaasi TFA väärtuse *Renilla* lutsiferaasi TFA väärtusest saab  $\Delta$ TFA, mis näitab kui palju aega kulus vahejärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi sünteesiks ning terminatsiooniks.

## 2.3. Tulemused

Varasemalt on väljatöötatud *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev *in vitro* reportersüsteem, millega on võimalik määrata ribosoomide elongatsioonikiirust ja protsessiivsust (Kisly jt., 2021). Käesoleva töö eesmärgiks oli töötada välja sarnane lutsiferaasidel põhinev reportersüsteem, mida saaks kasutada ribosoomide aktiivsuse määramiseks *in vivo*. Töös väljatöötatud reportersüsteemi kasutati ribosoomide elongatsioonikiiruste võrdlemiseks. Selleks kasutati *S. cerevisiae* metsiktüüpi tüve ja mutanti, milles puuduvad neli konserveerunud rRNA modifikatsiooni PTC piirkonnas.

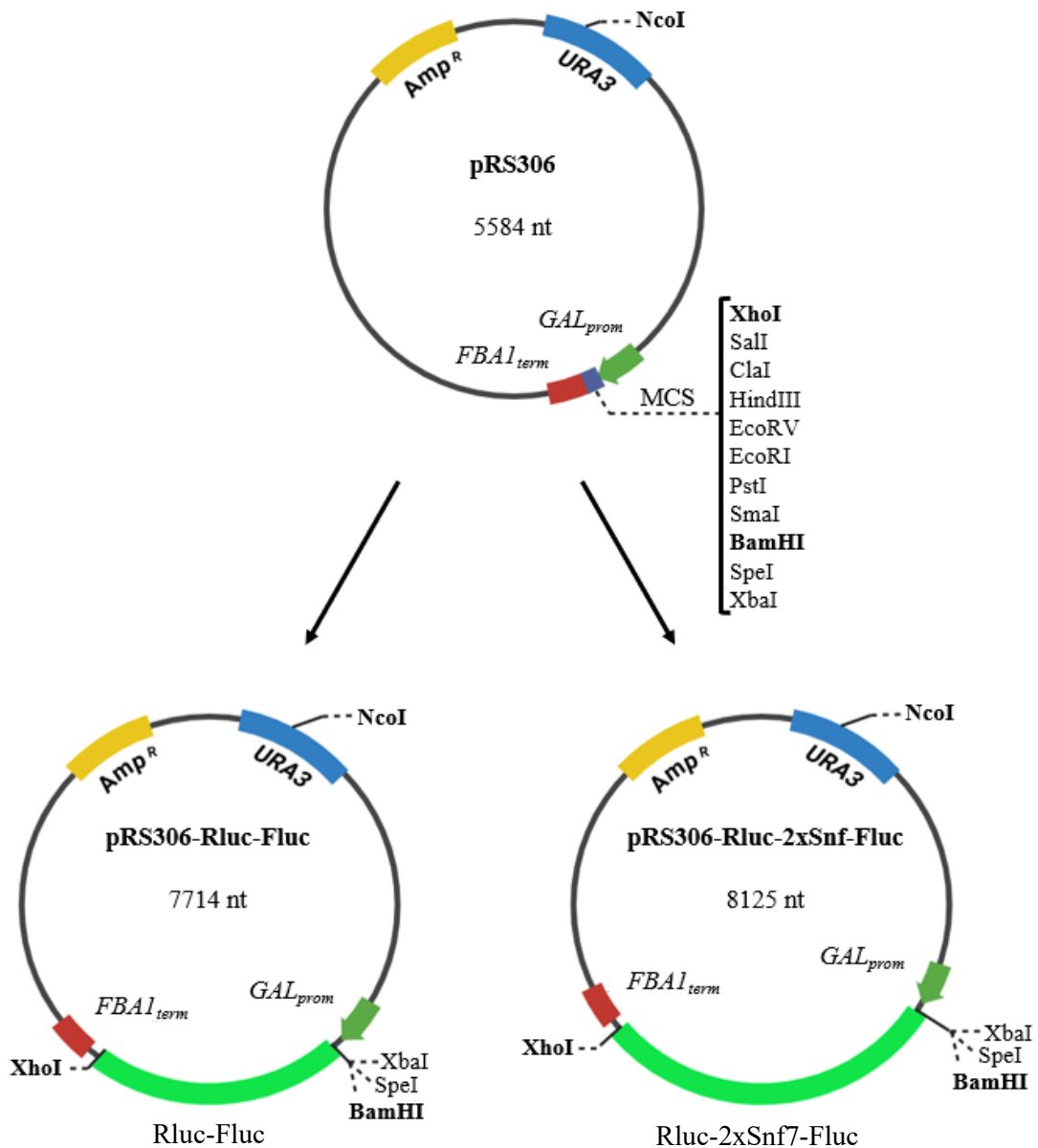
### 2.3.1. Pärmigenoomi integreeritavate plasmiidide konstrueerimine

Kahel lutsiferaasil põhineval *in vivo* reportersüsteemi väljatöötamise esimeseks etapiks oli plasmiidide, mida saaks integreerida pärmigenoomi, konstrueerimine. Reporteriteks valiti *Renilla* (Rluc) ja *firefly* (Fluc) lutsiferaasi geene sisaldavaid fragmendid *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc*. Neid järjestusi paljundati polümeraas ahelreaktsioonil (PCR) *in vitro* reportersüsteemis kasutatud plasmiididelt pUC18-Dual ja pUC18-Dual146. Saadud DNA fragmente analüüsti agaros-geelelektroforeesil (Joonis 10). DNA fragmentide suuruste hindamiseks kasutati DNA pikkusmarkerit (Joonis 10, rada L). Paljundatud *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragmentide suurused olid ligikaudu 2800 nt ja 3100 nt, mis vastavad nende fragmentide arvutuslikele suurustele (vastavalt 2705 nt ja 3143 nt) (Joonis 10, rajad 1-2).



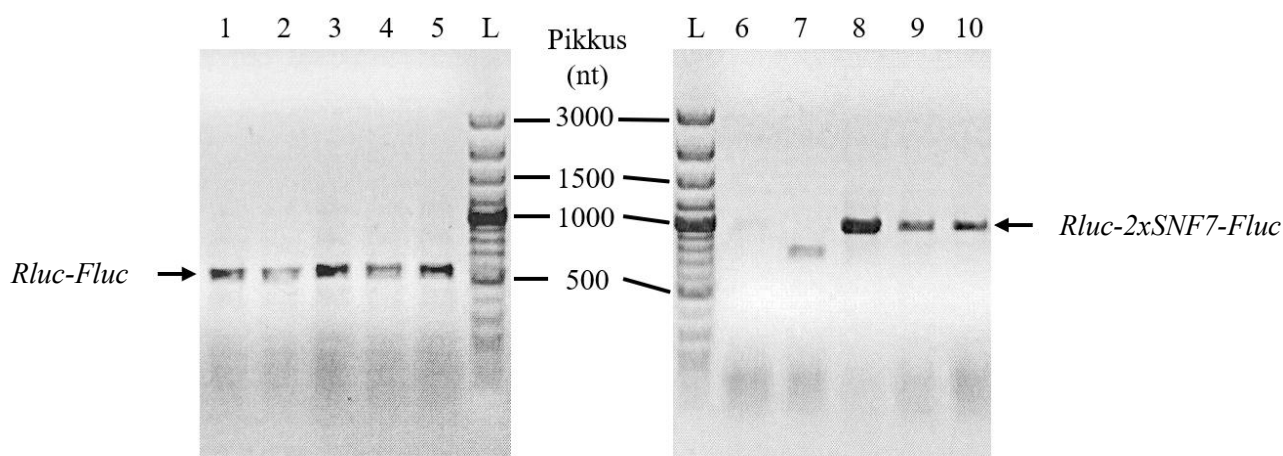
**Joonis 10. *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasi geenide paljundamise analüüs 0,9% agarosgeelelektroforeesil.** Rada 1, paljundatud *Rluc-Fluc* fragment; rada 2, paljundatud *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragment. Rada L, DNA pikkusmarker (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*).

Paljundatud PCR fragmentid sisestati vektorplasmiiidi pRS306-GAL<sub>prom</sub>-FBA1<sub>term</sub> (lühend pRS306). See plasmiid sisaldab reguleeritavat promootorit *GAL1,10* ja terminaatorit *FBA1* ning ampitsilliini resistentsusgeeni ja *URA3* selektiivmarkerit (Joonis 11). Paljundatud DNA fragmentide 5' ja 3' otstes paiknevad restriктаaside BamHI ja XhoI äratundmissaidid. Nii vektorplasmiiidi kui ka DNA fragmente töödeldi ensüümidega BamHI ja XhoI, saadud fragmentid eraldati agaros-geelilelektroforeesil ning puhastati geelist. Seejärel viidi läbi ligeerimise reaktsioon, mis transformeeriti *E. coli* kompetentse DH5 $\alpha$  tüve rakkudesse. Plasmiiide sisaldavaid kolooniad selekteeriti LB tassidel, kuhu oli lisatud ampitsilliini.



