

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Ivan Kisly

***Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelise silla eB12  
funktsionaalne analüüs**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Tiina Tamm

PhD Jaanus Remme

TARTU 2014

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Eukarüootide ribosoom <i>S. cerevisiae</i> näitel .....	6
1.1.1 Ribosoomi 40S ja 60S subühikud .....	7
1.2 Subühikute vahelised sillad.....	10
1.2.1 Konserveerunud sillad.....	10
1.2.2 Eukarüoodi spetsiifilised sillad .....	13
1.3 Eukarüoodi spetsiifiline sild eB12 .....	15
1.3.1 <i>S.cerevisiae</i> valk rpL19 ja seda kodeerivad geenid.....	16
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjalid ja meetodika .....	21
2.2.1 Kasutatud tüved ja söötmed .....	21
2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid.....	24
2.2.3 Kloneerimine.....	25
2.2.4 Pärmirakkude temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil.....	25
2.2.5 Ribosoomide profiilide analüüs .....	26
2.2.6 Üldise translatsioonitaseme määramine .....	26
2.2.7 Üldise transkriptsioonitaseme määramine.....	27
2.2.8 Ribosoomide translatsioonitäpsuse määramine.....	27
2.2.9 <i>RPL19A</i> geeni transkriptsiooni seiskamine .....	29
2.3. Tulemused .....	30
2.3.1 <i>Δrpl19A</i> ja <i>Δrpl19B</i> mutantide iseloomustamine .....	30
2.3.2 Sünteetilise letaalsuse komplementeerimine.....	33
2.3.3 <i>RPL19A</i> geeni transkriptsiooni seiskamine.....	36
2.3.4 Subühikute vahelise silla eB12 funktsionaalne analüüs.....	38
2.4 Arutelu.....	47
KOKKUVÕTE.....	51
SUMMARY .....	53

KASUTATUD KIRJANDUS .....	55
LISAD .....	60
LISA 1. pRS315-RPL19A, pRS316-RPL19A ja pRS316-RPL19B plasmiidide skeemid....	60
LISA 2. <i>Δrpl19AΔrpl19B</i> kaksikmutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil .....	61
LISA 3. <i>rpl19A-183</i> , <i>rpl19A-154</i> ja <i>rpl19A-146</i> mutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil YPD söötmel.....	62
LISA 4. Üldiste translatsiooni ja transkriptsiooni tasemete määramise andmed .....	63
LISA 5. Ribosoomi translatsioonitäpsuse määramise katse valim.....	64
LIHTLITSENTS .....	65

## KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – 5-fluoro-orothape

ADH – alkohol dehüdrogenaas

CYC – tsütokroom C

DPM – lagundamise arv minutis (ingl. *disintegration per minute*)

eB – eukarüoodi spetsiifiline sild (ingl. *eukaryote-specific bridge*)

ES – lisasegment (ingl. *expansion segment*)

h – rRNA heeliks

nt – nukleotiid

PRF – programmeeritud ribosomaalne raaminihe (ingl. *programmed ribosomal frameshift*)

*RPL* – 60S subühiku valku kodeeriv geen (ingl. *ribosome particle large*)

rpL – 60S subühiku valk

rpS – 40S subühiku valk

r-valk – ribosomaalne valk

Sc – sünteetiline täissööde (ingl. *synthetic complete media*)

Sm – sünteetiline miinimumsööde (ingl. *synthetic minimal media*)

YPD – glükoosi sisaldav rikas sööde

YPGal – galaktoosi sisaldav rikas sööde

wt – metsiktüüp (ingl. *wild type*)

# SISSEJUHATUS

Ribosoom on molekulaarne kompleks, mis koosneb rRNA molekulidest ja ribosoomi valkudest (r-valgud) ning vastutab valgu sünteesi eest. Tema koostisesse kuulub kaks alaüksust: väike (40S) subühik ja suur (60S) subühik. Hiljuti avaldati pagaripärmi *S. cerevisiae* 80S ribosoomi kristallstruktuur lahutuvusega 3.0 Å (Ben-Shem jt., 2011). See ribosoomi mudel kirjeldab nii ribosoomi konserveerunud põhistruktuuri kui ka eukarüoodi ribosoomile iseloomulikud elemendid ning nende interaktsioonid konserveerunud osadega.

Oluliseks faktoriks, millest sõltub 80S ribosoomi funktsionaalsus, on 40S ja 60S ribosoomi subühikute rotatsioon, mis tagab tRNA translokatsiooni ning korrektse translatsiooni toimumise. Seda võimaldavad subühikute vahelised sillad. Pagaripärmi ribosoomi subühikute vahel on 17 silda. Neist 12 on konserveerunud ning sisaldavad kolme tüüpi interaktsioone: rRNA-rRNA, valk-rRNA ja valk-valk. Nad paiknevad enamasti ribosoomi funktsionaalsete tsentrite lähedal ning koordineerivad nende tööd. Eukarüoodi spetsiifilisi sildasid on 5. Need on valk-rRNA või valk-valk tüüpi kontaktid, mille moodustavad eukarüoodi spetsiifilised rRNA järjestused e. lisasegendid ning r-valkude eukarüoodi spetsiifilised domeenid. Pagaripärmi 80S ribosoom on 40% suurem bakteri 70S ribosoomist. Eukarüoodi spetsiifiliste sildade põhifunktsiooniks on suurenenud ribosoomi struktuuri stabiliseerimine.

Käesoleva töö põhieesmärgiks on uurida eukarüoodi spetsiifilise eB12 silla olulisust ribosoomide funktsionaalsuse seisukohast. Selle silla põhikomponendiks on 60S subühiku valk rpL19, mis on kodeeritud paraloogiliste *RPL19A* ja *RPL19B* geenide poolt. Töö esimeses osas analüüsiti  $\Delta rpl19A$ ,  $\Delta rpl19B$  või  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  mutatsioonide sisaldavate rakkude fenotüüpe. Teises osas uuriti, kuidas mõjutavad erinevad eB12 silla mutatsioonid ribosoomide funktsionaalsust.

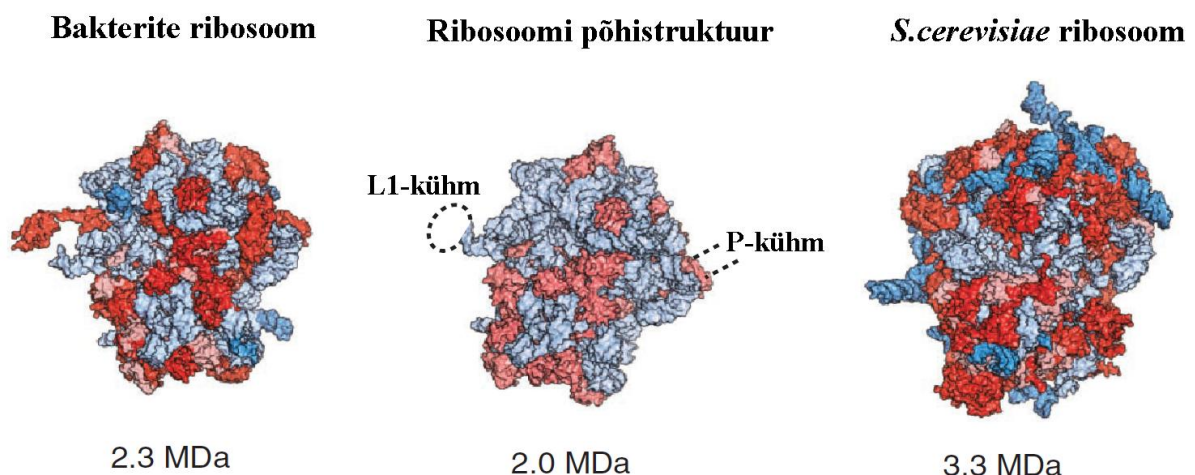
Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*; ribosoom; subühikute vahelised sillad; eukarüoodi spetsiifiline sild eB12; rpL19.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Eukarüootide ribosoom *S. cerevisiae* näitel

Ribosoom on raku suurim ja keerulisem molekulaarne kompleks, mis koosneb rRNA molekulidest ja neid stabiliseerivatest valkudest ning vastutab valgu sünteesi eest. *S. cerevisiae* ribosoomi molekulmass on ~3,3 MDa ning sedimentatsioonikoefitsient on ~80S (De Ley, 1964; Melnikov jt., 2012). Kokku kuulub *S. cerevisiae* 80S ribosoomi koostisesse 79 ribosomaalset valku (r-valku) ja 4 rRNA molekuli: 5S, 5,8S, 18S ja 25S. Ribosoomi põhistruktuuris on 34 valgu ja 3 rRNA molekuli, mis moodustavad ribosoomi keskel kõrgelt konserveerunud funktsionaalsed tsentrid: dekodeerimistsenter, peptidüültransferaasne tsenter ning tRNA-d siduvad A, P ja E saidid (Smith jt., 2008)

*S. cerevisiae* 80S ribosoom on 40% suurem võrreldes prokarüootse 70S ribosoomiga. Viimane on molekulmassiga ~2,3 MDa ning sisaldab 54 r-valku ja 3 rRNA molekuli: 5S, 25S ja 16S (joonis 1) (Ben-Shem jt., 2011, Melnikov jt., 2012). Suuruste erinevus on põhjustatud sellega, et pärimi ribosoomis lisanduvad uued struktuursed elemendid, mis puuduvad bakteriaalses analoogis: 5,8S rRNA molekul 60S subühikus, eukarüoodi spetsiifilised r-valgud ja rRNA lisasegmenid (ES – ingl. *expansion segment*).



**Joonis 1. Bakteriaalse ja *S. cerevisiae* ribosoomide võrdlus.** Näidatud on bakterite ribosoom, *S. cerevisiae* ribosoom, ribosoomide ühine põhistruktuur, ribosoomide molekulmassid ning L1 ja P kühmud. Helesiniselt on toodud konserveerunud valgud, helepunaselt – konserveerunud rRNA järjestused, tumesiniselt – bakterite ja pärimi spetsiifilised valgud, tumepunaselt – bakterite ja pärimi spetsiifilised rRNA järjestused. Muudetud Melnikov jt., 2012 järgi.

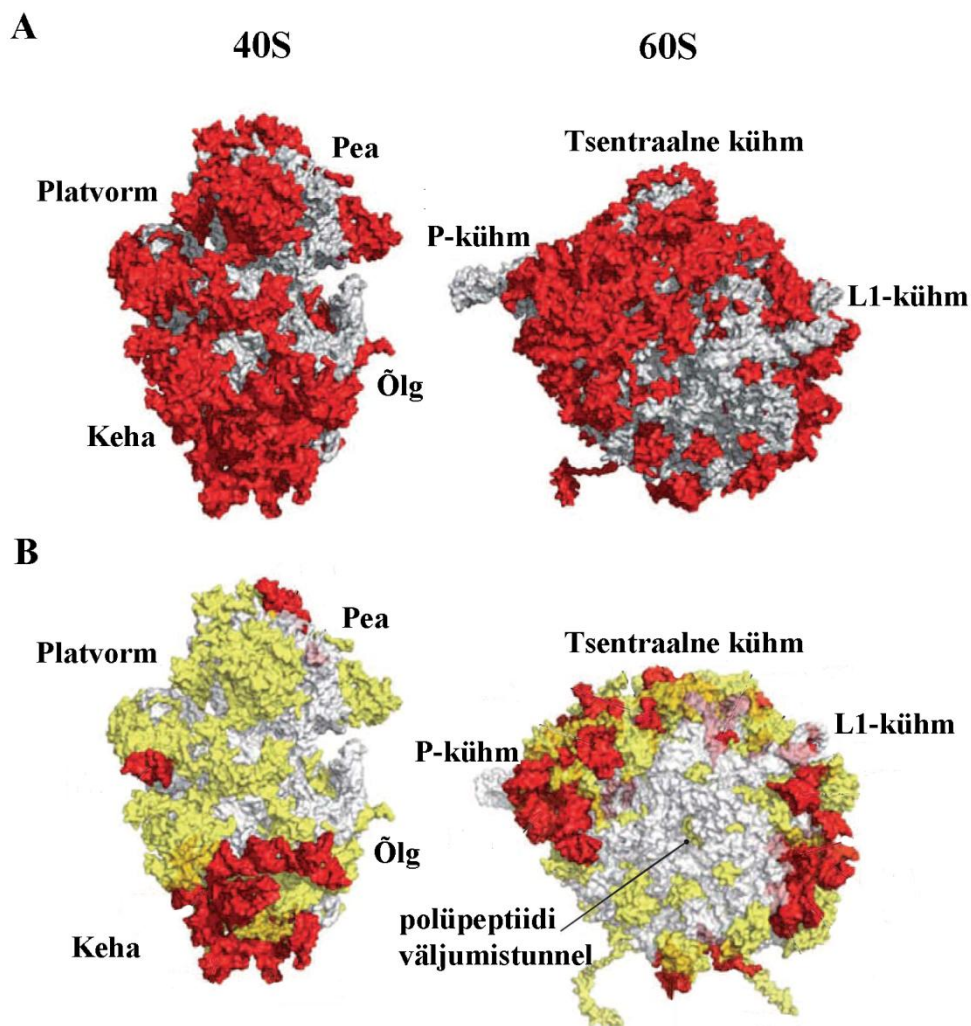
Need elemendid stabiliseerivad ribosoomi suurenenud struktuuri, on olulised translatsioonifaktorite ja šaperonide seostumisel ning mängivad rolli subühikute vaheliste kontaktide moodustamisel (Anger jt., 2013; Dresios jt., 2006; Spahn jt., 2001).

### 1.1.1 Ribosoomi 40S ja 60S subühikud

*S. cerevisiae* 80S ribosoom koosneb kahest alaüksusest: väike subühik (40S) ja suur subühik (60S). 40S subühiku koostisesse kuulub 1800 nt pikk 18S rRNA molekul ning 33 r-valku. Selle bakteriaalne analoog on 30S subühik, mis sisaldab 1542 nt pikka 16S rRNA molekuli ning 21 r-valku (Melnikov jt., 2012). r-valgud moodustavad 53-54% 40S subühiku koostisest, samas kui 30S subühikus neid on 34-40% (Frank jt., 2001). 40S subühiku arhitektuuris eristatakse järgnevad osad: pea (ingl. *head*), keha (ingl. *body*), platvorm (ingl. *platform*), kael (ingl. *neck*) ja õlg (ingl. *shoulder*) (joonis 2). Pea ja õla vahel paikneb mRNA sisenemistunnel, läbi mille mRNA liigub translatsiooni käigus. mRNA väljumistunnel paikneb pea ja platvormi osade vahel (Jenner jt., 2010; Yusupova jt., 2001). Põhiliseks subühiku funktsionaalseks üksuseks on dekodeerimistsenter, kus toimub aa-tRNA selekteerimine sõltuvalt mRNA järjestusest läbi koodon-antikoodon äratundmise (Demeshkina jt., 2012).

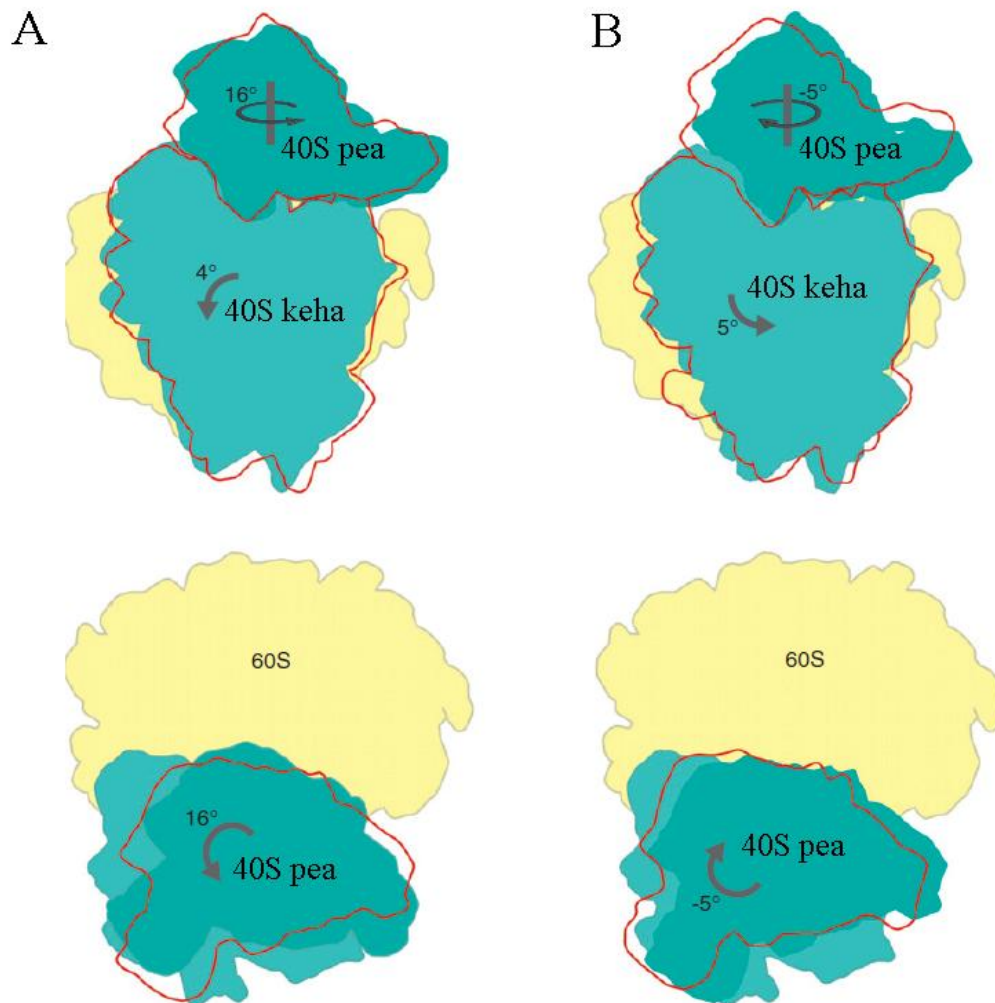
Pagaripärmi 60S subühiku koostisesse kuulub 3 rRNA molekuli (5,8S, 25S ja 5S) summaarse pikkusega 3675 nt ning 46 r-valku. Selle bakteriaalne analoog on 50S subühik, mis sisaldab 23S ja 5S rRNA molekule ning 33 r-valku (Melnikov jt., 2012). r-valgud moodustavad 46-49% 60S subühiku koostisest, 50S subühikus neid on 30-36% (Frank jt., 2001). 60S subühiku arhitektuuris eristatakse kolme kühmu: tsentraalne kühm (ingl. *central protuberance*), L1-kühm (ingl. *L-stalk*) ja P-kühm (ingl. *P-stalk*) (joonis 2). Ribosoomi suur subühik sisaldab peptidüültransferasset tsentrit ning tRNA siduvaid A, P ja E saite. Seega vastutab ta polüpeptiidsideme sünteesi eest (Simonovité ja Steitz, 2009). A-saidis toimub saabuva aa-tRNA seostumine ja selekteerimine. Peale seda liigib ta P-saiti, kus toimub kasvava peptiidahela seondumine tRNA küljes oleva aminohappega. Deatsetüleeritud tRNA liigub E-saiti ning lahkub ribosoomist. Sellist tRNA liikumist läbi ribosoomi nimetatakse translokatsiooniks (Nierhaus, 1990; Watson, 1963).