**Joonis 11. *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasi geene sisaldavate plasmiidide konstrueerimine.** Toodud on esialgse vektorplasmidi pRS306 ja konstrueeritud plasmiidide pRS306-Rluc-Fluc ja pRS306-Rluc-2xSnf7-Fluc kaardid. Need plasmiidid sisaldavad *GAL1* promootorit, *FBAl* terminaatorit, polülinkerit (MCS), ampitsilliini resistentsusgeeni ja *URA3* markergeeni. Konstrueeritud plasmiidid pRS306-Rluc-Fluc ja pRS306-Rluc-2xSnf7-Fluc sisaldavad lisaks vektorplasmidis toodud elementidele lutsiferaaside geene *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc*. Töös kasutatud restriктаaside äratundmiskohad on toodud välja tumedas kirjas.

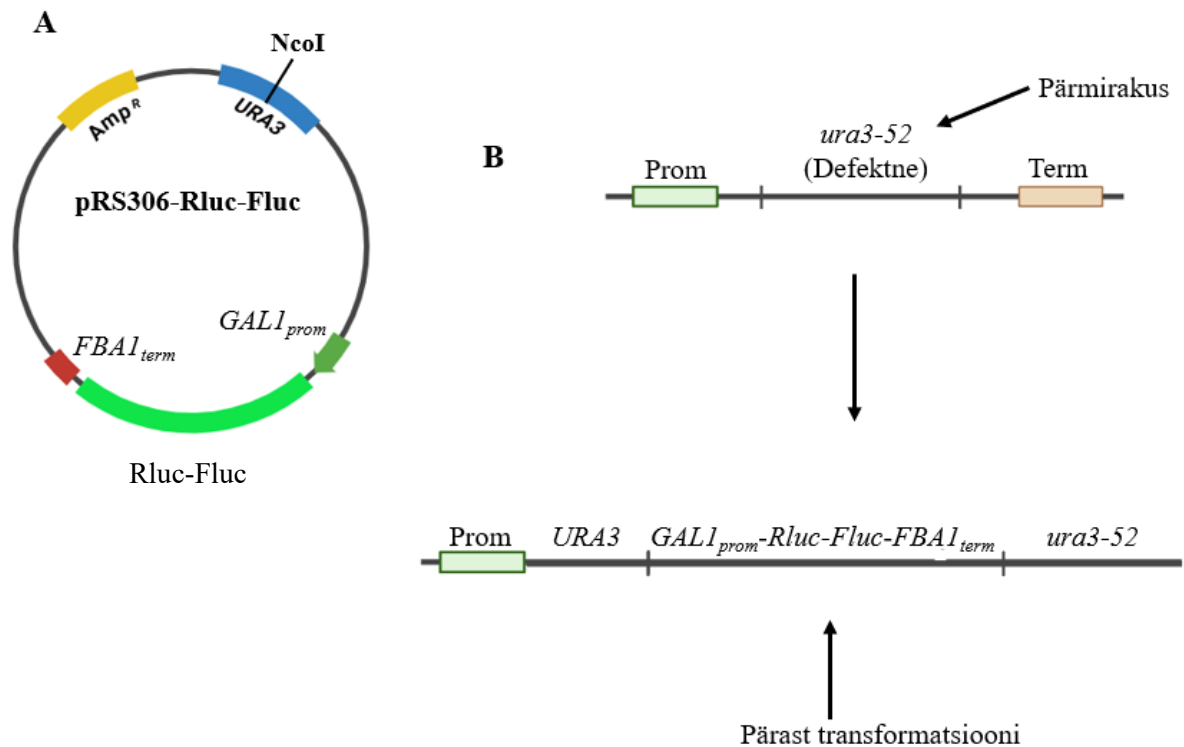
Transformantide analüüsiks kasutati koloonia-PCR meetodit. PCR-i käigus paljundati üks osa *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragmentidest. Reaktsiooni käigus saadud DNA fragmentid analüüsiti agaros-geelelektrofooresil (Joonis 12). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati DNA pikkusmarkerit (Joonis 11, rada L). Koloonia PCR-i käigus paljundatud *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragmentide suurused olid ligikaudu 500 nt ja 1000 nt, mis vastavad nende fragmentide arvutuslikele suurustele (vastavalt 504 ja 942 nt)(Joonis 12, rajad 1-10). Radadel 3 ja 4 ning 8 ja 9 analüüsitud bakterikolooniatest eraldati plasmiidid ning nende õigsust kontrolliti sekveneerimise teel. Saadud reporterplasmiidid nimetati pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-Fluc-FBA1<sub>term</sub> ja pRS306-GAL<sub>prom</sub>-Rluc-2xSnf7-Fluc-FBA1<sub>term</sub> (lühendid pRS306-Rluc-Fluc ja pRS306-Rluc-Fluc)(Joonis 11). Mõlemad plasmiidid sisaldavad *GAL1,10* promootori regulatsiooni all olevaid lutsiferaaside geene; ampitsilliini resistentsusgeeni *E. coli* kolooniate selekteerimiseks; *URA3* markergeeni transformeeritud *S. cerevisiae* tüvede selekteerimiseks (Joonis 11).



**Joonis 12. Bakterikolooniate analüüs koloonia-PCR meetodil 0,9% agarosgeelelektrofooresil.** Rajad 1-5, bakterikolooniad, mis sisaldasid *Rluc-Fluc* fragmendiga plasmiiide; rajad 8-10, bakterikolooniad, mis sisaldasid *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragmendiga plasmiiide; rada L, DNA pikkusmarker (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*).

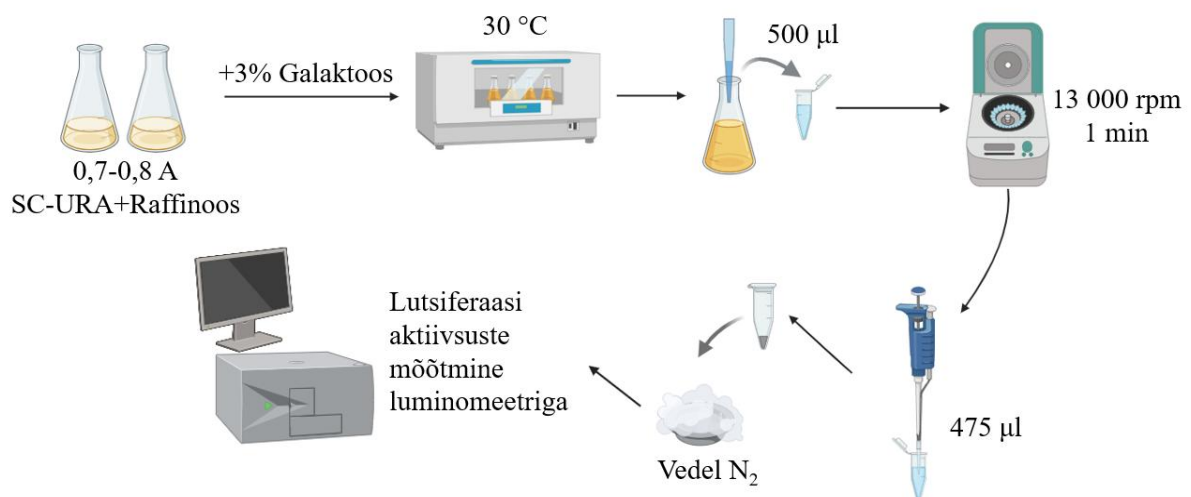
### 2.3.2. Lutsiferaaside gene ekspresserivate pagaripärmi tüvede konstrueerimine

Teiseks etapiks oli konstrueeritud plasmiidide sisestamine pagaripärmi genoomi. Konstrueeritud plasmiididel puudub pagaripärmis töötav replikatsiooni alguspunkt, mille tõttu plasmiidid ei säili ja ei pärandu edasi pärmirakkude jagunemisel. Kuid nendes plasmiidides on funktsionaalne *URA3*, mis kodeerib uratsiili biosünteesi raja ensüümi orotidiin-5'-fosfaadi dekarboksülaasi (*Saccharomyces Genome Database*, <https://www.yeastgenome.org/>). Pagaripärmi metsiktüüpi TYSC309 ja mutantse tüve TYSC906 genoomis on mittefunktsionaalne geenivariant *ura3-52*, mille tõttu on uratsiil kasvuks hädavajalik. Transformeerides konstrueeritud plasmii tüvedesse TYSC309 ja TYSC906 toimub homoloogiline rekombinatsioon plasmiidis oleva *URA3* markergeeni ning pärmi genoomis oleva *ura3-52* lookuse vahel. Rekombinatsiooni tulemusena taastub *URA3* funktsioon (Joonis 13) ning transformatsioonil saadud pärmikolooniad jäävad ellu uratsiilita selektiivsöötmel. Kasutades *URA3* järjestuses asuvat NcoI restriктаasi lõikekohta, konstrueeritud plasmiidid lineariseeriti ning saadud DNA fragmendid transformeeriti pagaripärmi metsiktüüpi ja mutantse tüvedesse. Metsiktüüpi tüve baasil saadi tüved TYSC920 ja TYSC929, mis sisaldasid vastavalt *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* gene. Mutantse tüve transformeerimisel saadi tüved TYSC946 ja TYSC948, mis sisaldasid vastavalt *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* gene.



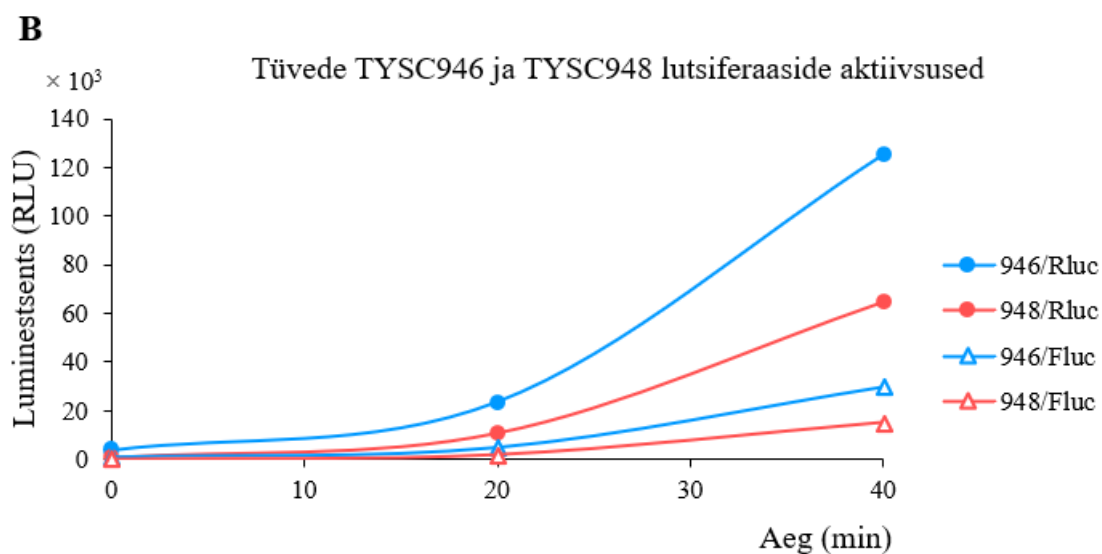
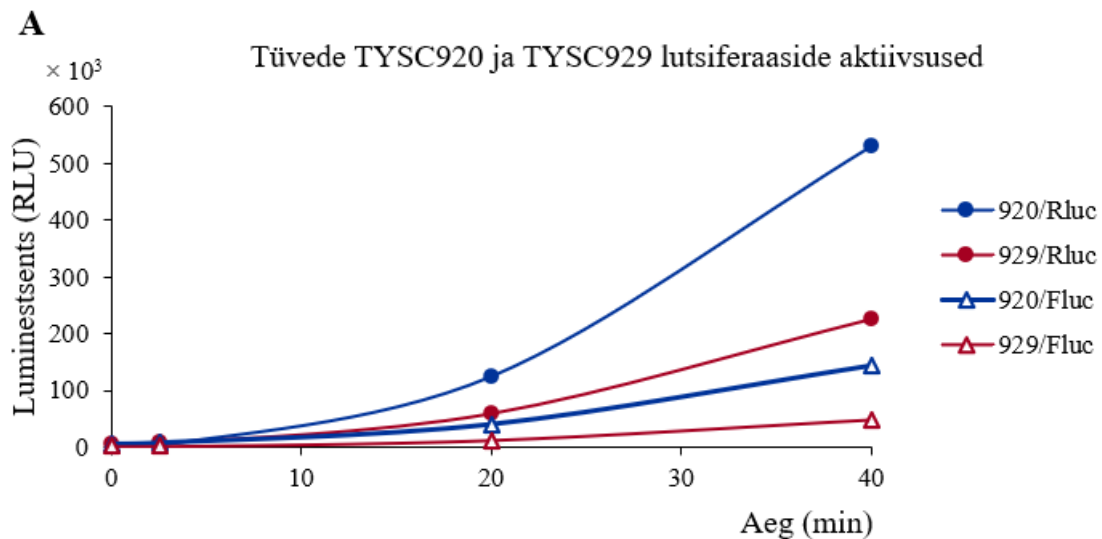
**Joonis 13. Plasmidi pRS306-Rluc-Fluc integreerimine pagaripärmi genoomi *URA3* lookusesse. A**, transformeerimiseks kasutatud plasmidi kaart, mille *URA3* sisaldab *NcoI* restriksioonisaiti. **B**, *URA3* lookus enne ja pärast transformatsiooni. Plasmidi sisenemisel pärmigenoomi toimub *URA3* funktsiooni taastumine. Samasugune integratsioon pagaripärmi genoomi viidi läbi ka pRS306-Rluc-2xSnf7-Fluc plasmiidiga.

Enne reportersüsteemi kasutusele võtmist kontrolliti transformantides lutsiferaaside geenide ekspressiooni. Selleks kasvatati pärmikultuurid eksponentsiaalse kasvufaasini, mil toimub kõige aktiivsem valgusüntees. Seejärel indutseeriti transkriptsioon galaktoosi lisamisega. Kultuuridest võeti proovid enne indutseerimist ning 20 ja 40 minuti möödumisel. Järgmisena mõõdeti lutsiferaaside ensümaatilisi aktiivsusi luminomeetriga (Joonis 13). Mõõdetud tüvedes tuvastati lutsiferaaside aktiivsused. Seega toimub genoomi viidud lutsiferaaside järjestuselt funktsionaalse valgu süntees.



**Joonis 13. Katse ülesehitus lutsiferaaside ensümaatiliste aktiivsuste määramiseks.** Pärmikultuurid kasvatati raffinoosi sisaldaval selektiivsöötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. Seejärel lisati lutsiferaaside geenide transkriptsiooni aktiveerimiseks galaktoosi lõppkontsentratsioonil 3%. Proovid võeti enne indutseerimist ning 20 ja 40 minuti möödumisel. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel, supernatant eemaldati ning rakuosade külmutati N<sub>2</sub>-s. Seejärel mõõdeti proovidest lutsiferaaside ensümaatilised aktiivsused.

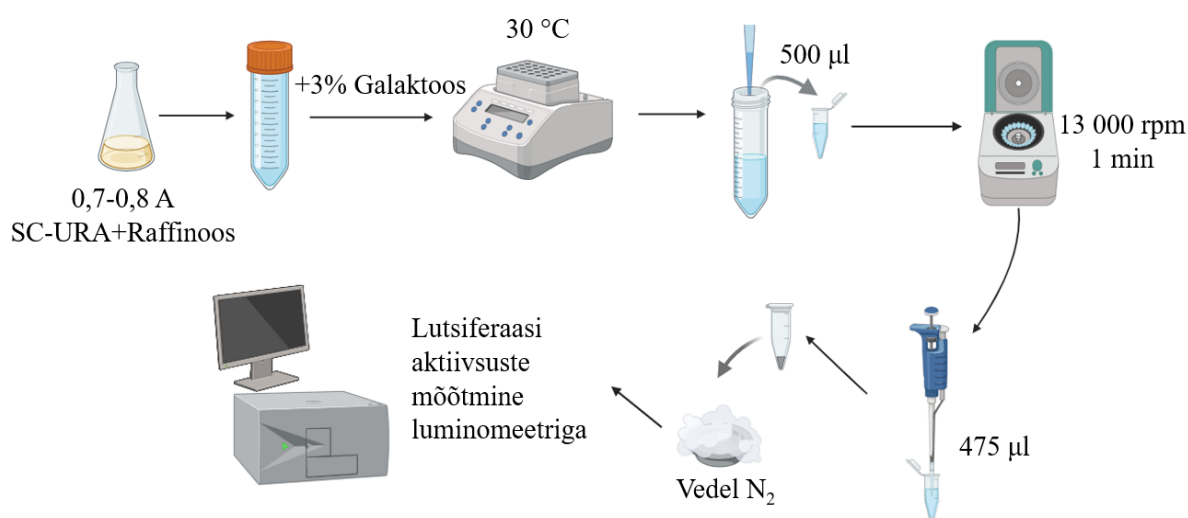
Tulemuste visualiseerimiseks koostati graafikud, mille x-teljel olid proovide võtmise aeg ning y-teljel mõõdetud luminesentsi väärtused (Joonis 14). Andmete analüüsimisel selgus, et tüvede TYSC920 ja TYSC929 rakkudest mõõdetud lutsiferaaside ensümaatilised aktiivsused olid palju kõrgemad kui tüvedest TYSC946 ja TYSC948 mõõdetud aktiivsused. Tüvede TYSC946 ja TYSC948 ribosoomides puuduvad rRNA modifikatsioonid PTC piirkonnas ning see põhjustab madalamat translatsioonitaset. Võrreldes *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc* reporteritega tüvede *firefly* lutsiferaasi aktiivsusi leiti, et see on madalam *Rluc-2xSNF7-Fluc* reporteriga tüvedes. Selle põhjuseks on lutsiferaasi geenide vahel paiknev 2xSnf7 valgudomeen, mille transleerimine võtab aega.