Ribosoomi kristallstruktuuride ja krüoelektronmikroskoopia meetodit kasutades saadud struktuuride analüüsil selgus, et translatsiooni käigus toimub 40S ja 60S subühikute



**Joonis 2.** *S. cerevisiae* 40S ja 60S subühikute struktuur vaatega tsütoplasma poolt (A) ja ribosoomi keskelt (B). Näidatud on subühikute konserveerunud elemendid (hallilt), eukarüoodi spetsiifilised valgud (kollaselt) ja rRNA lisasegmendid (punaselt). Muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

omavaheline rotatsioon (Ben-Shem jt., 2011; Dunkle jt., 2011; Ratje jt., 2010). Samuti on näidatud, et rotatsiooni takistamisel translokatsioon ei toimu, mis viitab rotatsiooni olulisusele ribosoomi funktsionaalsuse seisukohast (Horan ja Noller, 2007). *S. cerevisiae* parim ribosoomi kristallstruktuuri kirjeldus on tehtud lahutuvusega 3 Å (Ben-Shem jt., 2011). Selle struktuuri järgi on ribosoomil kaks konformatsiooni, mis vastavad erinevatele translokatsiooni staadiumitele: nn ribosoom A ja ribosoom B. Ribosoomis A on 40S subühiku keha pöörang 60S subühiku suhtes  $\sim 4^\circ$  ning 40S pea pöörang subühikute omavahelise telje suhtes  $\sim 16^\circ$  (joonis 3A), mis vastab translokatsiooni eelsele konformatsioonile. Ribosoomis B on 40S subühiku keha pöörang 60S subühiku suhtes  $\sim 9^\circ$  ning 40S pea pöörang subühikute



**Joonis 3. *S. cerevisiae* ribosoomi konformatsiooni muutus mitteroteeritud ribosoomist ribosoomiks A (A) ning ribosoomist A ribosoomiks B (B).** Näidatud on 40S pea (tumeroheliselt), keha (siniselt) ja 60S (kollaselt) omavahelised positsioonid ja rotatsiooninurgad. Punase joonega on näidatud subühikute positsioonid pärast rotatsiooni. Üleval on toodud vaade tsütoplasma poolt, allpool on toodud 80S pealtvaade. Muudetud Jenner jt., 2012 järgi.

omavahelise telje suhtes  $\sim 11^\circ$  (joonis 3B). See vastab ribosoomi postranslokatsioonilisele konformatsioonile (Ben-Shem jt., 2011; Jenner jt., 2012). Ribosoomi kristallstruktuur lahutuvusega 3 Å võimaldas selgitada eukarüoodi spetsiifiliste elementide struktuuri. Näiteks, tehti kindlaks 5 eukarüoodi spetsiifilist ribosoomi subühikute vahelist silda (Ben-Shem jt., 2011).

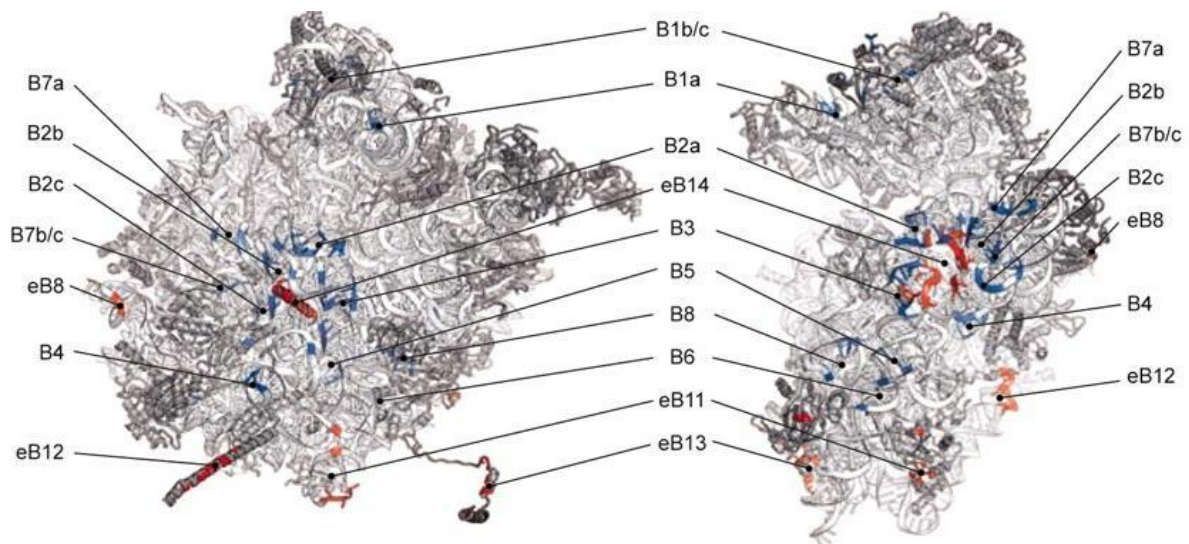
## 1.2 Subühikute vahelised sillad

40S ja 60S subühikute vahelised füüsilised ja informatsioonilised kontaktid on üheks faktoriks, millest sõltub ribosoomi funktsionaalsus. Neid tagavad spetsiifilised rRNA-rRNA, valk-rRNA või valk-valk interaktsioonid ehk sillad (joonis 4), mis on oma dünaamikalt kas passiivsed või aktiivsed (Gao jt., 2003). Passiivsed sillad on staatilised rRNA-rRNA sillad, mis paiknevad ribosoomi keskosas pöörlemistelje ja funktsionaalsete saitide lähedal. Tänu oma stabiilsusele tagavad nad subühikute koospüsümise ja rotatsiooni ning toetavad ribosoomi õiget struktuuri (Gao jt., 2003; Yusupov jt., 2001). Aktiivsed sillad on valk-rRNA ja valk-valk tüüpi sillad, mis tavaliselt paiknevad perifeersetes regioonides funktsionaalsetest tsentritest eemal. Need sillad muudavad oma konformatsiooni subühikute omavahelise liikumise ajal reguleerides sellega subühikute rotatsiooni määra ja informatsiooni voolu translatsiooni käigus (Gao jt., 2003; Yusupov jt., 2001). Selleks, et analüüsida sildade dünaamikat, kasutatakse ribosoomi pre- (nn ribosoom A) ja posttranslokatsiooniliste (nn ribosoom B) konformatsioonide võrdlust (ülevaadetud alapeatükis 1.1.1) (Ben-Shem jt., 2011; Ratje jt., 2010).

### 1.2.1 Konserveerunud sillad

Prokarüootsete ja eukarüootsete ribosoomide võrdlus näitab, et suur osa subühikute vahelistest sildadest on tugevasti konserveerunud (joonis 4). Kokku on leitud 12 konserveerunud silda. Ainuke valk-valk tüüpi konserveerunud sild on B1b/c, mis koosneb valkudest rpS18, rpS15 ja rpL11. Ta seob omavahel 40S pea ja 60S tsentraalse kühmu ning paikneb ülalpool P-saiti. See võimaldab tal reguleerida translokatsiooni täpsust (Ben-Shem jt., 2011; Schuwirth jt., 2005). Teised konserveerunud sillad on moodustatud 18S rRNA tsentraalse ja 3'-minoorse domeenide heeliksi ning 25S rRNA domeenide II ja IV vahel (joonis 5) (Schuwirth jt., 2005; Yusupov jt., 2001).

Ainult rRNA-rRNA interaktsioone sisaldavaid sildu on kokku 5: B2a, B2b, B2c, B3 ja B7a (joonis 4) (Ben-Shem jt., 2011; Yusupov jt., 2001). Need on valdavalt interaktsioonid RNA väikeste vagude vahel, kus adeniin moodustab vesiniksidemeid teiste aluspaaridega. Sild B2a moodustub 18S 3'-minoorse domeeni (h44) ja 25S IV domeeni (h69) vahel. Ta on seotud ribosoomi funktsionaalse keskusega kontakteerudes otseselt mRNA dekodeerimissaidiga. Sild



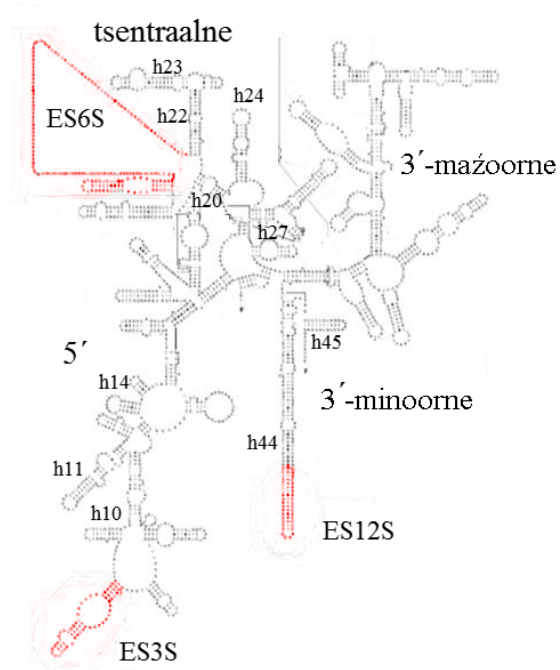
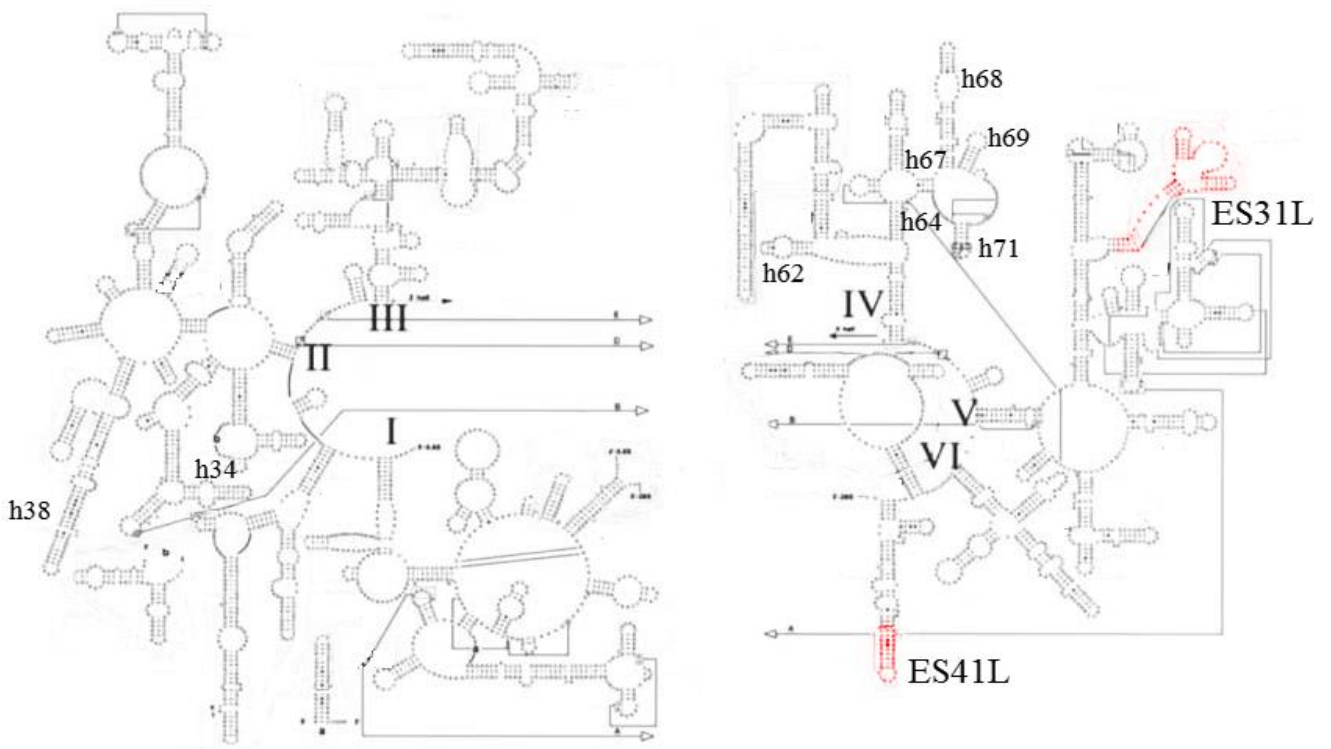
**Joonis 4. Eukarüootse ribosoomi subühikute vahelised sillad *S. cerevisiae* ribosoomi näitel.** Siniselt on näidatud konserveerunud sillad (prokarüootide ja eukarüootide ribosoomis); punaselt on näidatud eukarüootsele ribosoomile spetsiifilised sillad. Muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

B3 paikneb subühikute pöörlemispunktis sidudes 18S 3' minoorse domeeni (h44) 25S domeeniga IV (h71) (Schuwirth jt., 2005). Need kaks silda on kõige stabiilsemad subühikute vahelised kontaktid ning on praktiliselt muutumatud ribosoomides A ja B (Ben-Shem jt., 2011).

Sillad B2b ja B2c asuvad perifeersemas alas ning seovad 18S tsentraalse domeeni (h24, h27, h45) 25S domeeniga IV (h67, h69, h71) (Schuwirth jt., 2005; Yusupov jt., 2001). Samas regioonis moodustab interaktsioon 18S rRNA h23 ja 25S rRNA h68 vahel silda B7a (joonis 5) (Schuwirth jt., 2005).

Sillad B1a, B7b/c ja B8 on valk-rRNA tüüpi. Ribosoomis A moodustub B1a sild valgu rpS15 ja 25S domeeni II (h38) vahel. Ta on seotud P-saidiga ning kaob translokatsiooni käigus. Sild B7b/c tekib valkude rpL2 ja rpL43 kontakteerumisel 18S tsentraalse domeeniga (h22, h23, h24). Kolmas sild, sildB8, on valgu rpL23 interaktsioon 18S 5'-domeeniga (h14) (joonis 5) (Ben-Shem jt., 2011; Yusupov jt., 2001).

Ülejäänud konserveerunud sillad on segatüüpi. B5 ja B6 sisaldavad nii rRNA-rRNA kui ka valk-rRNA interaktsioone. Nende moodustamisel osalevad 18S 3'-minoorne domeen (h44) ja 25S domeen IV (h64 ja h62) ning vastavad suure subühiku valgud rpL23 või rpL24. Ribosoomis A sisaldab sild B4 kõiki kolme tüüpi interaktsioone, kus osalevad h34 25S rRNA domeenist II, h11 ja h20 18S rRNA tsentraalsest ja 5'-domeenidest ning valgud rpS13 ja

**A****B**

**Joonis 5. *S. cerevisiae* rRNA sekundaarne struktuur.** Näidatud on 18S rRNA (**A**) ning 5,8S/25S rRNA struktuurid (**B**). Punaselt on näidatud rRNA lisasegmendid. Rooma numbritega on näidatud 25S rRNA domeenid, h tähistab heeliksit. Näidatud on ainult sildade moodustamisel kaasatud heeliksit. Muudetud Spahn jt., 2001 järgi.

rpL30 (joonis 5). Ribosoomis B valk-valk kontakt kaob (Ben-Shem jt., 2011; Yusupov jt., 2001).

### 1.2.2 Eukarüoodi spetsiifilised sillad

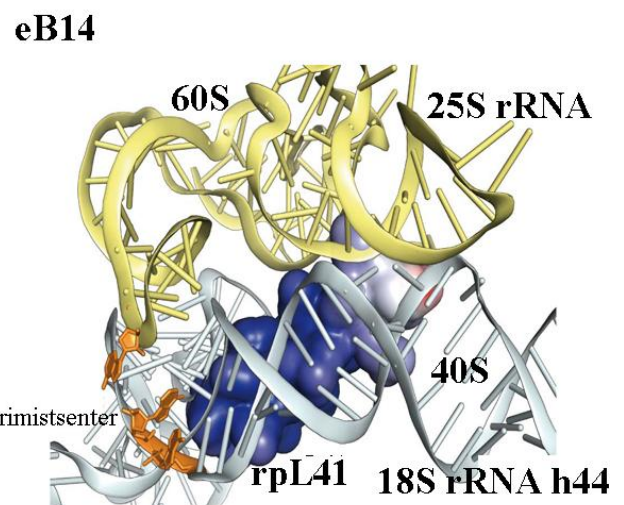
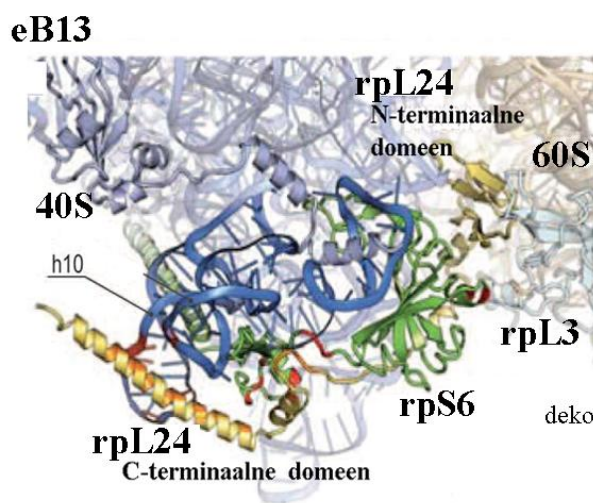
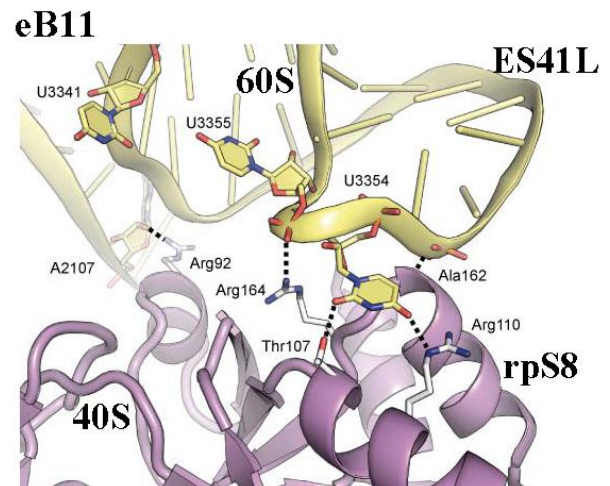
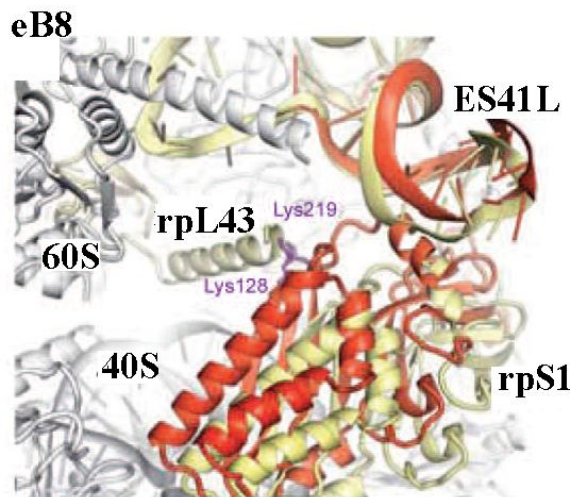
Eukarüootses ribosoomis praktiliselt kahekordistub subühikute vaheliste interaktsioonide pindala ning lisanduvad eukarüoodi spetsiifilised sillad (joonis 4). Need on valk-rRNA või valk-valk tüüpi kontaktid, mis paiknevad põhiliselt funktsionaalsetest tsentritest eemal (Ben-Shem jt., 2011). Nende formeerumisel mängivad olulist rolli rRNA lisasegmenid, mis puuduvad prokarüootse ribosoomi rRNAs (joonis 5). Kokku on kirjeldatud 5 eukarüoodi spetsiifilist silda: eB8, eB11, eB12, eB13, eB14.

Sild eB8 seob ribosoomis A 18S tsentraalse domeeni (h26) 25S domeeniga V. Selle kontakti moodustavad 40S subühiku valk rpS1 ja 25S rRNA lisasegment ES31L. Ribosoomis B lisandub kontakt valkude rpL43 ja rpS1 vahel. Lisaks interakteerub valk rpS1 ka mRNA väljumistunneli elementidega: valkudega rpS11 ja rpS26 ning 18S rRNA'ga (h26) (joonised 5 ja 6) (Ben-Shem jt., 2011).

Sild eB11 on suhteliselt stabiilne ribosoomides A ja B. Ta seob omavahel 18S rRNA tsentraalse domeeni 25S rRNA domeeniga VI. Selles kontaktis osalevad 40S subühiku valk rpS8 ja 25S rRNA lisasegment ES41L. Valk rpS8 on seotud 18S rRNA lisasegmentiga ES3S ning paikneb mRNA väljumistunnelist allpool subühikute vaheliste kontaktide ääres (joonised 5 ja 6) (Ben-Shem jt., 2011).

Sild eB14 on ainuke eukarüoodispetsiifiline sild, mis paikneb ribosoomi subühikute vahelises tsentraalses alas dekodeerimistsentri läheduses ning jääb samuti praktiliselt muutumatuks ribosoomides A ja B. Tema struktuuris on kaasatud positiivselt laetud 60S valk rpL41 ja 18S rRNA h27, h45 ja h44 (joonised 5 ja 6) (Ben-Shem jt., 2011).

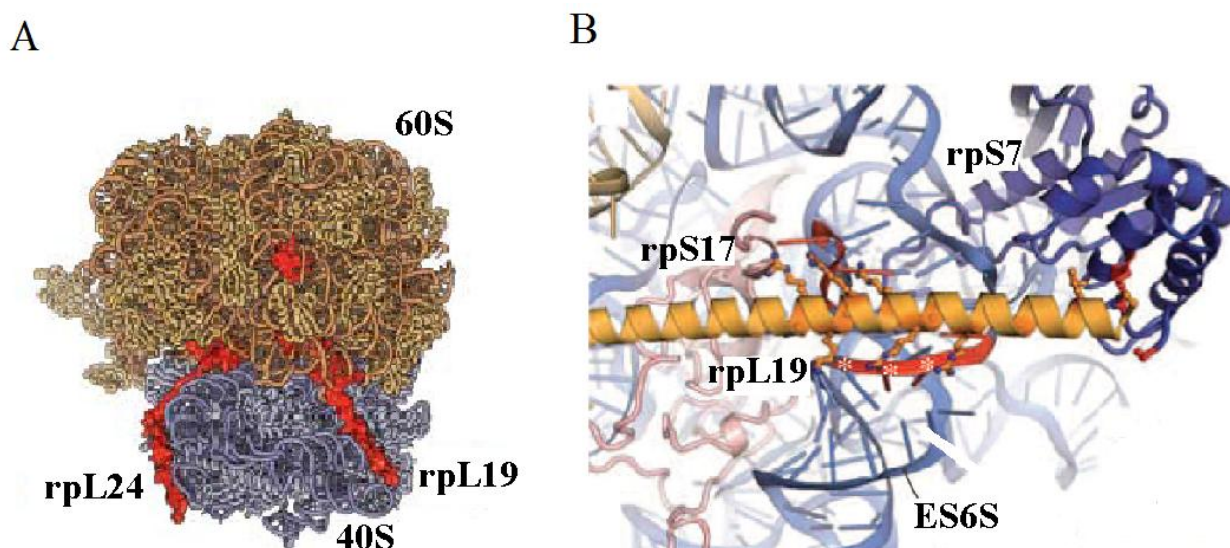
Sillad eB12 ja eB13 on sarnase struktuuriga. Nad paiknevad ribosoomi tsütoplasma poolses küljes ning nende moodustamisel mängivad rolli valkude C-terminaalsed  $\alpha$ -heeliksid (joonis 7A). Nii A kui ka B ribosoomis moodustab silla eB13 põhistruktuuri 60S subühiku valguga rpL24  $\alpha$ -heeliksi interaktsioon 40S subühiku valguga rpS6. Seda aitab stabiliseerida valk rpL3. Ribosoomis B lisanduvad ka interaktsioonid rpL24 ja 18S rRNA h10 vahel (Ben-Shem jt., 2011). Silla eB13 paigutus ES6S läheduses võimaldab oletada, et ta mängib rolli translatsiooni initsiatsioonis ja re-initsiatsioonis (Thiebeauld jt., 2009)



**Joonis 6. Eukariöodi spetsiifiliste sildade eB8, eB11, eB13 ja eB14 struktuur. eB8.** Näidatud on silla konformatsioon ribosoomis A (kollaselt) ja ribosoomis B (punaselt); valgud rpL43 ja rpS1 ning 25S rRNA lisasegment ES41L. **eB11.** Silla konformatsioon ribosoomis A. Näidatud on valk rpS8 (lillalt) ja 25S rRNA lisasegment ES41L (kollaselt). **eB13.** Näidatud on 18S rRNA h10 (siniselt), valk rpL24 (kollaselt), valk rpS6 (rohelistelt), valk rpL3e (helesiniselt) ning molekulidevaheliste interaktsioonide kohad (punaselt). **eB14.** Näidatud on 25S rRNA (kollaselt), 18S rRNA h44 (helesiniselt), valk rpL41 (tumesiniselt), dekodeerimistsenter (oranž). Muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

### 1.3 Eukarüoodi spetsiifiline sild eB12

Sild eB12 moodustub 60S valgu rpL19 C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi vahendusel (joonis 7A) (Melnikov jt., 2012). Tema põhistruktuuri määrab rpL19 (aminohapped: Arg162, Arg163, Lys165, Asn166, Arg167, Arg170, Arg172, Arg173, Arg176, Lys189) interaktsioon 18S rRNA lisasegmendiga ES6S (nukleotiidid 814, 815, 850, 851, 852, 853, 854, 855) (joonis 7B). Ribosoomis A moodustab valk rpL19 (Asn156, Glu160, Arg167) lisakontakti 40S subühiku valguga rpS17 (Phe154, Phe156). Ribosoomis B see kontakt kaob ning selle asemel tekib interaktsioon 40S valguga rpS7 (rpL19 aminohapped: Leu185, Ala189; rpS7 aminohapped: Arg39, Ser2) (joonis 7B) (Ben-Shem jt., 2011). Lisasegment ES6S omab erilist tähtsust ribosoomi struktuuris. Ta on seotud 40S subühiku lisasegmentidega ES3S ja ES12S ning seega mõjutab kaudselt sildasid eB11 ja eB13. ES6S paikneb mRNA väljumistunnelist allpool ja translatsiooni initsiatsioonifaktori eIF4G sidumissaidi läheduses ning võib-olla seotud translatsiooni initsiatsiooniga (Marintchev jt., 2009).

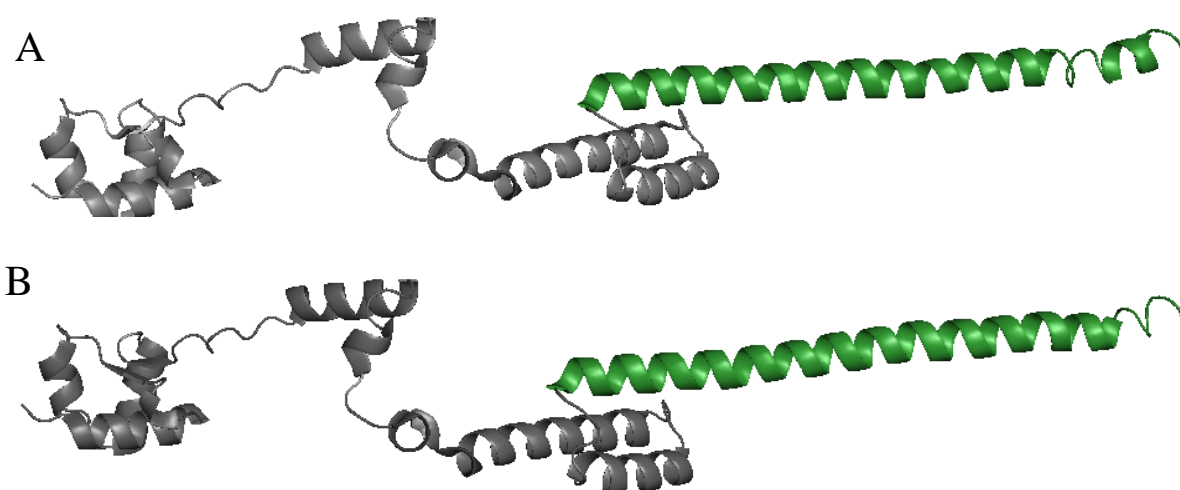


**Joonis 7. Eukarüoodi spetsiifilised sillad eB12 ja eB13.** A. eB12 ja eB13 sildade paiknemine ribosoomi struktuuris. Näidatud on 60S subühik (kollaselt), 40S subühik (siniselt), valkude rpL19 ja rpL24 C-terminaalsed  $\alpha$ -heeliksid (punaselt). Muudetud Melnikov jt., 2012 järgi. B. eB12 silla struktuur. Näidatud on valgu rpL19 C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (kollaselt), 18S rRNA lisasegment ES6S (siniselt), valk rpS17 (roosalt), valk rpS7 (tumesiniselt). Muudetud Ben-Shem jt., 2011 järgi.

### 1.3.1 *S.cerevisiae* valk rpL19 ja seda kodeerivad geenid

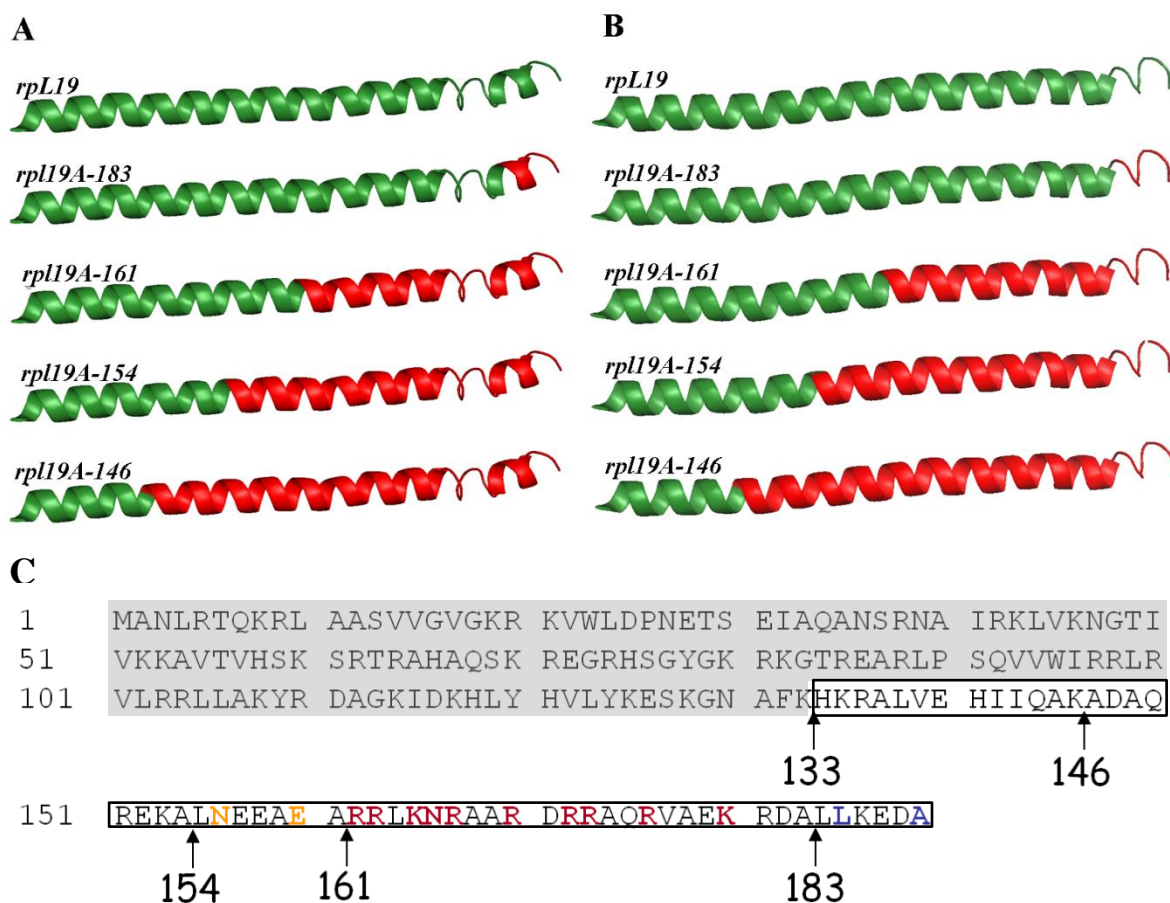
Ribosoomi suure subühiku valku rpL19 kodeerivad paraloogilised geenid *RPL19A* (süsteemaatiline nimetus *YBR084C-A*) ja *RPL19B* (süsteemaatiline nimetus *YBL027W*), millede pikkused on vastavalt 1076 ja 954 nukleotiidi. Mõlemas geenis paikneb ORF'i alguses intron: *RPL19A* geenis on ta 506 ning *RPL19B* geenis 384 nukleotiidi pikk (Cherry jt., 1997; Song jt., 1996). *RPL19* geenide eksonid erinevad üksteisest 34 nukleotiidi poolest, kuid nende poolt kodeeritud valkude aminohappelised järjestused on identsed (Song jt., 1996). *RPL19A* geeni deletsioon ei mõjuta oluliselt rakkude kasvu temperatuuril 30°C rikkal söötmel (Andrijako, 2013; Delaney jt., 2011; Steffen jt., 2012). *RPL19B* geeni deletsiooni tagajärjel pikeneb samades tingimustes generatsiooniaeg 1,4-1,5 korda võrreldes metsiktüübiga (Andrijako, 2013; Steffen jt., 2012). Mõlema geeni deletsioon pärmigenoomist põhjustab sünteetilise letaalsuse teket, mille puhul pärmirakud ei ole elujõulised (Giaver jt., 2002). Nendel rakkudel taastub metsiktüüpi kasvufenotüüp rikkal söötmel 30°C juures, kui sünteetilist letaalsust komplementeerida *RPL19A* või *RPL19B* geene ekspresseerivate plasmiididega (Andrijako, 2013).

*S. cerevisiae* valk rpL19 koosneb 189 aminohappe jäägist ning on molekulmassiga 21,7 kDa (Song jt., 1996) (joonis 8). Pagaripärmi rpL19 järjestus on 57,5% ulatuses homoloogiline rpL19 valguga imetajates ning 35,8% ulatuses homoloogiline L19 valguga Arhedes (*H. marismortui*) (Chan jt., 1987; Song jt., 1996). Bakteri ribosoomis ei ole rpL19 valgu homoloogi (Lecompte jt., 2002).



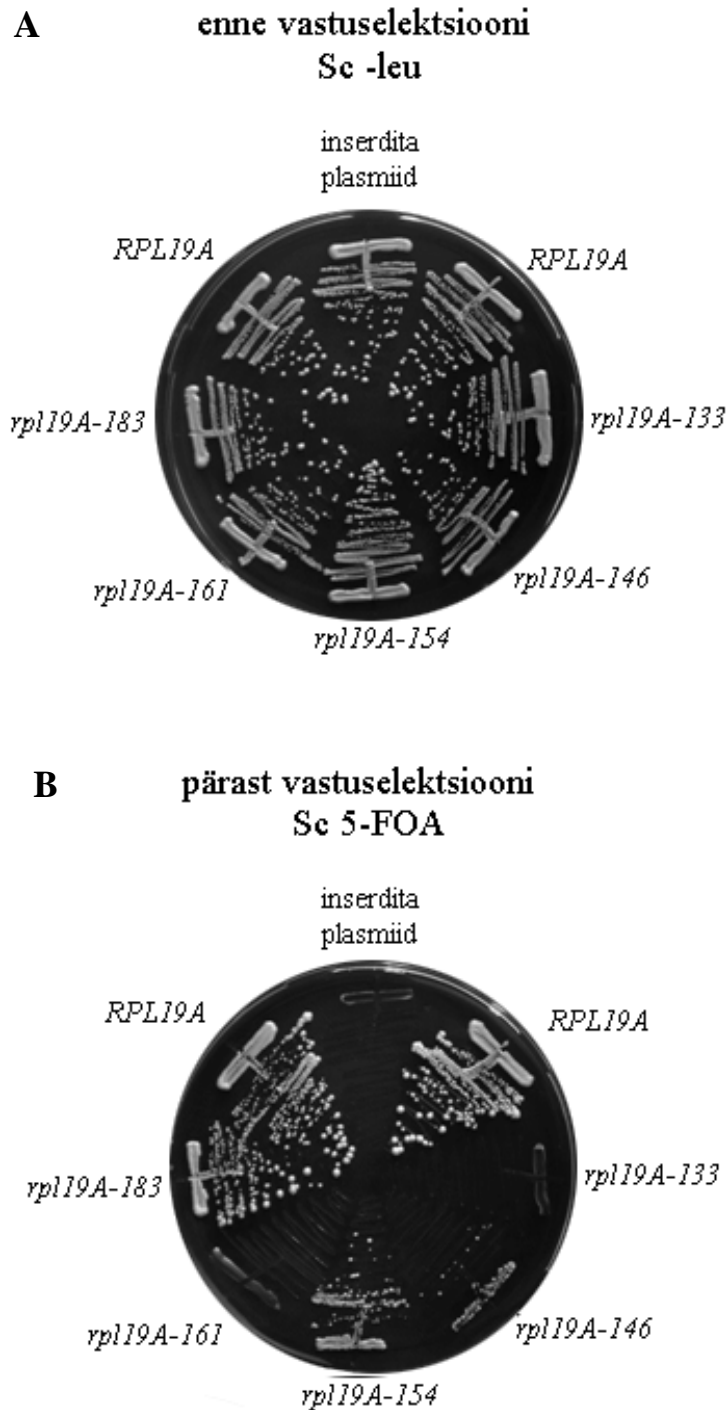
**Joonis 8. rpL19 valgu struktuur ribosoomis A (A) ja ribosoomis B (B).** Näidatud on N-terminaalne domeen (hallilt) ja C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (roheliselt). Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Ben-Shem jt., 2011 avaldatud struktuuri järgi.

rpL19 C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks on *S. cerevisiae* ribosoomi eB12 silla põhikomponendiks ning moodustab interaktsioone 18S RNA lisasegmentidega ES6S ning 40S subühiku valkudega rpS7 ja rpS17 (vt. alapeatükk 1.3). rpL19 valgu C-terminaalset  $\alpha$ -heeliksi olulisuse analüüsiks konstrueeriti molekulaarbioloogia laboris selle valgu deletsioonimutandid (Andrijako, 2013; T. Tamm, avaldamata andmed; joonis 9). Mutandil *rpl19A-183* puudub C-terminaalsest osast 6 ah. jääki, mis interakteeruvad valguga rpS7. Mutandil *rpl19A-161* puudub 28 ah. jääki, mis moodustavad interaktsioone lisasegmentiga ES6S ja valguga rpS7. Mutandil *rpl19A-154* puudub 35 ah. jääki, mis interakteerivad valkudega rpS7, rpS17 ja lisasegmentiga ES6S. Mutandil *rpl19A-146* on deleteeritud 43 ah. jääki, mis mimikeerib Arhede ribosoomis olevat L19 valgu C-terminaalset osa. Mutandil *rpl19A-133* on deleteeritud kogu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks.