**Joonis 14. Lutsiferaaside aktiivsuste määramine tüvedes TYSC920, TYSC929, TYSC946 ja TYSC948.** Luminestsentsi signaali on väljendatud suhtelistes valguse ühikutes (RLU, ingl *Relative Light Unit*). **A**, tüvede TYSC920 (tumesinine) ja TYSC929 (tumeapunane) *Renilla* (Rluc) ja *firefly* (Fluc) lutsiferaaside aktiivsused. **B**, tüvede TYSC946 (helesinine) ja TYSC948 (heleapunane) *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside aktiivsused. Graafikutel on näidatud *Renilla* lutsiferaasi ensümaatilise aktiivsusest põhjustatud luminescentsi signaali tasemed punktadena. *Firefly* lutsiferaasi puhul on toodud luminescentsi signaalid kolmnurkadena.

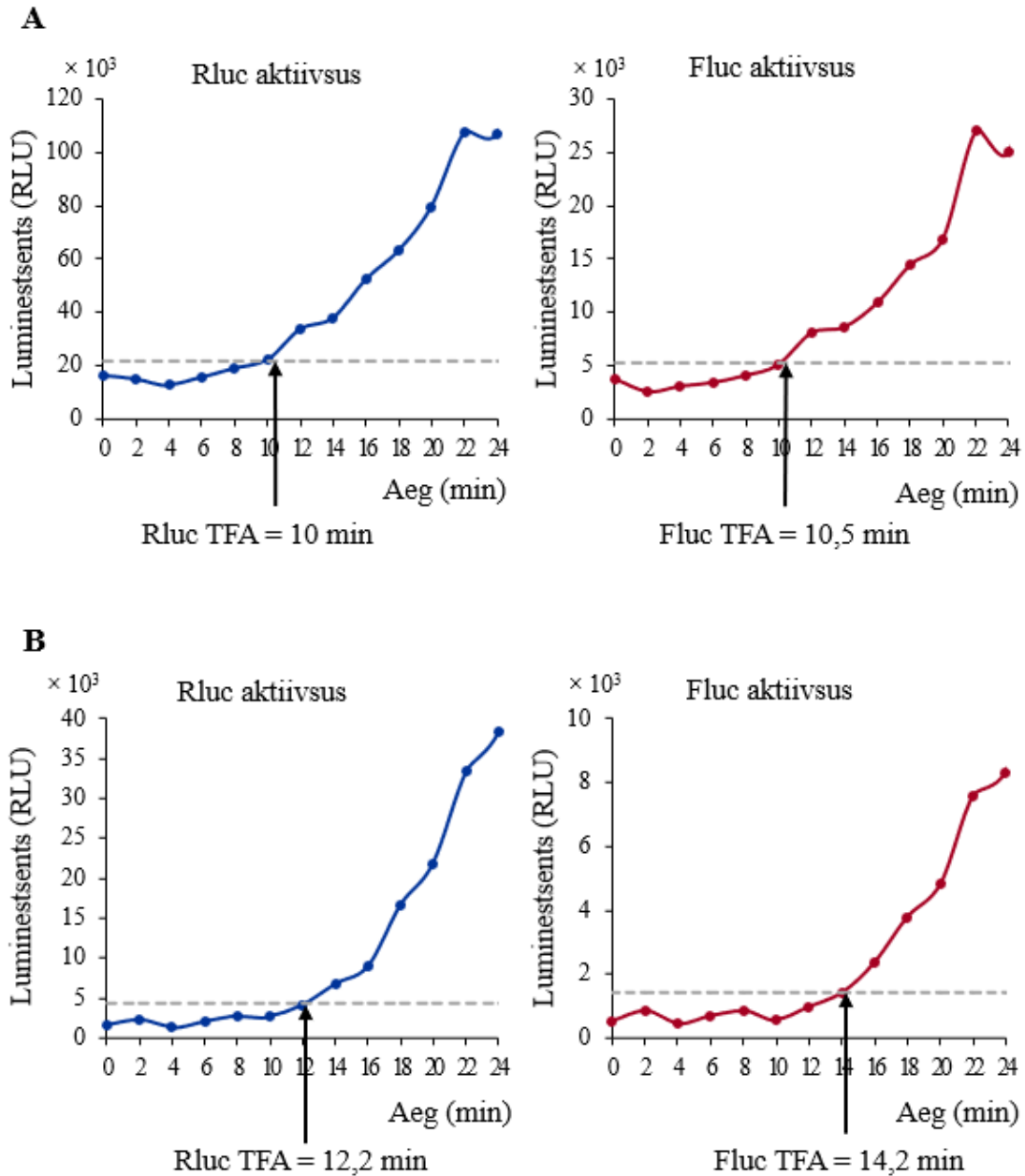
### 2.3.3. Esmase luminesentsi signaali määramine

Ajahetk, mil tekib esmane luminesentsi signaal ehk TFA (ingl *time of the first appearance*), kirjeldab aega, mis kulub *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside sünteesiks. TFA määramiseks kasvatati kõigepealt lahjenduskultuurid eksponentsiaalse kasvufaasini. Järgmisena viidi läbi katse proovide kogumiseks ja lutsiferaasi aktiivsuste mõõtmiseks. Katse ülesehitus on toodud joonisel 15. Rakkudes indutseeriti lutsiferaasi geenide transkriptsiooni galaktoosi lisamisega. Pärmikultuuride indutseerimine toimus loksutavas termoblokis ning ajapunkte võeti iga 2 minuti järel 30 minuti jooksul. Seejärel mõõdeti lutsiferaaside aktiivsused luminomeetriga.

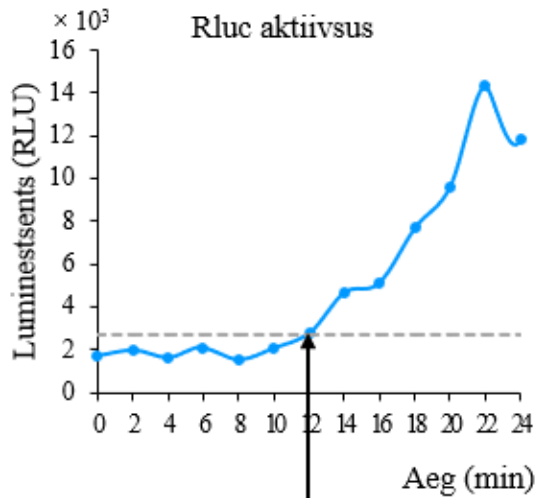


**Joonis 15. Katse ülesehitus esmaste lutsiferaaside aktiivsuste määramiseks.** Pärmikultuurid kasvatati raffinoosi sisaldaval selektiivsöötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. Seejärel lisati lutsiferaaside geenide transkriptsiooni aktiveerimiseks galaktoosi lõppkontsentratsioonil 3%. Pärmikultuure indutseeriti loksutavas termoblokis 30 minutit. Proove võeti iga 2 minuti tagant. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel, supernatant eemaldati ning rakuks külmutati N<sub>2</sub>-s. Seejärel mõõdeti proovidest lutsiferaaside ensümaatilised aktiivsused.