**Joonis 9. rpL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks metsiktüüpi rakkudes ja mutantidel.** Paneelidel **A** ja **B** on toodud heeliksi struktuurid ribosoomides A ja B. Näidatud on C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (roheliselt) ja deleteeritud heeliksi osa (punaselt). Joonis on tehtud PyMOL tarkvaraga Ben-Shem jt., 2011 avaldatud struktuuri järgi. Paneelil **C** on toodud rpL19 valgu järjestus. Näidatud on rpL19 N-terminaalne domeen (hallilt) ning C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (raamis); aminohapped, mis moodustavad interaktsioone valguga rpS17 (kollaselt), valguga rpS7 (siniselt) ning 18S rRNA lisasegmentiga ES6S (punaselt). Nooltega on näidatud deletsioonide paigutused ning vastavate mutantsete valkude pikkused (ah). Muudetud T. Tamm järgi.

Nende mutantide võimet komplementeerida  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust analüüsiti kasutades plasmiidivahetamise katset (Andrijako, 2013; T. Tamm, avaldamata andmed). Pärmitüvesse  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$ , kus sünteetiline letaalsus oli komplementeeritud *URA3* markergeeni ja metsiktüüpi *RPL19A* sisaldava plasmiidi poolt, transformeeriti eelpool kirjeldatud deletsioonimutante ekspresseerivad *LEU2* markergeeniga plasmiidid (joonis 10). Lisaks kasutati selles katses kontrollina metsiktüüpi *RPL19A* ekspresseerivat plasmiidi ja ilma inserdita plasmiidi. Metsiktüüpi *RPL19A* ekspresseeriva *URA3* markergeeniga plasmiidi vastuselektioon 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) sisaldaval söötmel 30°C juures näitas, et mutatsioonid *rpl19A-161* ja *rpl19A-133* on *S. cerevisiae* rakkudele letaalsed (joonis 10). *rpl19A-183* ja *rpl19A-146* mutatsioone sisaldavad pärmirakud on vähenenud elujõulisusega ning *rpl19A-183* mutatsiooniga rakud kasvavad metsiktüüpi *RPL19A* ekspresseerivate rakkudega sarnaselt.



**Joonis 10. Metsiktüüpi *rpL19* valgu ekspresseeriva plasmiiidi vahetamine mutantset valgu ekspresseerivate plasmiiidide vastu.** Rakke kasvatati temperatuuril 30°C . **A.** Enne vastuselektsooni läbiviimist sisaldavad pärmitüved kahte plasmiiidi: *URA3* markergeeniga metsiktüüpi *RPL19A* ekspresseerivat plasmiiidi ning *LEU2* markergeeniga deletsioonimutante (*rpl19A-183*, *rpl19A-161*, *rpl19A-154*, *rpl19A-146*, *rpl19A-133*) ekspresseerivat plasmiiidi. **B.** *URA3* markergeeniga plasmiiidi vastuselektsooniks külvati pärmirakud 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) sisaldvale söötmele. 5-FOA söötmel kaotavad rakud *URA3* markergeeniga plasmiiidi. Rakkudes avaldub *LEU2* markergeeniga plasmiiidilt ekspresseeruva mutantse valgu fenotüüp. Muudetud T. Tamm järgi.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö uurimisobjektiks on *S. cerevisiae* eukarüoodi spetsiifiline subühikute vaheline sild eB12. Selle silla põhikomponent on suure subühiku r-valk rpL19. Valku rpL19 kodeerivad paraloogilised *RPL19A* ja *RPL19B* geenid, mis ei ole eluks hädavajalikud. *RPL19A* geeni deletsioon pärmigenoomist ei mõjuta oluliselt rakkude kasvu. *RPL19B* geeni deleteerimisel pikeneb pärmirakkude generatsiooniaeg. Mõlema geeni deletsioon põhjustab sünteetilise letaalsuse teket. Seda saab komplementeerida plasmiidiga, millelt ekspresseerub kas *RPL19A* või *RPL19B* paraloog. rpL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks on subühikute vahelise eB12 silla põhikomponent ning moodustab interaktsioone valkudega rpS7 ja rpS17 ning 18S rRNA lisasegmendiga ES6S. rpL19  $\alpha$ -heeliksi deletsioonimutatsioonid mõjutavad rakkude kasvu või põhjustavad rakkude surma.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Täpsemalt iseloomustada *Δrpl19A* ja *Δrpl19B* deletsioonimutantide fenotüüpe uurides nende tüvede temperatuuritundlikust erinevatel söötmetel ning analüüsides rakulüsaadi ribosoomide profile.
2. Analüüsida rpL19 valgu puudumise mõju ribosoomide profiilile.
3. Uurida ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 olulisust ribosoomide funktsionaalsusele.

## 2.2 Materjalid ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud tüved ja söötmed

Töös kasutatud *S. cerevisiae* ja *E. coli* tüved on toodud tabelis 1. Kõik *S. cerevisiae* tüved on konstrueeritud S288C tüve baasil (Mortimer ja Johnston, 1986).

**Tabel 1. Töös kasutatud tüved**

<i>S. cerevisiae</i> tüved			
Tüve nr	Nimi	Genotüüp	Päritolu
TYSC104	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	EUROSCARF
TYSC105	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>	EUROSCARF
TYSC138	<i>wt</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 Δarg4::hphMX6 Δlys1::natMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC144	<i>wt</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC203	<i>rpl19AΔ</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC208	<i>rpl19AΔ</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ36 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC227	<i>rpl19BΔ</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6 Δrpl19B::kanMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC231	<i>rpl19BΔ</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ36 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6 Δrpl19B::kanMX6</i>	Labori kollektsoon
TYSC232	<i>rpl19AΔrpl19BΔ +[pRS316- RPL19A]</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS316-RPL19A]</i>	Labori kollektsoon

TYSC235	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS316- RPL19A]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> <i>Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6</i> <i>Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS316- RPL19A]</i>	Labori kollektsoon
TYSC239	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS316- RPL19B]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ36 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS316-RPL19B]</i>	Labori kollektsoon
TYSC242	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS316- RPL19B]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS316-RPL19B]</i>	Labori kollektsoon
TYSC248	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- RPL19A]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-RPL19A]</i>	Labori kollektsoon
TYSC257	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- <i>rpl19A-154</i> ]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A-154]</i>	Labori kollektsoon
TYSC262	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- <i>rpl19A-183</i> ]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A-183]</i>	Labori kollektsoon
TYSC266	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- RPL19A]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> <i>Δlys1::natMX6 Δarg4::hphMX6</i> <i>Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS315- RPL19A]</i>	Labori kollektsoon
TYSC278	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- RPL19A]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-RPL19A]</i>	Labori kollektsoon
TYSC280	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- <i>rpl19A-183</i> ]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A-183]</i>	Labori kollektsoon
TYSC282	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[pRS315- <i>rpl19A-154</i> ]	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A-154]</i>	Labori kollektsoon

TYSC283	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[ <i>pRS315-rpl19A-146</i> ]	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19A-146]</i>	Labori kollektsoon
TYSC288	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[ <i>pRS315-rpl19A-146</i> ]	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-RPL19A-146]</i>	Labori kollektsoon
TYSC291	<i>rpl19AΔrpl19BΔ</i> +[ <i>pRSpGAL-RPL19A</i> ]	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 Δlys1::natMX6</i> <i>Δarg4::hphMX6 Δrpl19A::kanMX6</i> <i>Δrpl19B::kanMX6 [pRSpGAL-RPL19A]</i>	Labori kollektsoon
<b><i>E. coli</i> tüved</b>			
<b>Tüvi</b>	<b>Genotüüp</b>		<b>Päritolu</b>
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δlacx74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>		Invitrogen
AG1	F <sup>-</sup> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1</i>		Agilent Technologies

*S. cerevisiae* kasvatamisel kasutatud söötmed on toodud tabelis 2. Tardsöötmete valmistamiseks lisati vedelsöötmetele 2% agarit.

**Tabel 2. *S. cerevisiae* kasvatamisel kasutatud söötmed**

Sööde	Söötme koostis
YPD	1% <i>Bacto</i> pärmiekstrakt, 2% <i>Bacto</i> pepton, 2% glükoos
YPGal	1% <i>Bacto</i> pärmiekstrakt, 2% <i>Bacto</i> pepton, 2% galaktoos
Sc	0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu
Sc -ura	0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudub uratsiil
Sm	0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,05 mg/ml uratsiil, 0,25 mg/ml leutsiin, 0,1 mg/ml arginiin, 0,1 mg/ml lüsiin, 0,1 mg/ml histidiin, 0,1 mg/ml trüptofaan

*E. coli* rakke kasvatati temperatuuril 37°C LB (*Luria Bertrani*) söötmes (1% trüptoon, 1% NaCl, 0,5% *Bacto* pärmiekstrakt). Tardsöötmete valmistamiseks lisati vedelsöötmetele 1,7% agarit. Ampitsiliini lõppkontsentratsioon oli 100µg/ml.

## 2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid

Töös kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 3 ja lisas 1. Kõik plasmiidid sisaldavad pärimi replikatsiooni alguspunkti (*ARSH4*) ja tsentromeerset elementi (*CEN6*).

**Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid**

Plasmii nimi	Vektor	Insert	Promootor	Terminaator	Pärimi marker	Päritolu
<i>pRS315</i>	<i>pRS315</i>				<i>LEU2</i>	Sikorski ja Hieter, 1989
<i>pRS316</i>	<i>pRS316</i>				<i>URA3</i>	Sikorski ja Hieter, 1989
<i>pRS315 modif</i>	<i>pRS315</i>				<i>LEU2</i>	Valmistatud selles töös
<i>pRS316-RPL19A</i>	<i>pRS316</i>	<i>RPL19A</i> (1-189 ah)	<i>RPL19A</i> promootor	<i>RPL19A</i> terminaator	<i>LEU2</i>	Valmistatud selles töös
<i>pRS316-RPL19B</i>	<i>pRS316</i>	<i>RPL19B</i> (1-189 ah)	<i>RPL19B</i> promootor	<i>RPL19B</i> terminaator	<i>LEU2</i>	Valmistatud selles töös
<i>pRS315-RPL19A</i>	<i>pRS315</i>	<i>RPL19A</i> (1-189 ah)	<i>RPL19A</i> promootor	<i>RPL19A</i> terminaator	<i>URA3</i>	Valmistatud selles töös
<i>pJD375</i>	<i>p416ADH</i>	<i>RLuc – FLuc</i>	<i>ADH1</i>	<i>CYC1</i>	<i>URA3</i>	Harger ja Dinman, 2003
<i>pJD376</i>	<i>p416ADH</i>	<i>RLuc-(-1PRF)-FLuc</i>	<i>ADH1</i>	<i>CYC1</i>	<i>URA3</i>	Harger ja Dinman, 2003
<i>pJD377</i>	<i>p416ADH</i>	<i>RLuc-(+1PRF)-FLuc</i>	<i>ADH1</i>	<i>CYC1</i>	<i>URA3</i>	Harger ja Dinman, 2003
<i>pJD431</i>	<i>p416ADH</i>	<i>RLuc-(UAA)-FLuc</i>	<i>ADH1</i>	<i>CYC1</i>	<i>URA3</i>	Harger ja Dinman, 2003
<i>pJD643</i>	<i>p416ADH</i>	<i>RLuc- FLuc (Arg218Ser)</i>	<i>ADH1</i>	<i>CYC1</i>	<i>URA3</i>	Plant jt, 2011

### 2.2.3 Kloneerimine

Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 4. Töös valmistatud plasmiidide õigsust kontrolliti sekveneerimise teel.

**Tabel 4. Töös kasutatud praimerid.** Restriksioonisaaidid on toodud rasvases kirjas ja alla joonitult.

Nimi	Järjestus	Restriktaas
RPL19A_forw	5' CAGGATCCGCGATGGCCGCACTCACACCACC 3'	<i>BamHI</i>
RPL19A_rev	5' CTCCGCGGCTGGCGCATCTCATGCCGTTACTTC 3'	<i>Cfr421</i>
RPL19B_forw	5' CTGGATCCGATGACTGCTAGCACGTAATGATT 3'	<i>BamHI</i>
RPL19B_rev	5' CACCGCGGTGTCCTAAGCGTACATGTGGCAACC 3'	<i>Cfr421</i>

*pRS316-RPL19A* ja *pRS316-RPL19B* plasmiidide valmistamiseks amplifitseeriti PCR abil *S.cerevisiae* genoomist *RPL19A* ja *RPL19B* geenide järjestused koos promootorjärjestustega, intronitega ja terminaatorjärjestustega kasutades primereid RPL19A\_forw ja RPL19A\_rev või RPL19B\_forw ja RPL19B\_rev. Saadud DNA fragmendid lõigati *BamHI* ja *Cfr421* restriктаasidega ja kloneeriti samade restriктаasidega lineariseeritud *pRS316* vektorisse.

*pRS315* plasmiid lineariseeriti *PstI* restriктаasiga. Saadud molekuli 3' väljaulatuvad otsad eemaldati T4 DNA polümeraasiga ning ligeeriti kokku. Saadud modifitseeritud *pRS315* plasmiidis (*pRS315modif*) puudub *PstI* restriктаasi lõikamissait. *RPL19A* geeni järjestus koos promootorjärjestusega, introniga ja terminaatorjärjestusega lõigati restriктаasidega *BamHI* ja *Cfr421* plasmiidist *pRS316-RPL19A* ja kloneeriti *BamHI* ja *Cfr421* restriктаasidega lineariseeritud *pRS315modif* vektorisse. Saadud plasmiid nimetati *pRS315-RPL19A*.

### 2.2.4 Pärmirakkude temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Temperatuuritundlikkuse määramiseks kasutati tilk-külv meetodit. Üksikud kolooniad kasvatati üleöö 3 ml YPD söötmes 30°C juures. Saadud kultuurid lahjendati ning kasvatati samades tingimustes eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600nm}=0,8-1,0$ ). Kultuuridest tehti 1 ml söötmesse järgmised lahjendused:  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^4$ , 1000 või 200 rakku. Igast lahjendusest külvati 5  $\mu$ l (st. 5000 rakku, 2500 rakku, 500 rakku, 50 rakku ja 10 rakku) YPD,

Sc või Sm tardsöötmetele ning kasvatati 16°C, 20°C, 25°C, 30°C ja 36°C juures 3-6 päeva. Katset korrati kaks korda.

### 2.2.5 Ribosoomide profiilide analüüs

Ribosoomide profiilide analüüsiks kasutati muudetud Foiani jt. poolt (1991) kirjeldatud meetodit. Pärmirakke kasvatati YPD vedelsöötmes 30°C juures lõppmahuga 150 ml eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600nm}=0,8-1,0$ ). 15 min enne rakkude kogumist lisati tsükloheksimiid (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Rakud koguti tsentrifuugimise teel (5 min 2400xg 4°C), pesti külma 5 ml lüüsipuhvriga [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, tsükloheksimiid 100 µg/ml] ja resuspendeeriti 600 µl lüüsipuhvrts. Rakkudele lisati klasskuulid (400 µl, Ø=0,5 mm) ning lüüsiiti *Precellys 24 (Bertin Technologies)* homogenisaatoriga (3 x 1min, paus 1 min, 6000 rpm, 4°C). Lüüsitud rakkude lahustumatu materjal sadestati tsentrifuugimise teel (15 min 16060xg 4°C). Saadud rakulüsaadi supernatandi optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 260 nm. 7%-47% (w/w) sahharoosi gradiendid (lõppmaht 36 ml) valmistati gradiendipuhvrts [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM DTT]. Igale gradiendile kanti 30 ekvivalentühikut ( $OD_{260nm}$ ) rakulüsaati ning ultratsentrifuugiti 4°C juures,  $w^2t=1,38 \times 10^{11}$ , kasutades SW28 rootorit (*Beckman*). Ribosoomide profiilide visualiseerimiseks lainepikkusel 260 nm kasutati peristantilist pumpa P-1, monitori *UVis-920* ja isekirjutajat REC112 (*GE Healthcare*). Katset korrati vähemalt kaks korda.

### 2.2.6 Üldise translatsioonitaseme määramine

Pärmirakke kasvatati modifitseeritud Sm (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,05 mg/ml uratsiil, 0,25 mg/ml leutsiin, 0,1 mg/ml arginiin, 0,1 mg/ml lüsiin) vedelsöötmes 30°C juures kuni  $OD_{600nm}=0,55$ . Kultuurile mahuga 12 ml lisati 60 µl <sup>14</sup>C märgistatud aminohapete segu (*Amersham Radiochemicals & Radiation Safety*; CFB104, märgistatud aminohapped: Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val; lõppkontsentratsioon 0,00925 MBq/ml, 0,25 µCi/ml). Ajapunktid võeti iga 15 min järel 1,5 tunni jooksul. 1 ml kultuurile lisati 200 µl 50% TCA ning inkubeeriti jääl 10-120 min. Proove inkubeeriti 20 min 70°C juures ning filtreeriti Whatman GF/A filtrile. Filtrid pesti 10 ml 5% TCA ja 10 ml 70% etanooliga ning kuivatati 10 min 65°C juures. Üldise translatsioonitaseme

määramiseks mõõdeti lagundamiste arvu minutis (DPM, *Disintegrations per minute*) kasutades *Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR* (Perkin Elmer). Kuna kontrolltüve ja mutantide kasvukiirused on erinevad, siis normaliseeriti mõõdetud tulemused kontrolltüve rakuarvu suhtes. Kasvuerinevuse arvestamiseks kasutati valemit:

$$\text{DPM (normaliseeritud)} = \frac{\text{DPM (algne)} \times \text{generatsioonisaeg (mutant)}}{\text{generatsioonisaeg (kontrolltüvi)}}$$

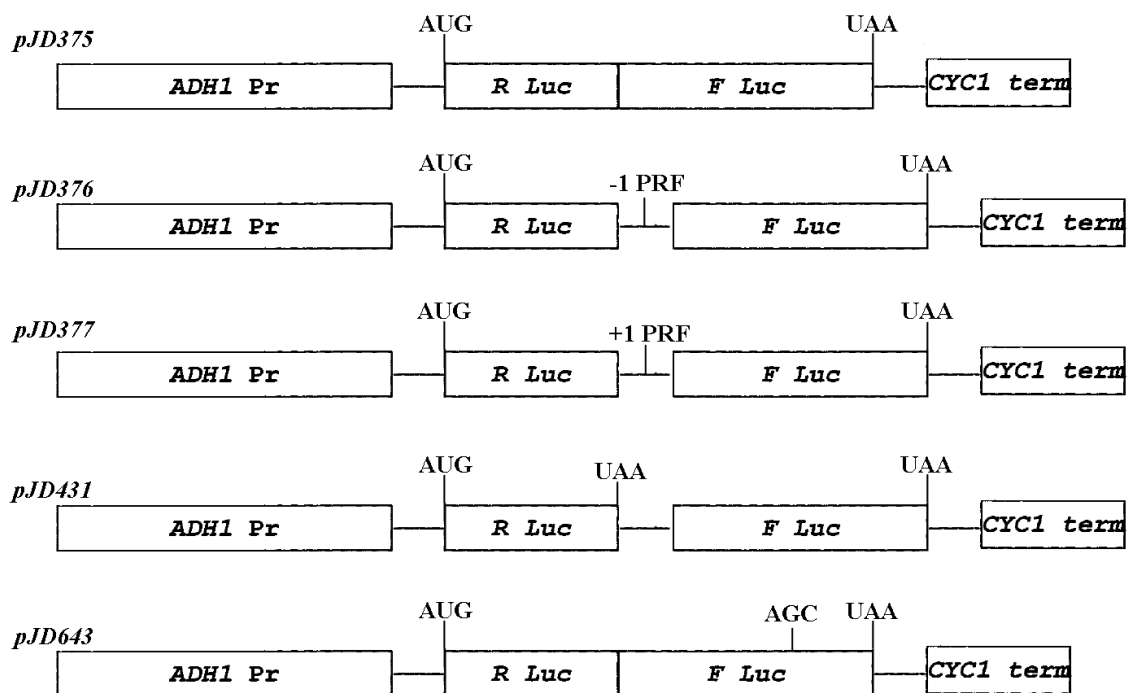
Pärmitüvede pooldumisajad on toodud lisas 3A. Teisendamisel saadud andmete põhjal konstrueeriti sirged, määrati sirgete tõusud, arvutati nendekeskmised väärtused ning suhted kontrolltüve suhtes. Katset korrati vähemalt kaks korda.

### 2.2.7 Üldise transkriptsioonitaseme määramine

Pärmirakke kasvatati modifitseeritud Sm (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,02 mg/ml uratsiil, 0,25 mg/ml leutsiin, 0,1 mg/ml arginiin, 0,1 mg/ml lüsiin) vedelsöötmes 30°C juures kuni OD<sub>600nm</sub>=0,6. Kultuurile lisati 0,026 µM <sup>3</sup>H märgistatud uridiini (*Hartmann Analytic*, MT799, uridiin [5,6-<sup>3</sup>H]-, lõppkontsentratsioon kultuuris 0,83 µCi/ml). Ajapunktid võeti iga 15 min järel 2 tunni jooksul. 1 ml kultuurile lisati 200 µl 50% TCA ning inkubeeriti jääl 10-120 min. Proovid filtreeriti Whatman GF/A filtrile, filtrid pesti 10 ml 5% TCA ja 10 ml 70% etanooliga ning kuivatati 10 min 65°C juures. Mõõdetud tulemused normaliseeriti kontrolltüve rakuarvu suhtes kasutades alapeatükis 2.2.6 toodud valemit. Katset korrati vähemalt kaks korda.

### 2.2.8 Ribosoomide translatsioonitäpsuse määramine

Ribosoomide translatsioonitäpsuse määramiseks *in vivo* kasutati prof. J.D. Dinmani käest saadud plasmide (plasmiidid on kirjeldatud alapeatükis 2.2.2; joonis 11) (Rhodin ja Dinman, 2010). *pJD375* on kontrollplasmiid, mis sisaldab *Renilla* lutsiferaasi ja *Firefly* lutsiferaasi geene samas lugemisraamis. *pJD376* plasmiidis on *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaasi geene vahele lisatud L-A viiruse (*S. cerevisiae* dsRNA viirus) -1 ribosomaalse raaminihke signaal. *pJD377* plasmiidis paikneb *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaaside järjestuste vahel pärmil Ty1 retrotransposooni +1 ribosomaalse raaminihke signaal. *pJD431* plasmiid sisaldab UAA stoppkoodonit enne *Firefly* lutsiferaasi geeni. Plasmiidis *pJD643* on arginiini kodeeriv AGA



**Joonis 11. Ribosoomide translatsiooni täpsuse määramisel kasutatud *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaaside geenide reportersüsteem.** Näidatud on alkoholi dehüdrogenaasi geeni promootorjärjestuse (*ADH1 Pr*), *Renilla* (*R Luc*) ja *Firefly* (*F Luc*) lutsiferaaside geenide järjestuste ning tsütokroom C geeni terminaatorjärjestuse (*CYC1 term*) paigutused. **pJD375**, kontrollplasmiid, mis sisaldab *Renilla* lutsiferaasi ja *Firefly* lutsiferaasi geene samas lugemisraamis; **pJD376** - *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaasi geene vahele on lisatud -1 ribosomaalse raaminihke signaal (-1 PRF); **pJD377** - *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaaside järjestuste vahel paikneb +1 ribosomaalse raaminihke signaal (+1 PRF); **pJD431** - UAA stopkoodoni enne *Firefly* lutsiferaasi geeni; **pJD643** – arginiini kodeeriv AGA koodon *Firefly* lutsiferaasis (Arg218) on asendatud seriini kodeeriva AGC koodoniga (*missense* mutatsioon).

koodon *Firefly* lutsiferaasi geenis (arginiin positsioonis 218) asendatud seriini kodeeriva koodoniga AGC. *S. cerevisiae* rakud transformeeriti liitium-atsetaat meetodiga (Knop jt., 1999). Lutsiferaaside aktiivsuste määramiseks kasutati Harger ja Dinman (2003) poolt kirjeldatud meetodit. Rakke kasvatati Sc –ura (tabel 2) vedelsöötmes 25°C või 30°C juures kuni  $OD_{600nm}=0,7-1,0$ . Rakud koguti tsentrifuugimise teel (2 min 2400 x g 4°C) ja pesti puhvriga A [1x PBS (pH 7,4), 1mM PMSF]. Rakud resuspendeeriti 300 µl puhvriss A, lisati klaaskuulid (200 µl, Ø=0,5 mm) ning lüüsiiti *Precellys 24* (*Bertin Technologies*) homogenisaatoriga (3x 1min, paus 1 min, 6000 rpm, 4°C). Lüsaadid tsentrifuugiti 10 min 2375 x g 4°C juures. Lutsiferaaside aktiivsused määrati kasutades *Stop and Glo Dual Luciferase Kit*'i (*Promega*) ning *Infinite M200 PRO* (*TECAN*) mikroplaatide lugejat. 5 µl rakulüsaadile lisati 50 µl *LARII* substraadi lahust ning mõõdeti *Firefly* lutsiferaasi aktiivsus. Seejärel lisati 50 µl *Stop&Glo* substraadi lahust ning mõõdeti *Renilla* lutsiferaasi aktiivsus. Saadud andmeid analüüsiti statistiliselt Jacobs ja Dinman (2004) meetodi järgi. Katse

eesmärgiks on võrrelda *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside aktiivsuste suhet kontrolltüves ja mutantides. Mõõdetud *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse väärtused jagati mõõdetud *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse väärtustega. Saadud andmestik peegeldas lutsiferaaside aktiivsuste suhet igas mõõdetud proovis. Eksimuspunktid välistati kvartiilide meetodiga. Edasiseks analüüsiks valitud andmete alusel arvutati lutsiferaaside aktiivsuste suhete keskmine, standardhälve, varieerivus ja standardviga. Saadud väärtusi kasutati normaaljaotuse kontrollimisel. Arvutatud tulemused normaliseeriti kontrollplasmidi suhtes. Lutsiferaaside aktiivsuste suhe, mis saadi modifitseeritud plasmiidide *pJD376*, *pJD377*, *pJD431*, *pJD643* kasutamisel, jagati lutsiferaaside aktiivsuse suhtega, mis saadi kontrollplasmidi kasutades. Translatsiooni täpsuse võrdlemiseks kontrolltüve (TYSC248) ja *rpl19-146* mutandi (TYSC288) vahel kasutati *Student* t-testi ( $\alpha=0,05$  ja  $\alpha=0,01$ ). Katset korrati vähemalt kaks korda ning vähemalt kolme paralleelse kultuuriga (lisa 5).

### **2.2.9 RPL19A geeni transkriptsiooni seiskamine**

Katses kasutati metsiktüüpi pärmitüve (TYSC138) ning tüve, milles *RPL19A* geeni ekspressioon on *GALI,10* promootori kontrolli all (TYSC291). Pärmirakke kasvatati YPGal söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini ( $OD_{600nm}=0,8-1,0$ ). Seejärel vahetati YPGal sööde YPD söötme vastu, mis põhjustas *RPL19A* geeni transkriptsiooni peatamist. Katses kasutatud rakukultuurid olid kogu aeg eksponentsiaalses kasvufaasis. Ribosoomide profiilid analüüsiti 12, 18 ja 24 tundi pärast söötme vahetamist (vaata alapeatükk 2.2.5). Katset korrati kaks korda.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 *Arpl19A* ja *Arpl19B* mutantide iseloomustamine

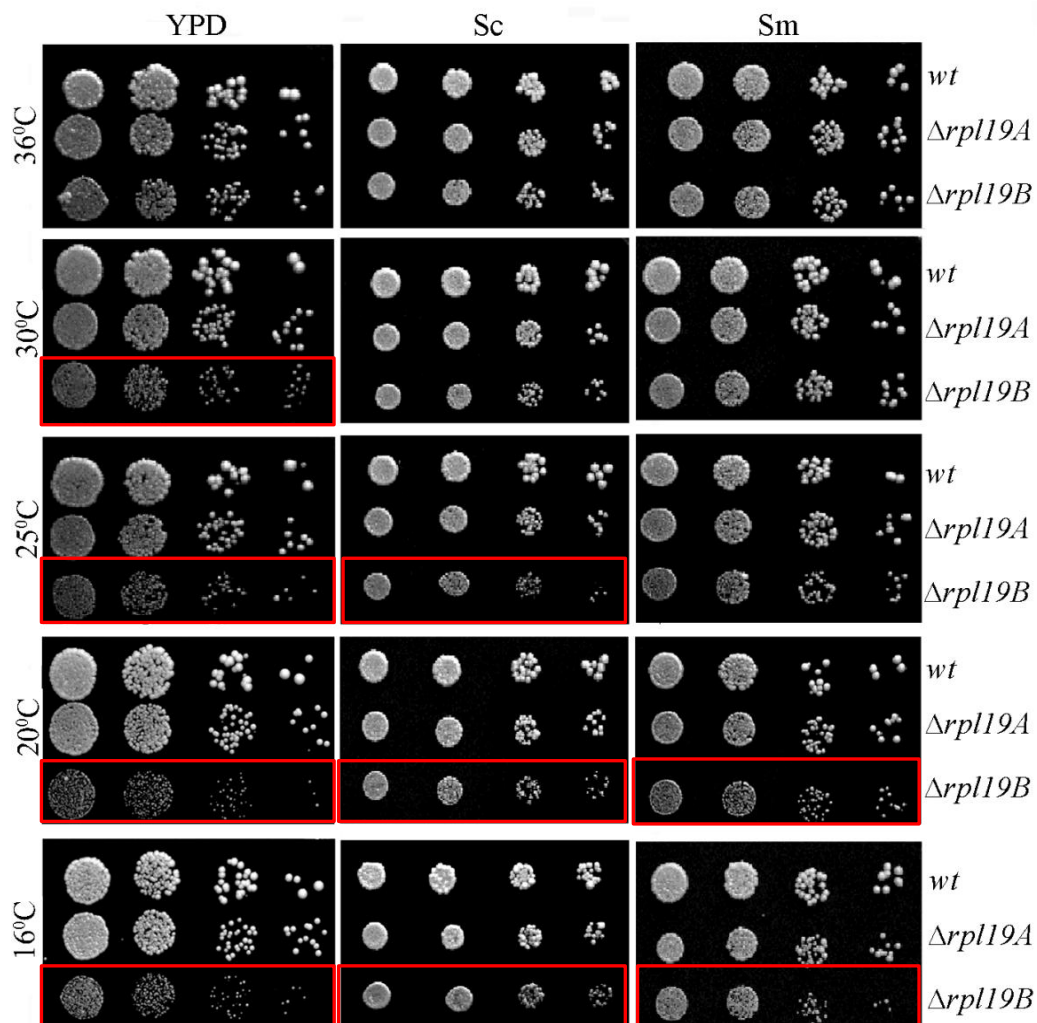
Ribosoomi suure subühiku valku rpL19 kodeerivad pagaripärmi genoomis paraloogilised geenid *RPL19A* ja *RPL19B*. Need geenid ei ole pärmile eluks hädavajalikud (Winzeler jt, 1999). Eelnev analüüs näitas, et *RPL19A* geeni deletsioon ei avalda olulist mõju pärmirakkude kasvule ja generatsiooniajale 30°C juures rikkal söötmel (Andrijako, 2013; Delaney jt., 2011; Steffen jt., 2012). Samas, *RPL19B* geeni deletsioon põhjustab generatsiooniaja pikenemist 1,4-1,5 korda võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Andrijako, 2013; Steffen jt., 2012). *Arpl19A* ja *Arpl19B* mutantide täpsemaks iseloomustamiseks uuriti nende mutantide temperatuuritundlikkust erinevatel söötmetel ja iseloomustati ribosoomide profile.

#### 2.3.1.1 Temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv (spot-test) meetodil

Temperatuuritundlikkuse analüüsimiseks kasutati metsiktüüpi (TYSC138, TYSC144), *Arpl19A* (TYSC208, TYSC203) ja *Arpl19B* (TYSC231, TYSC227) pärmitüvesid. Rakke kasvatati YPD (rikas sööde), Sc (sünteeiline täissööde, sisaldab kõiki aminohappeid, puriine ja pürimidiine) ja Sm (sünteeiline miinimumsööde, sisaldab ainult hädavajalikke komponente) söötmetel ning temperatuuridel 16°C, 20°C, 25°C, 30°C ja 36°C.

Katsetulemused näitavad, et *Arpl19A* rakud kasvavad kõikidel analüüsitud temperatuuridel ja söötmetel sarnaselt metsiktüüpi rakkudega (joonis 12).

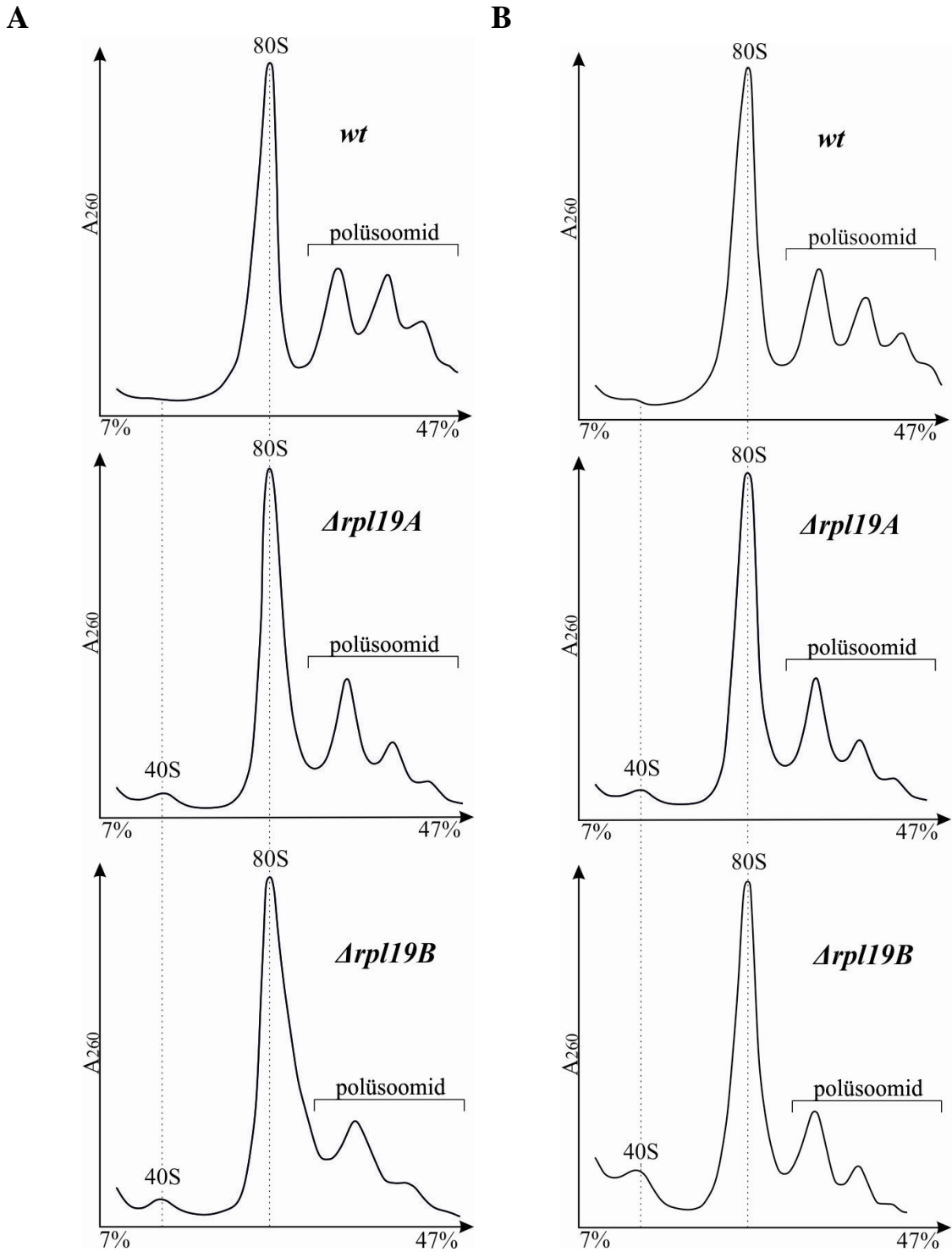
*Arpl19B* mutantsed rakud kasvavad võrreldes metsiktüüpi rakkudega aeglasemalt YPD söötmel temperatuuridel 30°C ja 25°C (joonis 12). Kasvades temperatuuridel 16°C ja 20°C, ilmneb nendel rakkudel külmatundlik fenotüüp. Külmatundlikkus avaldub *Arpl19B* mutandi rakkude kasvatamisel ka Sc söötmel 16°C, 20°C ja 25°C juures ning Sm söötmel 16°C ja 20°C juures. Saadud tulemused ei sõltu pärmitüvede paardumistüübist (tulemused ei ole näidatud).