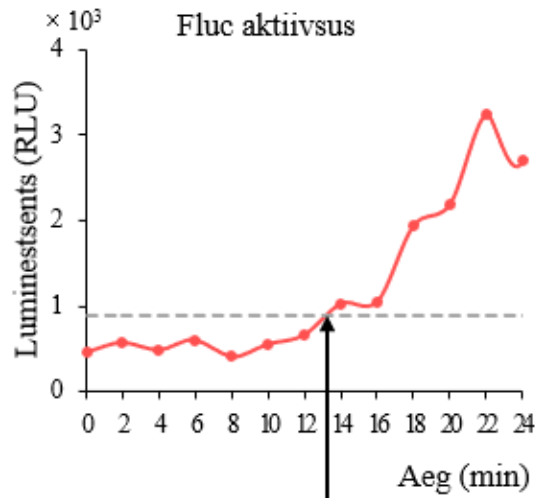
Tulemused visualiseeriti graafikul, mis kujutatas *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside aktiivsuste tõusu ajas. Järgmisena arvutati taustsignaali ülemine piir, liites taustsignaali keskmisele väärtusele selle 4-kordse standardhälbe väärtuse. Esmase lutsiferaasi aktiivsuse määramiseks lisati graafikule taustsignaali ülemise piiri väärtus joonena. Vaadates selle joone lõikepunkti lutsiferaasi aktiivsuse joonega, saab määrata esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimiseks kulunud aja ehk TFA. Tüvede TYSC920, TYSC929, TYSC946 ja TYSC948 määratud TFA väärtused on toodud tabelites 4 ja 5. *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside aktiivsuste graafikud, nende taustsignaali ülemised piirid ja määratud TFA on toodud näidisgraafikutena joonistel 16 ja 17. Igast analüüsitud tüvest on toodud üks näide.



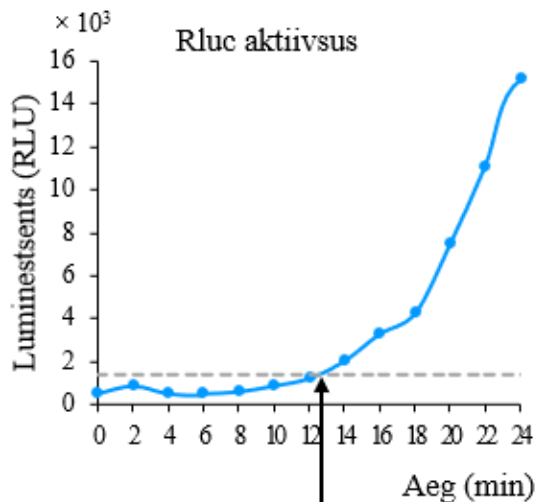
**Joonis 16. Tüvede TYSC920 ja TYSC929 lutsiferaaside aktiivsused ja määratud TFA.** Luminestsentsi signaal on väljendatud suhtelistes valguse ühikutes (RLU). Tumehallina on toodud mõõdetud *Renilla* lutsiferaasi aktiivsus ning tumepunase joonena on toodud mõõdetud *firefly* lutsiferaasi aktiivsus. Halli joonena on toodud taustsignaali kõige ülemine piir ning noolega on tähistatud esimese lutsiferaasi aktiivsuse tekkimiseks kuluv aeg. **A**, *Rluc-Fluc* reporteri lutsiferaaside aktiivsused ja TFA metsiktüüpi põhineval tüvel. **B**, *Rluc-2xSNF7-Fluc* reporteri lutsiferaaside aktiivsused ja TFA metsiktüüpi põhineval tüvel.

**A**

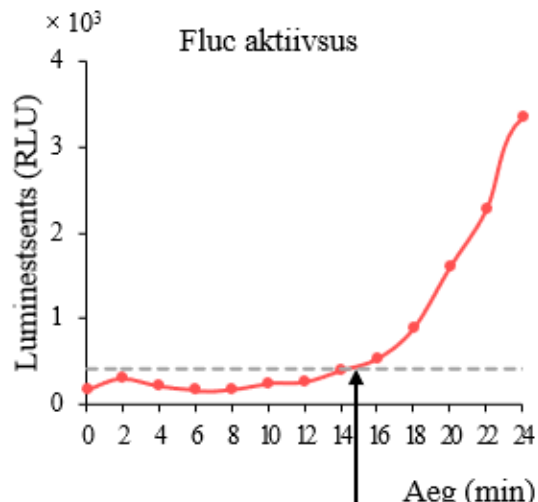
Rluc TFA = 12 min



Fluc TFA = 13,4 min

**B**

Rluc TFA = 12,6 min



Fluc TFA = 14,8 min

**Joonis 17. Tüvede TYSC946 ja TYSC948 lutsiferaaside aktiivsused ja määratud TFA.** Luminesstsentsi signaal on väljendatud suhtelistes valguse ühikutes (RLU). Helesinise joonena on toodud mõõdetud *Renilla* lutsiferaasi aktiivsus ning helepunase joonena on toodud mõõdetud *firefly* lutsiferaasi aktiivsus. Halli joonena on toodud taustsignaali kõige ülemine piir ning noolega on tähistatud esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimiseks kuluv aeg. **A**, *Rluc-Fluc* reporteri lutsiferaaside aktiivsused ja TFA mutandil põhineval tüvel. **B**, *Rluc-2xSNF7-Fluc* reporteri lutsiferaaside aktiivsused ja TFA mutandil põhineval tüvel.

Määratud taustsignaalide võrdlemine näitas nende suurt varieeruvust tüvede vahel (Lisa 1). On võimalik, et SC-URA selektiivsöötmes kasvatatud üleöö- ja lahjenduskultuurides, milles süsinikuallikana kasutatakse raffinoosi, toimub lutsiferaaside transkriptsioon *GALI,10* promootorilt madalal tasemel. Kui raffinoosi asemel oleks kasutatud glükoosi, mis on *GALI,10* promootori repressor, siis katse läbiviimiseks peab pärmirakkudest glükoosi välja pesema või muidu ei saaks transkriptsiooni galaktoosiga aktiveerida.

*Renilla* lutsiferaasi esmase aktiivsuse teke kirjeldab aega, mis kulub initsiatsiooniks ja *Renilla* lutsiferaasi domeeni sünteesimiseks. Määratud *Renilla* lutsiferaasi TFA väärtustest selgus, et need varieeruvad erinevates kultuurides (Lisa 2 ja Lisa 3). Selle põhjuseks on lutsiferaaside ekspressiooni aktiveerimine transkriptsiooni tasemel, mille tõttu mRNA sünteesiks, selle transpordiks tsütoplasmasse ja valgusünteesiks kuluv aeg on erinevates kultuurides erinev.

#### 2.3.4. Metsiktüübi ja mutantsete ribosoomide elongatsioonikiiruste võrdlemine

Määratud *Renilla* ja *firefly* TFA väärtuste kaudu saab arvutada  $\Delta$ TFA, mis väljendab vahejärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi domeeni sünteesiks kulunud aega. Selle arvutamiseks lahutati *firefly* lutsiferaasi TFA väärtusest *Renilla* TFA väärtus. Seejärel arvutati iga tüve jaoks  $\Delta$ TFA keskmine ning standardhälve (Lisa 2 ja Lisa 3). Metsiktüübil põhinevate tüvede TYSC920 ja TYSC929 keskmised  $\Delta$ TFA väärtused on vastavalt  $0,43 \pm 0,08$  ja  $1,93 \pm 0,29$  minutit (Lisa 2). Tüvede TYSC946 ja TYSC948 keskmised  $\Delta$ TFA väärtused on vastavalt  $1,35 \pm 0,37$  ja  $2,80 \pm 0,66$  minutit (Lisa 3). Võrreldes tüvede TYSC946 ja TYSC948 ning TYSC920 ja TYSC929 keskmisi  $\Delta$ TFA väärtusi, on näha, et mutantseid ribosoomide sisaldavatel tüvedel on need väärtused suuremad kui metsiktüüpi ribosoomidega tüvedel. Seega kulub mutantidel lisajärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi domeeni sünteesimiseks ning translatsiooni lõpetamiseks rohkem aega. Ribosoomide elongatsioonikiiruste analüüsimiseks võrreldi *2xSnf7* valgudomeeni sünteesiks kulunud aega metsiktüüpi ja mutantseid ribosoomide sisaldavates tüvedes. Selleks lahutati *Rluc-2xSNF7-Fluc* reporteritega tüvede keskmisest  $\Delta$ TFA väärtustest *Rluc-Fluc* reporteritega tüvede keskmine  $\Delta$ TFA väärtus. Metsiktüüpi ribosoomidel kulus *2xSnf7* valgudomeeni sünteesimiseks 1,50 minutit. Tüvedel, mis sisaldavad mutantseid ribosoomide, kulus selle valgudomeeni sünteesiks 1,45 minutit. Nende tulemuste võrdlemisel selgus, et metsiktüüpi ja mutantsetel ribosoomidel kulub sama palju aega *2xSnf7* valgudomeeni sünteesimiseks. Sellest võib järeldada, et PTC piirkonnas olevad rRNA modifikatsioonid, mis on puudu mutantsetes ribosoomideas, ei mõjuta lisajärjestuse translatsioonikiirust.