**Joonis 12.  $\Delta rpl19A$  ja  $\Delta rpl19B$  deletsioonimutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil.** Vasakul on näidatud kasutatud temperatuurid. Üleval on toodud kasutatud söötmed: YPD, rikas sööde; Sc, sünteetiline täissööde; Sm, sünteetiline miinimumsööde. Paremalt on näidatud uuritud tüved: *wt*, metsiktüüpi rakud (TYSC138);  $\Delta rpl19A$ , mutant, kelle genoomist on deleteeritud *RPL19A* geen (TYSC208);  $\Delta rpl19B$ , mutant, kelle genoomist on deleteeritud *RPL19B* geen (TYSC231).

### 2.3.1.2 Ribosoomide profiilide analüüs

Temperatuuritundlikkuse analüüsi tulemused näitasid, et  $\Delta rpl19B$  mutantseid rakke iseloomustab YPD söötmel kasvades 30°C juures aeglase kasvu fenotüüp ning 20°C juures avaldub külmatundlikkus. Lähtudes nendest tulemustest, kasvatati ribosoomide profiilide analüüsiks rakke YPD söötmes temperatuuridel 30°C või 20°C. Katses kasutati alapeatükis 2.3.1.1 kirjeldatud tüvesid.



**Joonis 13. *Arpl19A* ja *Arpl19B* deletsioonimutantide ribosoomide profiilide analüüs.** Pärmirakke kasvatati YPD söötmes 30°C (A) ja 20°C (B) juures. 30 ekvivalentühikut ( $OD_{260nm}$ ) rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifugimise teel ning visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on 7%-47% sahharoosi gradient, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. *wt*, metsiktüüpi rakud (TYSC138); *Arpl19A*, mutant, kelle genoomist on deleteeritud *RPL19A* geen (TYSC208); *Arpl19B*, mutant, kelle genoomist on deleteeritud *RPL19B* geen (TYSC231).

Temperatuuril 30°C kasvanud metsiktüüpi rakkudest valmistatud rakulüsaadi ribosoomide profiili analüüsil on nähtavad 80S ribosoomipartiklite piik ning di-, tri-, ja tetrasoomide piigid polüsoomide fraktsioonis (joonis 13A). *Arpl19A* rakkude lüsaadis on lisaks 80S ribosoomipartiklite piigile nähtav ka väike vabade 40S subühikute piik. Mutandi *Arpl19B* rakulüsaadi analüüsil selgus, et lisaks tekkinud vabade 40S subühikute piigile kaovad polüsoomide fraktsioonist tetrasoomid.

Rakkude kasvutemperatuuri alandamine 20°C-ni ei mõjuta oluliselt metsiktüüpi ja *Arpl19A* rakkudest valmistatud lüsaadi ribosoomide profiile (joonis 13B). Temperatuuril 20°C kasvanud *Arpl19B* rakkude lüsaati iseloomustab kõrgem vabade 40S subühikute piik võrreldes temperatuuril 30°C kasvanud rakkudega.

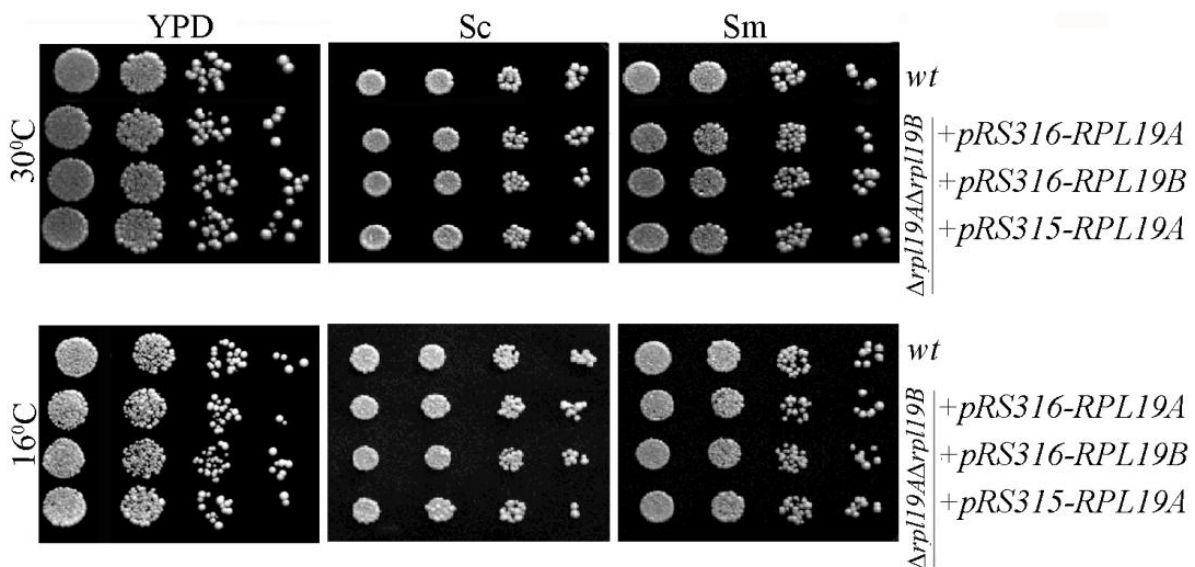
### 2.3.2 Sünteetilise letaalsuse komplementeerimine

Eelnevalt on näidatud, et *RPL19A* ja *RPL19B* samaaegne deletsioon on pämirakkudele letaalne (Giaver jt, 2002). Seda sünteetilist letaalsust saab komplementeerida kui topeltmutatsiooniga rakkudes ekspresseerida plasmiidilt *RPL19A* või *RPL19B* (Andrijako, 2013). Komplementatsioonikatsetes kasutati selles töös valmistatud tsentromeerseid plasmide *pRS316-RPL19A*, *pRS316-RPL19B* ja *pRS315-RPL19A*. Need plasmiidid on tehtud *pRS315* ja *pRS316* vektorite baasil, mis erinevad ainult lõikamissaitide ja markergeenide (vastavalt *LEU2* ja *URA3*) poolest. Seoses sellega otsustati võrrelda erinevate plasmiidide komplementatsioonivõimet erinevatel temperatuuridel ja söötmetel ning iseloomustada rakkude ribosoomide profiile.

#### 2.3.2.1 Temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Temperatuuritundlikkuse analüüsil kasutati metsiktüüpi (TYSC138, TYSC144) rakke ja *Arpl19A**Arpl19B* topeltmutante, mis sisaldasid plasmide *pRS316-RPL19A* (TYSC232, TYSC235), *pRS316-RPL19B* (TYSC242, TYSC239) või *pRS315-RPL19A* (TYSC248, TYSC266). Rakud külvati YPD, Sc ja Sm söötmetele ning kasvatati temperatuuridel 16°C, 20°C, 25°C, 30°C ja 36°C.

Katsetulemused näitavad, et kõikidel analüüsitud temperatuuridel ja söötmetel komplementeerivad kõik analüüsitud plasmiidid *Arpl19A**Arpl19B* sünteetilist



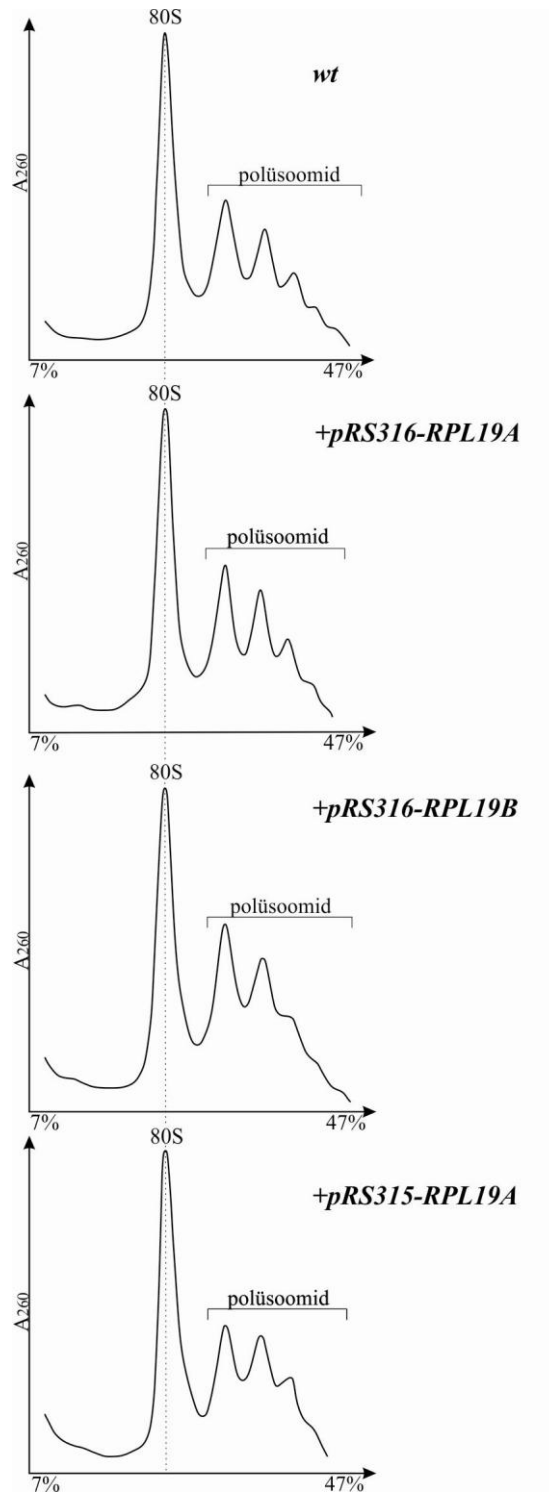
**Joonis 14.** *Δrpl19AΔrpl19B* kaksikmutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Vasakul on näidatud kasutatud temperatuurid. Üleval on toodud kasutatud söötmed: YPD, rikas sööde; Sc, sünteetiline täissööde; Sm, sünteetiline miinimumsööde. Paremalt on näidatud uuritud tüved: *wt*, metsiktüüp (TYSC138) ning *Δrpl19AΔrpl19B* mutandid, kus sünteetiline letaalsus on komplementeeritud *pRS316-RPL19A* plasmiidiga (TYSC232), *pRS316-RPL19B* plasmiidiga (TYSC242) või *pRS315-RPL19A* plasmiidiga (TYSC248).

letaalsust (joonis 14, lisa 2). Analüüsitud mutantsete rakkude kasv on sarnane metsiktüüpi rakkude kasvuga. Katsetulemusi ei mõjuta pärmirakkude erinev paardumistüüp (tulemused ei ole näidatud).

### 2.3.2.2 Ribosoomide profiilide analüüs

Ribosoomide profiilide analüüsil kasutati alapeatükis 2.3.2.1 toodud pärmitüvesid. Pärmirakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. Katsetulemused näitavad, et kõikide uuritud mutantide ribosoomide profiilid on sarnased metsiktüüpi rakkude ribosoomide profiiliga (joonis 15). Ribosoomide profiile iseloomustab 80S ribosoomipartiklite piigi ja polüsoomide fraktsiooni esinemine. Pärmirakkude erinev paardumistüüp ei mõjuta katsetulemusi (tulemused ei ole näidatud).

Kokkuvõtteks, temperatundlikkuse ja ribosoomide profiilide analüüsid näitavad, et kõik kasutatud plasmiidid komplementeerivad *Δrpl19AΔrpl19B* kaksikmutatsiooni sünteetilist letaalsust kõikidel temperatuuridel ja söötmetel samal tasemel. Pärmirakkude erinev paardumistüüp mõju ei avalda. Seega saab edaspidistes katsetes kasutada mõlema markergeeni plasmide, mis ekspresseerivad kas *RPL19A* või *RPL19B* paraloogilisi gene.



**Joonis 15.  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  kaksikmutantide ribosoomi profiilide analüüs.** Pärmirakke kasvatati YPD söötmes 30°C juures. 30 ekvivalentühikut ( $OD_{260nm}$ ) rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifuugimise teel ning visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on 7%-47% sahharoosi gradient, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. *wt*, metsiktüüp (TYSC138);  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  mutandid, kelle sünteetiline letaalsus on komplementeeritud *pRS316-RPL19A* plasmiidiga (TYSC232), *pRS316-RPL19B* plasmiidiga (TYSC242) või *pRS315-RPL19A* plasmiidiga (TYSC248).

### 2.3.3 RPL19A geeni transkriptsiooni seiskamine

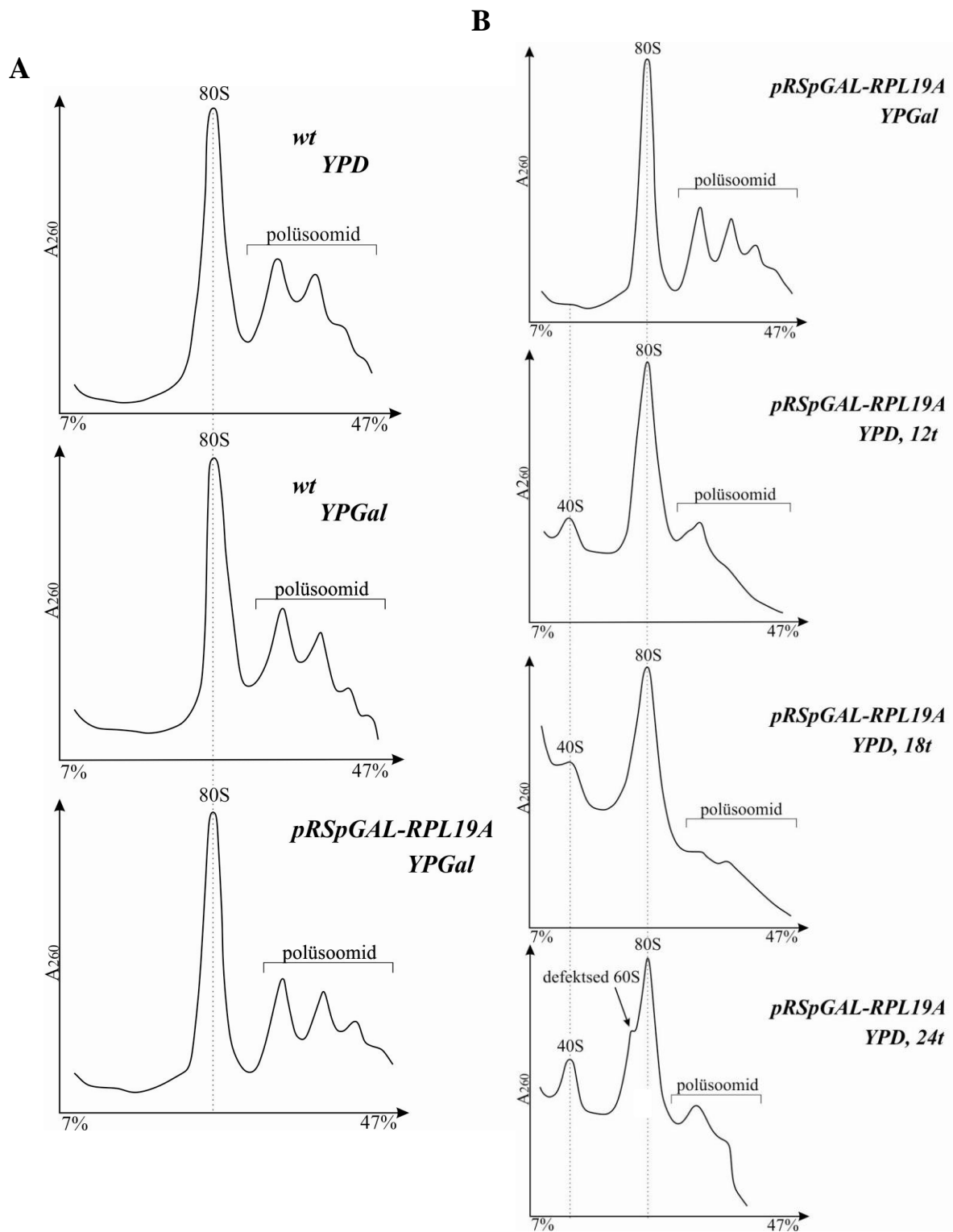
Reguleeritavaid promootoreid on võimalik kasutada rakus geeniekspressiooni taseme muutmiseks. Üheks kõige enim kasutatavaks reguleeritavaks promootriks pärmigeneetikas on *GAL1,10* promootor, millelt on transkriptsioon aktiveeritud galaktoosi ja represseritud glükoosi poolt. Molekulaarbioloogia laboris on konstrueeritud pärmittiivi, kus  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetiline letaalsus on komplementeeritud *pRSpGAL-RPL19A* plasmidi poolt. Plasmid *pRSpGAL-RPL19A* sisaldab *RPL19A* geeni, mille ekspressioon on galaktoosi poolt reguleeritava promootori (*GAL1,10*) kontrolli all. Galaktoosi sisaldava söötme vahetamine glükoosi sisaldava söötmega põhjustab *RPL19A* geeni transkriptsiooni seiskumise, kuna glükoos represserib transkriptsiooni *GAL1,10* promootorilt. Seega on söötme vahetuse teel võimalik uurida millist mõju omab ribosoomide profiilile *rpL19* valgu puudumine.

#### 2.3.3.1 Ribosoomide profiilide analüüs

Ribosoomide profiilide analüüsil kasutati metsiktüüpi (TYSC138) rakke ja  $rpl19A\Delta rpl19B\Delta + [pRSpGAL-RPL19A]$  (TYSC291 ehk nn. „*shut-off*“ tüvi) pärmitüve. Rakke kasvatati YPGal söötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini. Seejärel vahetati YPDGal sööde YPD söötme vastu. Ribosoomide profiilide analüüs viidi läbi 12, 18 ja 24 tundi pärast söötme vahetamist valmistatud rakulüsaatidest.

„*Shut-off*“ tüve rakkude kasvatamisel YPGal söötmes on ribosoomide profiil sarnane metsiktüüpi rakkude ribosoomide profiilidega, mis on kasvanud YPD või YPGal söötmetes (joonis 16A). Saadud tulemused näitavad, et plasmid *pRSpGAL-RPL19A* komplementeerib edukalt  $rpl19A\Delta rpl19B\Delta$  sünteetilist letaalsust ning seda saab kasutada järgnevas transkriptsiooni seiskamise analüüsil.

12 ja 18 tundi pärast *RPL19A* transkriptsiooni seiskamist väheneb „*shut-off*“ tüve rakulüsaadis märkimisväärselt polüsoomide hulk ning kogunevad vabad 40S subühikud (joonis 16B). 24 tunni möödumisel pärast söötme vahetamist suureneb „*shut-off*“ tüve rakulüsaadis vabade 40S subühikute piik ning kogunevad defektsed 60S subühikud (näidatud noolega joonisel 16B). Kõikidel juhtudel 80S piigi kõrgus ei muutu.



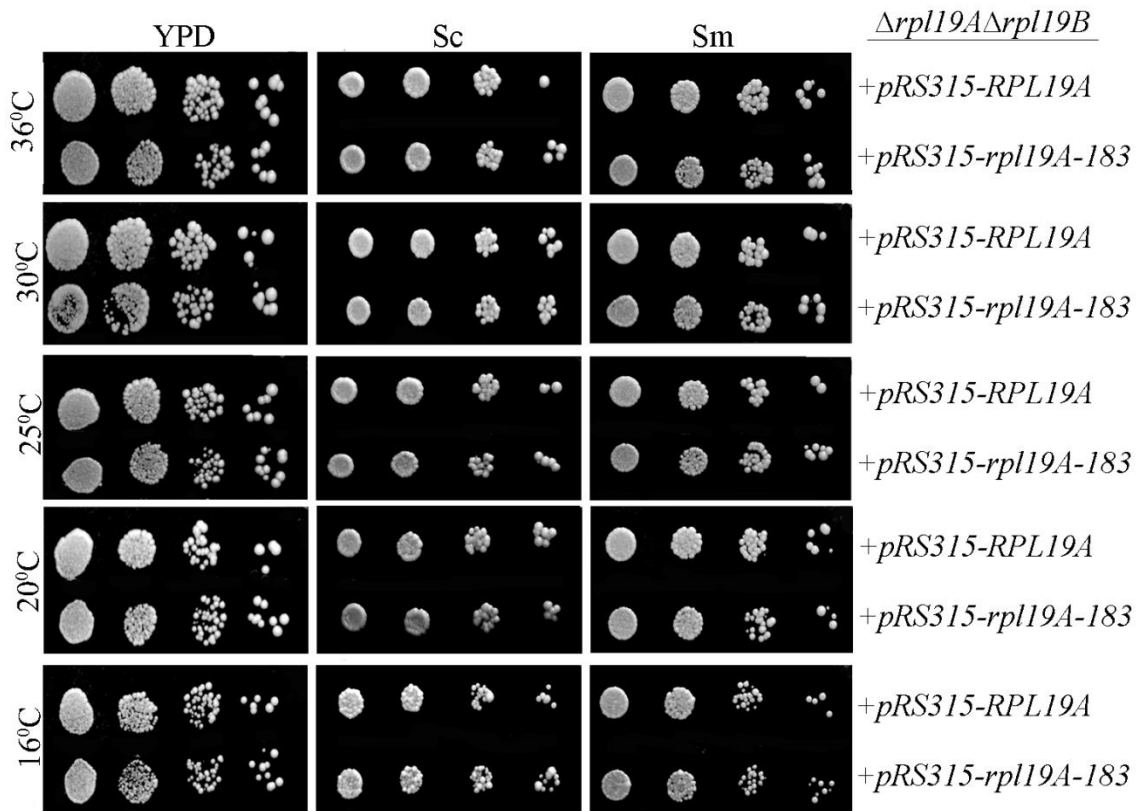
**Joonis 16. Ribosoomide profiilide analüüs *RPL19A* geeni transkriptsiooni seiskamisel.** Pärmirakke kasvatati näidatud söötmetel 30°C juures. 30 ekvivalentühikut ( $OD_{260nm}$ ) rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifuugimise teel ning visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on 7%-47% sahharoosi gradient, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. *wt*, metsiktüüp (TYSC138); *rpl19AΔrpl19BΔ* sünteetiline letaalsus on komplementeeritud plasmiidilt *pRSpGAL-RPL19A* (TYSC291 ehk nn. „shut-off“ tüvi). **A.** Metsiktüüpi (kasvatatud YPD ja YPGal söötmetes) ja „shut-off“ (kasvatatud YPGal söötmes) tüvede võrdlus. **B.** *RPL19A* geeni transkriptsiooni seiskamine „shut-off“ tüves. Ribosoomide profiile analüüsiti YPGal söötmes kasvanud rakkudest ning 12, 18 ja 24 tundi peale söötme vahetamist YPD söötme vastu.

### 2.3.4 Subühikute vahelise silla eB12 funktsionaalne analüüs.

Pagaripärmi ribosoomi eB12 silla põhikomponendiks on rpL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks, mis moodustab interaktsioone 18S RNA lisasegmendiga ES6S ning 40S subühiku valkudega rpS7 ja rpS17 (Ben-Shem jt, 2011). Selleks, et analüüsida eB12 silla olulisust ribosoomi funktsionaalsuse seisukohast valmistati tüved, mis ekspresseerivad erinevaid rpL19 deletsioonimutante (tüvedes kasutatavad plasmiidid on tehtud A. Andrijako ja T. Tamm poolt *pRS315-RPL19A* plasmidi baasil, joonis 9). Mutandil *rpl19A-183* puudub C-terminaalsest osast 6 ah. jääki, mis interakteerivad valguga rpS7. Mutandil *rpl19A-154* on deleteeritud 35 ah. jääki, mis osalevad eB12 silla moodustamisel (interaktsioonid valkudega rpS7e ja rpS17 ning lisasegmendiga ES6S). Mutandil *rpl19A-146* on deleteeritud C-terminaalsest  $\alpha$ -heeliksist 43 ah. jääki, mis mimikeerib arhede (*Archaea*) ribosoomis olevat L19 valgu struktuuri (Armache jt., 2013) Mutantsete rpL19 valkude struktuurid on kirjeldatud alapeatükis 1.5.1. Järgnevate katsete eesmärgiks oli uurida eB12 silla tähtsust ribosoomide funktsioneerimisel.

#### 2.3.4.1 mutandi *rpl19A-183* temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

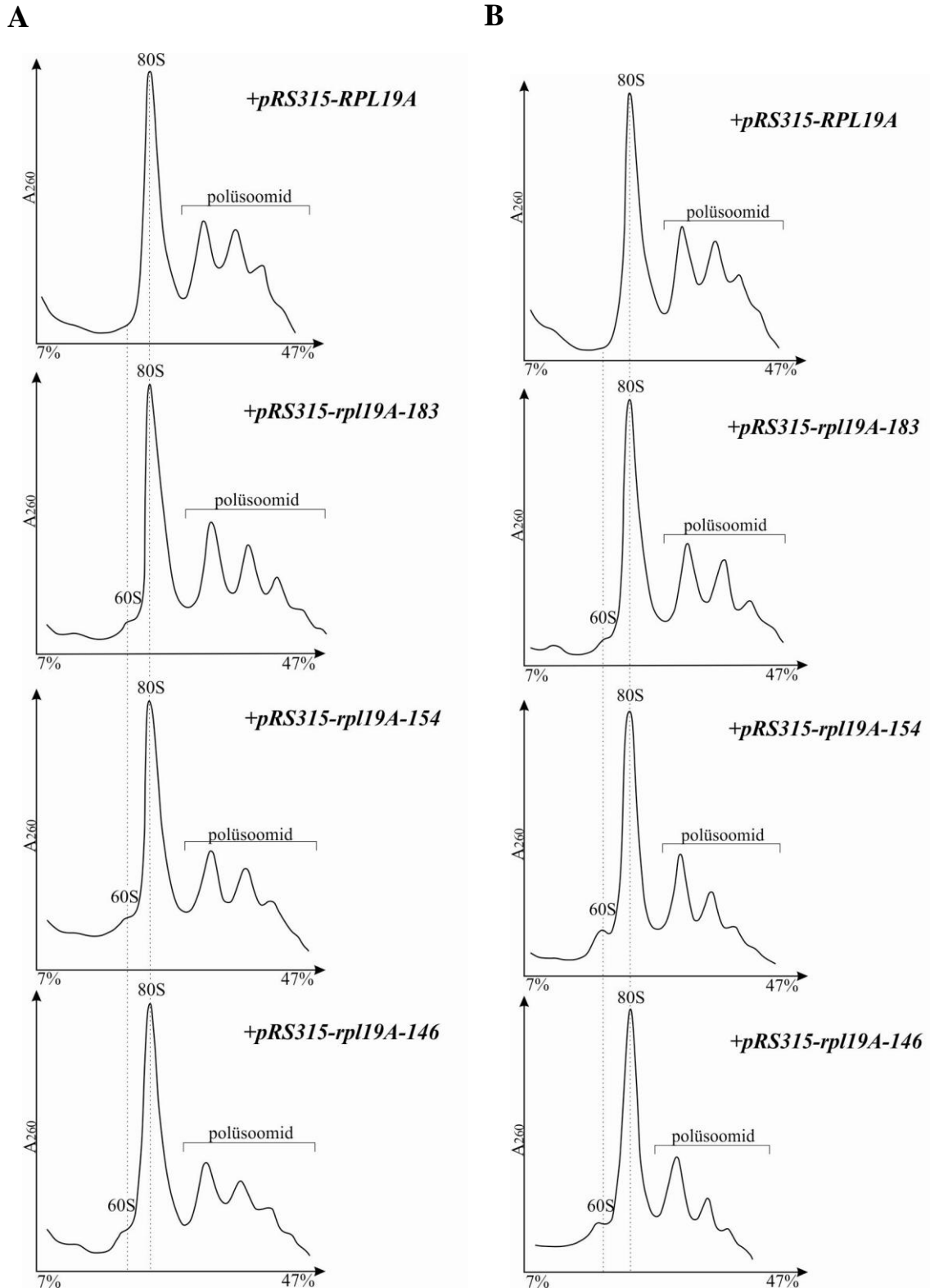
Temperatuuritundlikkuse analüüsi katsetes kasutati  $\Delta rpl19A rpl19B$  pärmitüve, kelle sünteetilist letaalsust komplementeerivad *pRS315-RPL19A* (TYSC248, TYSC266) või *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262, TYSC280) plasmiidid. Rakke kasvatati YPD, Sc ja Sm söötmetel ning temperatuuridel 16°C, 20°C, 25°C, 30°C ja 36°C. Katsetulemused näitavad, et kõikidel analüüsitud temperatuuridel ja söötmetel kasvavad mutantset rpl19-183 valku ekspresseerivad rakud sarnaselt kontrolltüvega (joonis 17). Katsetulemusi ei mõjuta pärmirakkude erinev paardumistüüp (tulemused ei ole näidatud).



**Joonis 17. Mutandi *rpl19A-183* temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil.** Vasakul on näidatud kasutatud temperatuurid. Üleval on toodud kasutatud söötmed: YPD, rikas sööde; Sc, sünteetiline täissööde; Sm, sünteetiline miinimumsööde. Paremal on näidatud uuritud *Δrpl19AΔrpl19B* pärmitüved, kelle sünteetilist letaalsust komplementeerivad *pRS315-RPL19A* (TYSC248) või *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262) plasmiidid.

#### 2.3.4.2 Ribosoomide profiilide analüüs

T. Tamm poolt tehtud *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutantide fenotüüpide analüüs näitas, et kasvamisel YPD söötmel tekib nendel tüvedel külmatundlikkus 16°C, 20°C ja 25°C juures (lisa 3). Temperatuuril 30°C kasvavad need tüved kontrolltüvest veidi aeglasemalt (aeglase kasvu fenotüüp) ning temperatuuril 36°C juures on nende kasv sarnane kontrolltüvega. Lähtudes nendest tulemustest kasutati ribosoomide profiilide analüüsil pärmitüvesid, kelles *Δrpl19AΔrpl19B* sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega *pRS315-RPL19A* (TYSC248, TYSC266, kontrolltüved), *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262, TYSC280), *pRS315-rpl19A-154* (TYSC257, TYSC282) või *pRS315-rpl19A-146* (TYSC288, TYSC283). Rakke kasvatati YPD söötmel temperatuuridel 25°C ja 30°C.



**Joonis 18. Mutantide *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* ribosoomi profiilide analüüs.** Pärmirakke kasvatati YPD söötmes 30°C (A) ja 20°C (B) juures. 30 ekvivalentühikut ( $OD_{260nm}$ ) rakulüsaati kanti 7%-47% sahharoosi gradiendile, lahutati tsentrifuugimise teel ning visualiseeriti lainepikkusel 260 nm. X-teljel on 7%-47% sahharoosi gradient, Y-teljel on neeldumine lainepikkusel 260 nm. Katses kasutati tüvesid, kelle  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega *pRS315-RPL19A* (TYSC248), *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262), *pRS315-rpl19A-154* (TYSC257) või *pRS315-rpl19A-146* (TYSC288).

Temperatuuril 30°C kasvanud kontrolltüve rakkudest valmistatud rakulüsaadi ribosoomide profiili analüüsil on nähtavad 80S ribosoomipartiklite piik ning di-, tri-, ja tetrasoomide piigid polüsoomide fraktsioonis (joonis 18A). Kõikidel analüüsitud mutantide rakulüsaatides on lisaks sellele nähtavad vabade 60S subühikute piigid.

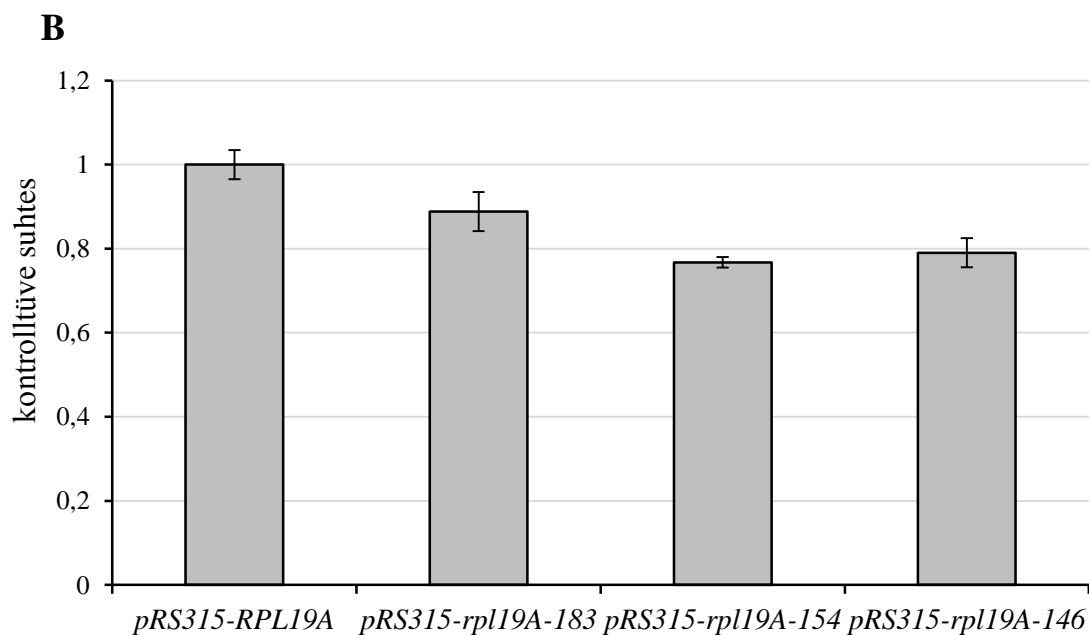
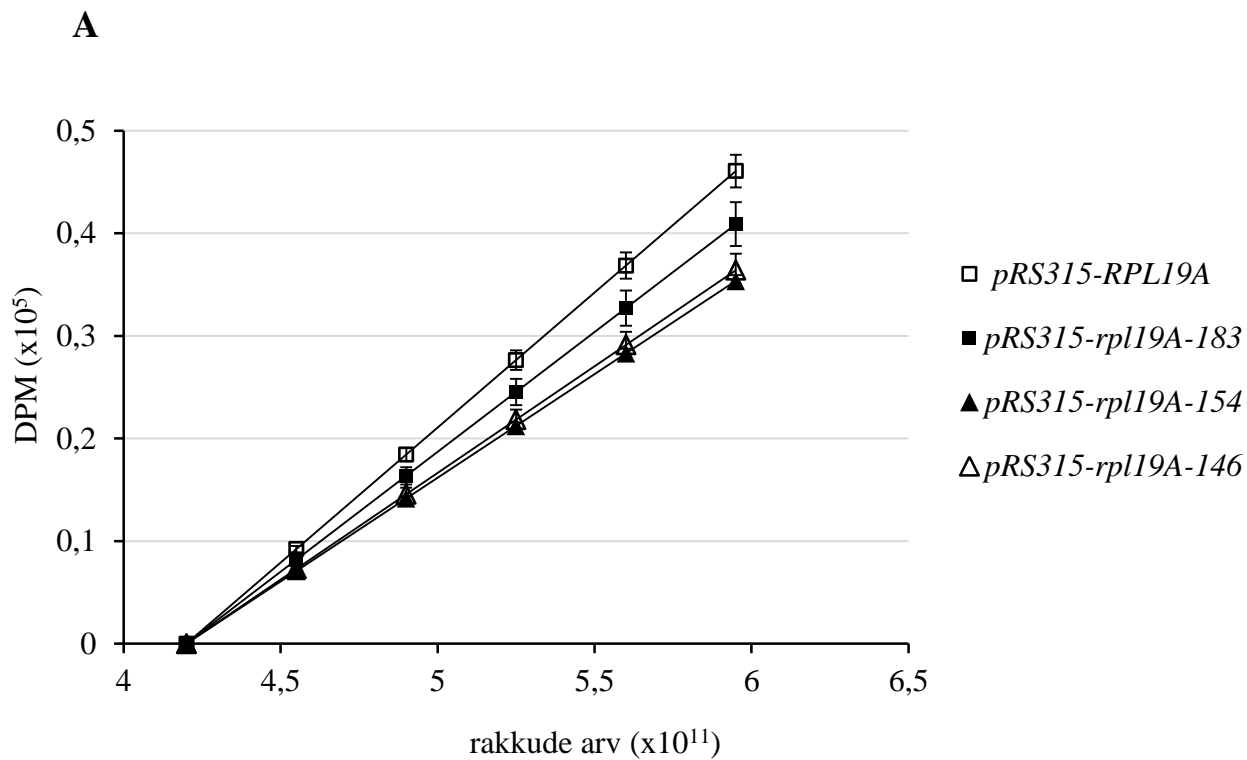
Kontrolltüve ja mutandi *rpl19A-183* rakkude ribosoomide profiilid jäävad samaks ka kasvutemperatuuril 20°C (joonis 18B). Mutantide *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* ribosoomide profiilides on nähe suuremat vabade 60S subühikute piiki võrreldes ribosoomide profiilidega 30°C juures. Polüsoomide kogus ei ole muutunud.