## 2.4. Arutelu

Varasemalt on molekulaarbioloogia õppetoolis väljatöötatud *in vitro* reportersüsteem ribosoomide elongatsioonikiiruse määramiseks (Kisly jt., 2021). See süsteem põhineb *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel, mille sünteesi uuritakse rakuvabas translatsioonisüsteemis. Reportersüsteem kasutab plasmidi pUC18-Dual, mis kodeerib *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalku. Selline kahel lutsiferaasil töötav reportersüsteem võimaldab uurida ning eristada translatsioonis initsiatsiooni ja elongatsiooni etappe. Ribosoomide elongatsioonikiiruse määramiseks konstrueeriti lisaks viis plasmidi, kuhu *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasi kodeerivate järjestuste vahele viidi lisajärjestused. Nendeks lisajärjestusteks valiti erinevaid valgudomeene kodeerivaid järjestusi, millest üks sünteesib 2xSnf7 valgudomeeni, mis koosneb kahest 73 aminohappe pikkusest  $\alpha$ -heeliksist. Ribosoomide elongatsioonikiiruse määramiseks, mõõdeti alguses lutsiferaasi ensüümide aktiivsused ning seejärel määrati aeg, mis kulub esmase lutsiferaasi aktiivsuse tekkimiseks ehk TFA. Lahutades *firefly* lutsiferaasi TFA väärtusest *Renilla* lutsiferaasi TFA, saab teada kui palju aega kulus lisatud järjestuse ja *firefly* valgu sünteesiks ning terminatsiooniks (nn.  $\Delta$ TFA). Saadud tulemustest selgus, et metsiktüüpi ribosoomidel kulus 2xSnf7 domeeni sünteesiks  $1,35 \pm 0,14$  minutit (Kisly jt., 2021).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalgul põhinev reportersüsteem, millega saaks mõõta ribosoomide aktiivsust *in vivo*. Ribosoomide aktiivsuste mõõtmiseks kasutati organismi *S. cerevisiae* metsiktüüpi TYSC309 ja mutantset TYSC906 tüvesid. Tüve TYSC906 on kasutatud PTC piirkonnas paikneva nelja konserveerunud rRNA modifikatsiooni olulisuse uurimiseks pagaripärmis (Leppik jt., 2024). Tüve TYSC906 saamiseks deleteeriti kolm snoRNA geeni ja loodi ensüümide Nop2 ja Spb1 mittekatalüütilised variandid. Konstrueeritud mutandil määrati kasvukiirus, globaalse translatsiooni tase ja translatsiooni täpsus. Tulemustest selgus, et mutantidel tüvel oli kasvukiirus 30 °C juures kolm korda aeglasem võrreldes metsiktüüpi tüvedega. Veel selgus, et see tüvi on külmatundlik. Ribosoom-polüsoom profiile uurides tuli välja, et mutantsel tüvel oli tõusnud vabade 40S alaühikute hulk, kuid aktiivselt transleerivate 80S ribosoomide hulk oli langenud. See põhjustas 2,6 korda madalamat globaalse translatsiooni taset võrreldes metsiktüübiga. Translatsiooni täpsuse määramiseks kasutati reporterplasmide ning analüüsiti stoppkoodonite läbilugemist. Tulemusena leiti, et rRNA modifikatsioonide puudumisel muutuvad mutantsed ribosoomid täpsemaks. Nendest tulemustest järeldati, et PTC piirkonnas olevatel

konserveerunud rRNA modifikatsioonidel on oluline roll optimaalseks translatsiooniks (Leppik jt., 2024).

Pagaripärmi ribosoomide translatsiooni uurimiseks *in vivo* töötati välja uurimistöö raames reportersüsteem. Selle rakendamiseks kasutati metsiktüüpi ja mutantset tüve, kus oli PTC piirkonnas puudu neli conserveerunud rRNA modifikatsiooni (Leppik jt., 2024). Süsteemi välja töötamiseks konstrueeriti esmalt pUC18-Dual ja pUC18-Dual146 reporterplasmiidide põhjal kaks plasmidi, millest üks sisaldas *Rluc-Fluc* ja teine *Rluc-2xSNF7-Fluc* geenide fragmente. Mõlemad plasmiidid integreeriti pagaripärmi metsiktüüpi tüve ja mutantse tüve genoomi. Saadud tüvedest on võimalik mõõta *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside aktiivsusi ajas ning nende põhjal on võimalik arvutada  $\Delta$ TFA. Mõõdetud lutsiferaaside aktiivsustest selgus, et tüvede vahel esineb taustsignaali suur varieeruvus (Lisa 1). Genoomi sisestatud lutsiferaaside geenid on *GALI,10* promootori regulatsiooni all. On võimalik, et SC-URA selektiivsöötmes, milles süsinikuallikana kasutatakse raffinoosi, toimub transkriptsioon *GALI,10* promootorilt madalal tasemel. Taustsignaali varieeruvuse vähendamiseks peaks tulevikus välja selekteerima sellised konstrueeritud tüved, mille taustsignaalid on madalad ja sarnased. Tüvede võrdlemisel selgus ka, et *Renilla* lutsiferaasi esmase signaali tekkimisele kulunud aeg on erinevates kultuurides erinev (Lisa 2 ja Lisa 3). Lutsiferaaside ekspressioon aktiveeritakse transkriptsiooni tasemel. Aeg, mis kulub mRNA sünteesiks, selle transpordiks tsütoplasmasse ja valgusünteesiks on erinevates kultuurides varieeruv. Seetõttu ei ole võimalik *in vivo* reporterplasmiidide kasutades määrata translatsiooni initsiatsiooniks kulunud aega ning translatsiooni analüüsimise alguspunktiks võeti *Renilla* TFA ehk ajapunkt, mil *Renilla* valgudomeen oli valmis sünteesitud. Järgmisena võrreldi tüvede, mis sisaldasid metsiktüüpi või mutantseid ribosoomide, arvutatud  $\Delta$ TFA väärtusi. Tulemustest selgus, et mutantsetel ribosoomidel kulus rohkem aega *firefly* domeeni ning 2xSnf7 ja *firefly* lutsiferaasi domeenide sünteesiks ning terminatsiooniks. Et hinnata metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide elongatsioonikiirust, arvutati välja aeg, mis kulus 2xSnf7 valgudomeeni sünteesiks. Saadud tulemustest selgus, et mutantsete ja metsiktüüpi ribosoomid transleerivad lisajärjestust ligikaudu samasuguse kiirusega. See tulemus näitab, et mutantsete ribosoomide PTC piirkonnas conserveerunud rRNA modifikatsioonide puudumine ei mõjuta elongatsioonikiirust võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega. Põhjuseks, miks 2xSnf7 valgudomeeni sünteesiks kulunud aeg on metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide puhul sarnane, võib olla see, et 2xSnf7 domeen on struktuuri poolest lihtne ning ei sisalda laetud aminohappeid. Mutantsete ja metsiktüüpi ribosoomide translatsiooni võrdlemisel selgus, et mutantsetel ribosoomidel kulub rohkem aega *firefly* valgudomeeni sünteesiks ja terminatsiooniks. Varasemalt on uuritud organismis *E. coli* PTC piirkonnas conserveerunud

nukleotiide (positsioonid A2451, U2506, U2585 ning A2602) ning nende olulisust peptiidideme moodustumisel ja selle vabanemisel ribosoomilt (Youngman jt., 2004). Selles töös konstrueeriti mutandid, mille PTC piirkonna neli konserveerunud nukleotiidi olid asendatud teiste nukleotiididega. Kineetilistest analüüsides selgus, et mutantidel ei olnud erinevust metsiktüübiga peptiidahela sünteesimisel, kuid peptiidahela vabanemine ribosoomilt oli raskendatud. Kuna *firefly* lutsiferaasi ensümaatilise aktiivsuse tekib alles siis kui liitvalk on vabanenud ribosoomilt, võib oletada, et konserveerunud rRNA modifikatsioonidel on tõenäoliselt oluline roll peptiidi vabanemisel ning selle tõttu pikeneb mutantsetel ribosoomidel terminatsiooniks kuluv aeg.

Käesolevas töös konstrueeriti *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasil põhinev reportersüsteem, millega saab määrata ribosoomide elongatsioonikiirust *in vivo*. *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasi ensümaatilise aktiivsuse mõõdeti iga tüvega 5-6 korda. Väikse korduste arvu tõttu ei saa  $\Delta TFA$  väärtusi täpsemalt määrata, kuna standardhälbe väärtused on suured. Nende andmete põhjal saab ainult hinnata metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide aktiivsusi. Ribosoomide elongatsioonikiiruse täpsemaks hindamiseks peaks tegema rohkem katsekordusi, et koguda piisavalt andmeid. Reportersüsteemi edaspidise rakendusena võiks uurida mutantsete ribosoomide elongatsiooni kiiruse stressitingimustes. Varasemalt on uuritud mutantse tüve TYSC906 kasvufenotüüpi temperatuuridel 30 °C, 20 °C ja 15 °C (Leppik jt., 2024). Võrreldes metsiktüübiga oli mutandil aeglasem kasv 30 °C juures, temperatuuridel 20 °C ning 15 °C kasvu ei olnud (Leppik jt., 2024). Seega, kasutades väljatöötatud reportersüsteemi, on võimalik näha suuremaid erinevusi metsiktüüpi ja mutantsete ribosoomide aktiivsustes, kui kasvatada rakke stressitingimustel, näiteks temperatuuril 25 °C. Veel oleks võimalik reportersüsteemiga uurida, kuidas mõjutavad haruldased koodonid või kompleksemad struktuuriga domeene kodeerivad lisajärjestused mutantsete ribosoomide elongatsioonikiirust. Selle katse läbiviimiseks peaks konstrueerima uued tüved, mille *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside vahele on sisestatud haruldaste koodonitega lisajärjestus. Seejärel saab nendes tüvedes mõõta lutsiferaaside aktiivsusi ja määrata lisajärjestuse sünteesimiseks kulunud aja. Kasutades arvutatud  $\Delta TFA$  väärtusi, saab analüüsida ning võrrelda mutantsetes ja metsiktüüpi ribosoomides haruldaste koodonite mõju lisajärjestuse sünteesile.

Kokkuvõtteks, käesolevas töös konstrueeriti kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem, mis võimaldab hinnata ribosoomide aktiivsust *in vivo*. Sellel süsteemil on mitu eelist *in vitro* süsteemi ees. Üheks eeliseks on selle süsteemi lihtsus. Et viia läbi *in vitro* translatsiooni, on vaja teha rohkem ettevalmistusi. Esmalt on vaja valmistada rakuvaba lüsaat, mis sisaldab

translatsiooniks vajalikke ribosome ja komponente. Lisaks on vaja transkribeerida reaktsiooni lisatav mRNA. Selle valmistamine toimub mitmes etapis: mRNA sünteesitakse *in vitro*, puhastatakse ja mRNA 5' otsa lisatakse *cap*-struktuur. Olles viinud läbi need ettevalmistused, saab alustada *in vitro* translatsiooni. *In vivo* süsteemis on lutsiferaase kodeerivad järjestused integreeritud pärmigenoomi *GALI,10* promootori regulatsiooni alla. Lutsiferaasi geenide ekspressiooni saab aktiveerida galaktoosi lisamisega. Seejärel on võimalik erinevatel ajapunktides kogutud proovidest mõõta lutsiferaaside aktiivsused. Need katsed saab viia läbi 1-2 päeva jooksul, mis võimaldab analüüsida mitmeid mutante samaaegselt.

## KOKKUVÕTE

Kahel lutsiferaasil põhinevaid reportersüsteeme kasutatakse laialdaselt geeniekspressiooni uurimiseks. Eelnevalt on molekulaarbioloogia õppetoolis töötatud välja *Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev *in vitro* reportersüsteem ribosoomide translatsiooni uurimiseks (Kisly jt., 2021). Selle süsteemi reporter koosneb *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside liitvalgust, mille translatsiooni analüüsitakse pagaripärmi rakuvabas translatsioonisüsteemis. Selline kahel lutsiferaasil põhinev reportersüsteem võimaldab uurida ning eristada translatsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni etappe ning määrata ribosoomide protsessiivsust. Sisestades lisajärjestusi lutsiferaaside liitvalku kodeerivasse järjestusse, on võimalik määrata ribosoomide elongatsioonikiirust selle domeeni sünteesimisel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli töötada välja kahel lutsiferaasil põhinev *in vivo* reportersüsteem. Töö jagunes kolmeks etapiks. Esmalt konstrueeriti integreeritavad plasmiidid, mis sisaldasid lutsiferaaside geene. Reporteritena kasutati fragmente *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc*, mida on kasutatud ka *in vitro* süsteemis. Teises etapis konstrueeriti pärmitüved sisestades lutsiferaase kodeerivad plasmiidid pärmigenoomi. Kasutati metsiktüüpi pagaripärmi tüve ning mutantset tüve, mille ribosoomides puuduvad konserveerunud rRNA modifikatsioonid peptidüültransferaasse tsentri piirkonnas. Saadud tüvedes mõõdeti lutsiferaaside ensümaatilisi aktiivsusi. Kolmandas etapis määrati lutsiferaaside esmase aktiivsuse tekkimise aega. Nende väärtuste põhjal arvutati *firefly* lutsiferaasi või lisajärjestuse ja *firefly* lutsiferaasi sünteesiks ning terminatsiooniks kulunud aeg. Elongatsioonikiiruse hindamiseks määrati metsiktüüpi ja mutantsetel ribosoomidel *2xSNF7* lisajärjestuse sünteesimiseks kulunud aeg.

Uurimistöö tulemusena konstrueeriti metsiktüübi ja mutandil põhinevad pagaripärmi tüved, mille genoomi oli integreeritud lutsiferaaside fragmendid *Rluc-Fluc* ja *Rluc-2xSNF7-Fluc*. Analüüsitud tüvedes tuvastati lutsiferaaside aktiivsused. Seega toimub genoomi viidud lutsiferaaside järjestuselt funktsionaalse valgusüntees. Ribosoomide elongatsioonikiiruste määramisel selgus, et metsiktüüpi ja mutantsetel ribosoomidel kulub sama palju aega *2xSNF7* valgudomeeni sünteesimiseks. Määrates *firefly* lutsiferaaside esmaseid aktiivsusi täheldati, et mutantsetel ribosoomidel kulus rohkem aega *firefly* lutsiferaasi valgudomeeni sünteesimiseks ja terminatsiooniks. Sellest võib järeldada, et peptidüültransferaasse tsentri piirkonnas asuvad rRNA modifikatsioonid on olulised peptidahela vabanemiseks.

## SUMMARY

### ***In vivo* reporter system based on *Renilla* and *firefly* luciferases for translation analysis in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Patrick Busch

Ribosomes are macromolecular machines consisting of ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins (r-proteins). The main function of ribosomes is to synthesise proteins using the information from mRNA (messenger RNA). RNA modifications are widespread in nature. These modifications enable hydrogen bonding between nucleotides, stabilising the RNA structure. Ribosomal RNA is highly modified and these modifications cluster in functionally important regions, such as the decoding centre and the peptidyl transferase centre (PTC) (Sharma & Lafontaine, 2015). The PTC region is responsible for aminolysis of the ester bond between peptidyl-tRNA and aminoacyl-tRNA, resulting in the formation of peptide bonds (Simonovic & Steitz, 2009). A reporter system based on *Renilla* and *firefly* luciferases has been developed to study ribosome translation *in vitro* (Kisly *et al.*, 2021). Literature reviews of the thesis will discuss the structure of ribosomes and PTC in more detail. RNA modifications and snoRNP-mediated modification mechanism will be discussed in further detail. The thesis will also give a review of dual luciferase assays, with a particular focus on the *Renilla* and *firefly* reporter system.

The aim of this study was to develop a reporter system based on two luciferases. The study was divided into three phases. First, plasmids containing luciferase genes were constructed that could be integrated into the yeast genome. *Rluc-Fluc* and *Rluc-2xSNF7-Fluc* fragments were used as reporters. Secondly, yeast strains were constructed by inserting luciferase-encoding plasmids into the yeast genome. Wild-type budding yeast strain and a mutant strain lacking conserved rRNA modifications in the PTC region were used. The enzymatic activities of each luciferase were then measured in the resulting strains. Thirdly, the time of the first appearance of the luminescence signal of luciferase was determined. From these values, the time taken for synthesis and termination of the *firefly* luciferase, as well as the time taken for synthesis and termination of the additional coding sequences and *firefly* luciferase, was calculated. To estimate ribosomal elongation rate, the time taken for the synthesis of the *2xSNF7* additional coding sequence in wild-type and mutant ribosomes was determined.

This research resulted in the construction of wild-type and mutant-based strains of budding yeast in which the luciferase coding sequences (*Rluc-Fluc* and *Rluc-2xSNF7-Fluc*) were integrated into the genome. Luciferase activities were detected in the analysed strains. Thus, the synthesis of a functional enzymes takes place from the sequences inserted into the genome. The elongation rate of ribosomes was calculated, revealing that both wild-type and mutant ribosomes synthesize the 2xSnf7 protein domain at a comparable rate. The determination of the time of the first appearance of the luminescence signal of *firefly* luciferases showed that the synthesis and termination of the *firefly* luciferase protein domain took longer for mutant ribosomes. This suggests that rRNA modifications in the PTC region are important for releasing the synthesised peptide chain.

## TÄNUSÕNAD

Südamest sooviksin tänada oma juhendajat Tiina Tamme abivalmiduse, kannatlikkuse ja positiivse suhtumise eest. Tänan ka Margust Leppikut abi eest. Lisaks sooviksin tänada Helena Randmäge, kes laenas koguaeg mulle enda pipetti. Tänan ka molekulaarbioloogia õppetooli abivalmiduse ja meeldiva seltskonna eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Azad, T., Janse van Rensburg, H. J., Morgan, J., Rezaei, R., Crupi, M. J. F., Chen, R., Ghahremani, M., Jamalkhah, M., Forbes, N., Ilkow, C., & Bell, J. C. (2021). Luciferase-Based Biosensors in the Era of the COVID-19 Pandemic. *ACS nanoscience Au*, *1*(1), 15–37. <https://doi.org/10.1021/acsnanoscienceau.1c00009>

Baudin-Baillieu, A., & Namy, O. (2021). *Saccharomyces cerevisiae*, a Powerful Model for Studying rRNA Modifications and Their Effects on Translation Fidelity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7419. <https://doi.org/10.3390/ijms22147419>

Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6062), 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>

Bonnerot, C., Pintard, L., & Lutfalla, G. (2003). Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Molecular cell*, *12*(5), 1309–1315. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00435-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00435-0)

de Beus, E., Brockenbrough, J. S., Hong, B., & Aris, J. P. (1994). Yeast NOP2 encodes an essential nucleolar protein with homology to a human proliferation marker. *The Journal of cell biology*, *127*(6 Pt 2), 1799–1813. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1799>

Esguerra, J., Warringer, J., & Blomberg, A. (2008). Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(4), 649–656. <https://doi.org/10.1261/rna.845808>

González-Ponce, K. S., Celaya-Herrera, S., Mendoza-Acosta, M. F., & Casados-Vázquez, L. E. (2025). Cell-Free Systems and Their Importance in the Study of Membrane Proteins. *The Journal of membrane biology*, *258*(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s00232-024-00333-0>

- Green, R., & Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annual review of biochemistry*, 66, 679–716. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.679>
- Huang, Z. H., Du, Y. P., Wen, J. T., Lu, B. F., & Zhao, Y. (2022). snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell death discovery*, 8(1), 259. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01056-8>
- Kaskova, Z. M., Tsarkova, A. S., & Yampolsky, I. V. (2016). 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society reviews*, 45(21), 6048–6077. <https://doi.org/10.1039/c6cs00296j>
- Kirkpatrick, A., Xu, T., Ripp, S., Sayler, G., & Close, D. (2019). Biotechnological Advances in Luciferase Enzymes. IntechOpen. doi: [10.5772/intechopen.85313](https://doi.org/10.5772/intechopen.85313)
- Kisly, I., & Tamm, T. (2023). Archaea/eukaryote-specific ribosomal proteins - guardians of a complex structure. *Computational and structural biotechnology journal*, 21, 1249–1261. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.01.037>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab121>
- Knop, M.; Siegers, K.; Pereira, G.; Zachariae, W.; Winsor, B.; Nasmyth, K.; Schiebel, E. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: More tags and improved practical routines. *Yeast* 1999, 15, 963–972. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199907\)15:10B<963::AID-YEA399>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10B<963::AID-YEA399>3.0.CO;2-W)
- Kressler, D., Rojo, M., Linder, P., & Cruz, J. (1999). Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 27(23), 4598–4608. <https://doi.org/10.1093/nar/27.23.4598>

- Leppik, M., Pomerants, L., Põldes, A., Mihkelson, P., Remme, J., & Tamm, T. (2024). Loss of Conserved rRNA Modifications in the Peptidyl Transferase Center Leads to Diminished Protein Synthesis and Cell Growth in Budding Yeast. *International journal of molecular sciences*, 25(10), 5194. <https://doi.org/10.3390/ijms25105194>
- Ojha, S., Malla, S., & Lyons, S. M. (2020). snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules*, 10(5), 783. <https://doi.org/10.3390/biom10050783>
- Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S., & Dontsova, O. A. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nature chemical biology*, 14(3), 226–235. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2569>
- Sharma, S., & Lafontaine, D. L. J. (2015). 'View From A Bridge': A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends in biochemical sciences*, 40(10), 560–575. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.008>
- Sherman F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in enzymology*, 350, 3–41. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)50954-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)50954-x)
- Simonović, M., & Steitz, T. A. (2009). A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochimica et biophysica acta*, 1789(9-10), 612–623. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2009.06.006>
- Syed, A. J., & Anderson, J. C., (2021). Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society reviews*, 50(9), 5668–5705. <https://doi.org/10.1039/d0cs01492c>
- Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M. J., Clarke, L., & Carbon, J. (1999). Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Molecular and cellular biology*, 19(11), 7461–7472. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7461>
- Taoka, M., Nobe, Y., Yamaki, Y., Sato, K., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Yamauchi, Y., Hirota, K., Nakayama, H., Takahashi, N., & Isobe, T. (2018). Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic acids research*, 46(18), 9289–9298. <https://doi.org/10.1093/nar/gky811>

Tirumalai, M. R., Rivas, M., Tran, Q., & Fox, G. E. (2021). The Peptidyl Transferase Center: a Window to the Past. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 85(4), e0010421. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00104-21>

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., & Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443–457. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90120-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90120-f)

Webster, S. F., & Ghalei, H. (2023). Maturation of small nucleolar RNAs: from production to function. *RNA biology*, 20(1), 715–736. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2254540>

Woolford, J. L., Jr, & Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643–681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>

Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., & Green, R. (2004). The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell*, 117(5), 589–599. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00411-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00411-8)

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

*Saccharomyces Genome Database*, <https://www.yeastgenome.org/> Viimati kasutatud 21.05.25

*RibosomeGallery*, <http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery> Viimati kasutatud

09.05.25

# LISAD

## Lisa 1.

### Mõõdetud *Renilla* ja *firefly* lutsiferaaside taustsignaalide tugevused

Tüvi	Kultuuri number	Rluc taustsignaal	Fluc taustsignaal
TYSC920	1	14201	3251
	2	14636	3897
	3	14927	3179
	4	15539	3936
	5	17287	6107
	6	16281	4125
TYSC929	1	2149	666
	2	3797	768
	3	3784	1279
	4	5225	1876
	5	3139	1014
TYSC946	1	1871	535
	2	1748	485
	3	2783	805
	4	1982	622
	5	2083	594
TYSC948	1	713	253
	2	520	197
	3	528	217
	4	641	218
	5	842	282

**Lisa 2.****Tüvede TYSC920 ja TYSC929 määratud lutsiferaaside TFA-d, arvutatud  $\Delta$ TFA-d, nende keskmised koos standardhälbega.**

Reporter	Kultuuri number	Rluc TFA (min)	Fluc TFA (min)	$\Delta$ TFA (min)
<i>Rluc-Fluc</i>	1	11,50	12,00	0,50
	2	11,40	11,80	0,40
	3	10,00	10,50	0,50
	4	11,60	12,00	0,40
	5	11,50	12,00	0,50
	6	11,50	11,80	0,30
keskmine $\Delta$ TFA $\pm$ SD =				<b>0,43 <math>\pm</math> 0,08</b>
<i>Rluc-2xSNF7-Fluc</i>	1	9,40	11,60	2,20
	2	12,20	14,20	2,00
	3	10,00	12,00	2,00
	4	8,60	10,75	2,15
	5	9,20	11,00	1,80
	6	12,00	13,40	1,40
keskmine $\Delta$ TFA $\pm$ SD =				<b>1,93 <math>\pm</math> 0,29</b>

### Lisa 3.

Tüvede TYSC946 ja TYSC948 määratud lutsiferaaside TFA-d, arvutatud  $\Delta$ TFA-d, nende keskmised koos standardhälbega.

Reporter	Kultuuri number	Rluc TFA (min)	Fluc TFA (min)	$\Delta$ TFA (min)
<i>Rluc-Fluc</i>	1	12,00	13,40	1,40
	2	11,20	12,80	1,60
	3	14,40	16,20	1,80
	4	11,75	12,80	1,05
	5	13,50	14,40	0,90
keskmise $\Delta$ TFA $\pm$ SD =				<b>1,35 <math>\pm</math> 0,37</b>
<i>Rluc-2xSNF7-Fluc</i>	1	11,00	14,00	3,00
	2	10,80	14,60	3,80
	3	13,00	15,80	2,80
	4	12,60	14,80	2,20
	5	12,00	14,20	2,20
keskmise $\Delta$ TFA $\pm$ SD =				<b>2,80 <math>\pm</math> 0,66</b>

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Patrick Busch,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „*Renilla* ja *firefly* lutsiferaasidel põhinev *in vivo* reportersüsteem translatsiooni analüüsimiseks pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*”, mille juhendaja on molekulaarbioloogia professor Tiina Tamm reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Patrick Busch

24.05.2025