### 2.3.4.3 Üldise translatsioonitaseme analüüs

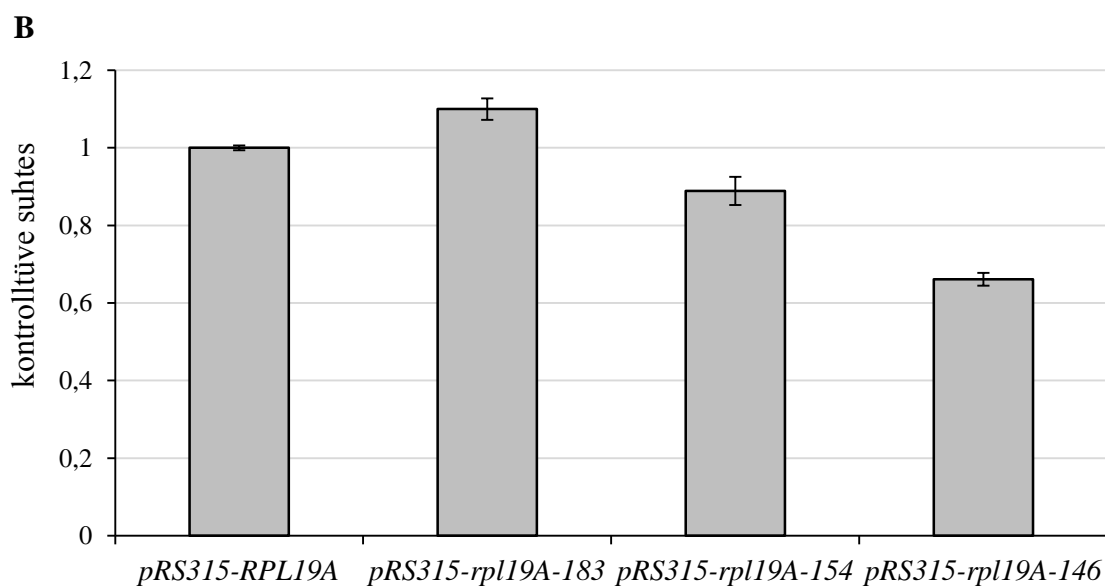
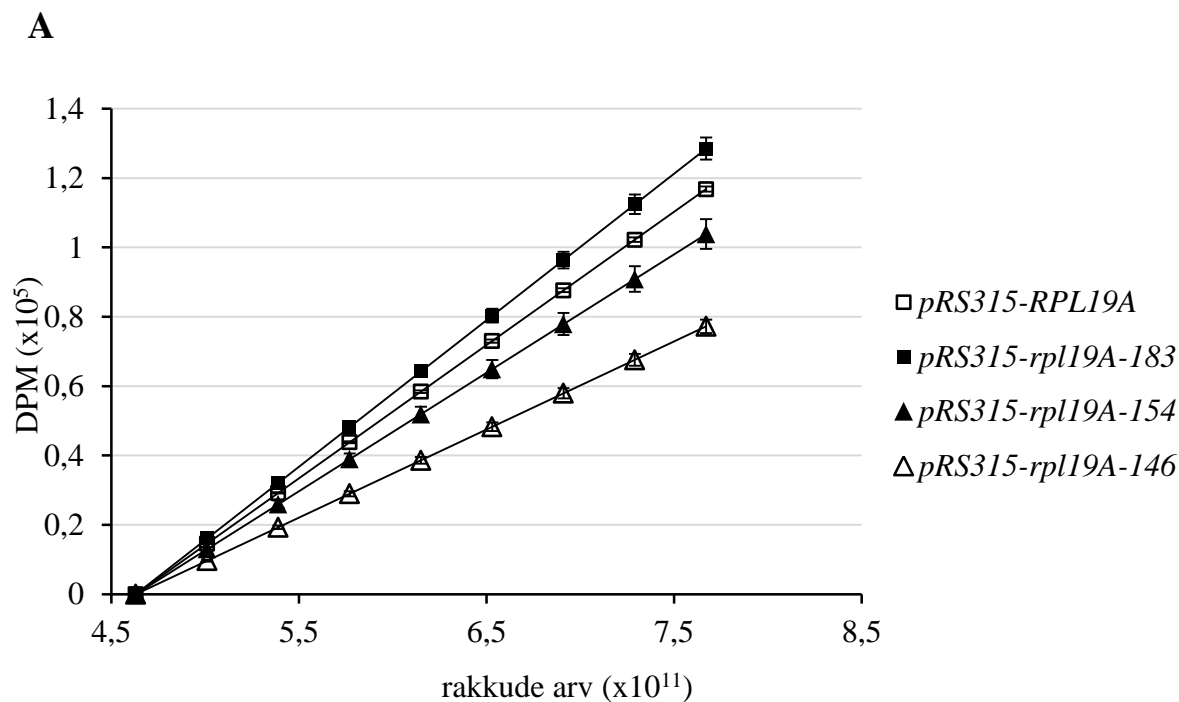
Selleks, et uurida rpl19 valgu C-terminaalsete deletsioonide mõju ribosoomide funktsionaalsusele, analüüsiti pärmirakkude üldist translatsioonitaset. Katses kasutati ainult MAT $\alpha$  paardumistüübiga pärmitüvesid, kus  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega *pRS315-RPL19A* (TYSC248, nn. kontrolltüvi), *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262), *pRS315-rpl19A-154* (TYSC257) või *pRS315-rpl19A-146* (TYSC288). Rakke kasvatati 30°C juures Sm söötmes.

Peale radioaktiivselt märgistatud aminohapete segu lisamist võeti ajapunktid iga 15 min järel 1,5 tunni jooksul. Seega katses saadud mõõdetud tulemused peegeldasid radioaktiivselt märgistatud aminohapete lülitumist valkude koosseisu sõltuvalt pärmirakkude kultuuri kasvamise ajast. Katses kasutatud mutantsete tüvede generatsiooniajad on erinevad (lisa 4A, määratud T.Tamm poolt). Selleks, et võrrelda kontrolltüve üldist translatsioonitaset mutantsete tüvedega, võeti mõõdetud tulemuste teisendamisel arvesse rakkude kasvukiirus. Mõõdetud tulemuste põhjal konstrueeritud sirged normaliseeriti kontrolltüve rakuarvu suhtes (alapeatükk 2.2.6, lisa 4B).

Saadud tulemuste põhjal saab mutante jagada kahte rühma. Esimesse rühma kuulub *rpl19A-183* mutant, kelle üldine translatsioonitase on võrreldes kontrolltüvega 1,12 korda madalam (joonis 19). Teises rühmas on *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutandid, kelle translatsioonitasemed on kontrolltüvest veelgi madalamad, vastavalt 1,30 ja 1,27 korda.



**Joonis 19. Mutantide *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* üldise translatsioonitaseme analüüs 30°C juures.** Katses kasutati tüvesid, kelle  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega  $pRS315-RPL19A$  (TYSC248),  $pRS315-rpl19A-183$  (TYSC262),  $pRS315-rpl19A-154$  (TYSC257) või  $pRS315-rpl19A-146$  (TYSC288) **A.**  $^{14}C$  märgistatud aminohapete lülitamine valkude koosseisu. Y-teljel on lagunemiste arv minutis (DPM); X-teljel on pämirakkude arv 1 ml kultuuris. **B.** arvatud sirgede keskmised tõusud koos standardvigadega, mis on normaliseeritud kontrolltüve suhtes. Y-teljel on tõusude suhtelised väärtused.



**Joonis 20. Mutantide *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* üldise transkriptsioonitaseme analüüs 30°C juures.** Katses kasutati tüvesid, kelle  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega  $pRS315-RPL19A$  (TYSC248),  $pRS315-rpl19A-183$  (TYSC262),  $pRS315-rpl19A-154$  (TYSC257) või  $pRS315-rpl19A-146$  (TYSC288) **A.**  $^3H$  märgistatud uridiini lülitamine RNA koosseisu. Y-teljel on lagunemiste arv minutis (DPM); X-teljel on pämirakkude arv 1 ml kultuuris. **B.** arvutatud sirgede keskmised tõusud koos standardvigadega, mis on normaliseeritud kontrolltüve suhtes. Y-teljel on tõusude suhtelised väärtused.

#### 2.3.4.4 Üldise transkriptsioonitaseme analüüs.

Mutantide üldise translatsioonitaseme languse põhjuseks võivad olla kas ribosoomide biogeneesi defektid, ribosoomide translatsioonikiiruse vähenemine või transkriptsioonitaseme langus. Selle hüpoteesi kontrollimiseks analüüsiti mutantide üldist transkriptsioonitaset.

Katses kasutati alapeatükis 4.3.3 kirjeldatud tüvesid. Rakke kasvatati 30°C juures Sm söötmes. Kõik saadud tulemused (lisa 4C) analüüsiti vastavalt alapeatükkides 2.3.4.3 ja 2.2.6 kirjeldatud meetodile.

Analüüsist selgus, et *rpl19A-183* mutandil on võrreldes kontrolltüvega üldine transkriptsioonitase 1,1 korda kõrgem (joonis 20). *rpl19A-154* mutandi transkriptsioonitase on võrreldes kontrolltüvega 1,12 korda madalam ning *rpl19A-146* mutandil 1,52 korda madalam. Saadud tulemused näitavad, et mutatsiooni *rpl19A-146* mõju avaldub juba transkriptsiooni tasemel põhjustades sellega translatsiooni langust. Mutatsioonid *rpl19A-183* ja *rpl19A-154* ei avalda olulist mõju transkriptsioonile.

#### 2.3.4.5 Ribosoomi translatsioonitäpsuse määramine

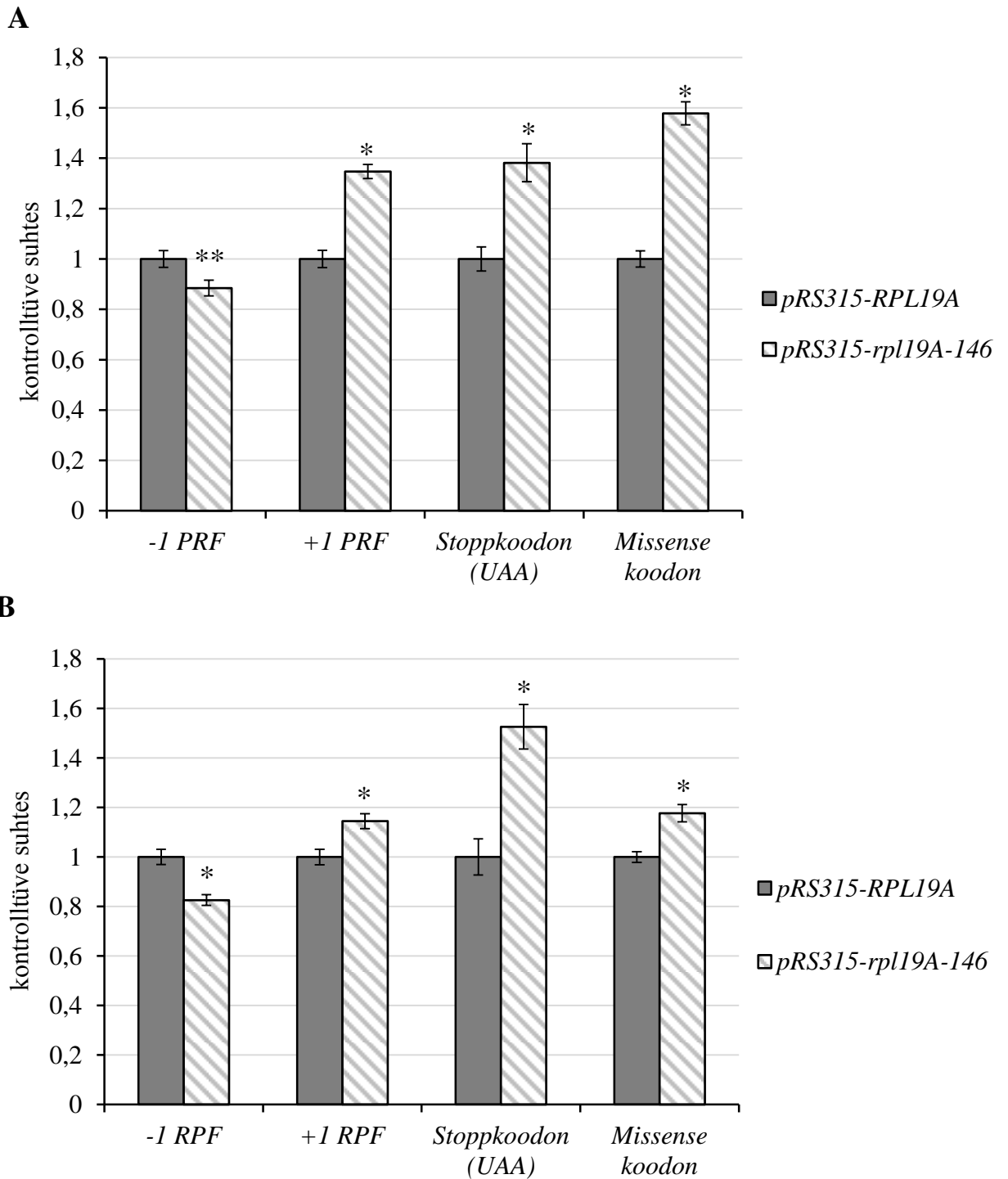
Üldiste translatsiooni- ja transkriptsioonitasemete analüüs näitas, et *rpl19-146* mutant erineb kontrolltüvest kõige rohkem (joonised 19 ja 20). Temperatuuritundlikkuse analüüs näitas, et sellel tüvel on aeglase kasvu fenotüüp YPD söötmel 30°C juures kasvades ning temperatuuritundlikkus 25°C juures. Lähtudes nendest tulemustest analüüsiti kontrolltüve ja *rpl19A-146* mutandi translatsioonitäpsust 30°C ja 25°C juures Sc –ura söötmes (lisa 5) Analüüsis kasutati prof. J.D. Dinmani käest saadud plasmide, mis sisaldavad -1 raaminihke (-1 PRF) või +1 raaminihke (+1 PRF) signaale *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaaside geenide vahel, UAA stoppkoodonit enne *Firefly* lutsiferaasi geeni või AGA→AGC mutatsiooni *Firefly* lutsiferaasi geenis (*missense* mutatsioon, arginiin *Firefly* lutsiferaasi katalüütilises saidis positsioonis 218 on asendatud seriiniga). Nende plasmide analüüsil saadud tulemused normaliseeriti kontrollplasmidi suhtes, kus lutsiferaaside geenid on samas lugemisraamis (vt. alapeatükk 2.2.8). Katses kasutati pärmitüvesid, kus  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeerib *pRS315-RPL19A* plasmid (TYSC248, nn. kontrolltüvi) või *pRS315-rpl19A-146* plasmid (TYSC288).

**Tabel 5. Raaminihete toimumine ja mutantsete koodonite suppressioon kontrolltüves ja mutandis *rpl19A-146* temperatuuridel 30°C ja 25°C.**

T (°C)	Raaminihke signaal või koodoni mutatsioon	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[ <i>pRS315-RPL19A</i> ]; Efektiivsus (%) ± standardviga	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[ <i>pRS315-rpl19A-146</i> ]; Efektiivsus (%) ± standardviga
30	-1 PRF	11,16 ± 0,37	9,87 ± 0,35
	+1 PRF	7,22 ± 0,25	9,73 ± 0,20
	Stoppkoodon (UAA)	0,179 ± 0,009	0,248 ± 0,013
	<i>Missense</i> koodon	0,177 ± 0,006	0,279 ± 0,008
25	-1 PRF	12,46 ± 0,38	10,29 ± 0,27
	+1 PRF	6,82 ± 0,21	7,80 ± 0,21
	Stoppkoodon (UAA)	0,179 ± 0,013	0,273 ± 0,016
	<i>Missense</i> koodon	0,264 ± 0,006	0,310 ± 0,009

Temperatuuril 30°C toimub mutandis *rpl19A-146* -1PRF efektiivsusega 9,87%±0,35%, mis on 1,14 korda madalam võrreldes kontrolltüvega (statistiliselt oluline erinevus,  $\alpha=0,05$ ; tabel 5, joonis 21A). Mutandis *rpl19A-146* toimub +1PRF ning stopp- ja *missense* koodonite suppressioon efektiivsusega vastavalt 9,73%±0,20%, 0,248%±0,013% ning 0,279%±0,008%, mis on 1,35, 1,38 ja 1,58 korda kõrgem kui kontrolltüves. Need erinevused on statistiliselt olulised,  $\alpha=0,01$ .

Samasugused erinevused on mutandis *rpl19A-146* temperatuuril 25°C kasvades. -1PRF toimumise sagedus on 10,29%±0,27%, mis on 1,2 korda madalam kui kontrolltüves (tabel 5, joonis 21B). Samal ajal on +1PRF toimumise ning stopp- ja *missense* koodonite suppressiooni sagedused vastavalt 7,80%±0,21%, 0,273%±0,016% ning 0,310%±0,0092%, mis on 1,14, 1,53 ja 1,18 korda kõrgem võrreldes kontrolltüvega. Kõik erinevused on statistiliselt olulised,  $\alpha=0,01$ .



**Joonis 21.** *rpl19A-146* mutandi raaminihete ja koodonite suppressiooni toimumise sagedused võrreldes kontrolltüvega. Pärmirakke kasvatati Sc –ura söötmes 30°C (A) ja 25°C (B) juures. Katses kasutati tüvesid, kelle  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega *pRS315-RPL19A* (TYSC248, kontrolltüvi) või *pRS315-rpl19A-146* (TYSC288). Y-teljel on sageduste suhtelised väärtused; \* - statistiliselt oluline erinevus ( $\alpha=0,01$ ); \*\* - statistiliselt oluline erinevus ( $\alpha=0,05$ ).

## 2.4 Arutelu

Viimane *S. cerevisiae* ribosoomi kristallstruktuur, mis on tehtud lahutuvusega 3 Å, võimaldas kindlaks teha kõik subühikute vahelised kontaktid (Ben-Shem jt., 2011). Kirjeldati 5 eukarüoodi spetsiifilist silda, mille hulgas on ka eB12 sild. Selle silla üheks komponendiks on rpL19 valgu C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks, mis moodustab kontakte valkudega rpL7 ja rpL17 ning 18S rRNA lisasegmendiga ES6S (Ben-Shem jt., 2011). Käesoleva töö põhieesmärgiks on uurida eB12 silla tähtsust ribosoomi funktsioneerimisele. Töö esimeses osas analüüsiti  $\Delta rpl19A$ ,  $\Delta rpl19B$  või  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  mutatsioone sisaldavate rakkude fenotüüpe. Saadud tulemused aitavad aru saada rpL19 valgu vähesuse või puuduse mõju pärmirakkudele. Teises osas uuriti, kuidas on rpL19 C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks seotud eB12 silda funktsionaalsusega. Selleks kasutati *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutante, kus puudusid eB12 silda moodustavad aminohappeid.

*S. cerevisiae* r-valkudest on 59 kodeeritud kahe paraloogilise geeni poolt (Wolfe ja Shields., 1997). 21 r-valgu puhul kodeerivad paraloogid identse aminohappe järjestustega valke, ülejäänutel erineb paraloogide poolt kodeeritud valkude järjestus ainult mõne aminohappe poolest (Steffen jt., 2012). On näidatud, et 47 r-valgu puhul põhjustab ühe paraloogi deletsioon aeglase kasvu fenotüüpi (Steffen jt., 2012). Nende geenide hulgas on ka paraloogid *RPL19A* ja *RPL19B*. *RPL19B* geeni deletsioon omab suuremat mõju rakkude kasvule kui *RPL19A* geeni deletsioon. Ta põhjustab generatsiooniaja pikenemist 1,4-1,5 korda võrreldes metsiktüübiga (Andrijako, 2013; Steffen jt., 2012). Käesolevas uurimuses läbi viidud fenotüübiline analüüs erinevatel söötmetel ja temperatuuridel näitas samuti  $\Delta rpl19B$  rakkude suuremat kasvudefektid ning külmatundlikkust võrreldes  $\Delta rpl19A$  (joonis 12). Erinevused mutantide  $\Delta rpl19A$  ja  $\Delta rpl19B$  fenotüübis võivad olla seotud nende geenide erineva transkriptsioonitasemega. On teada, et r-valke kodeerivate paraloogsete geenide transkriptsioonitasemed võivad olla erinevad. Näiteks, *RPL11A* geeni transkriptsioonitase on kaks korda kõrgem võrreldes *RPL11B* geeniga (Rotenberg jt., 1988). Nende paraloogide poolt kodeeritud valkude järjestused on aga identsed. 60S subühiku valku rpL15 kodeerivatest geenidest on üks paraloog, *RPL15A*, funktsionaalne ning paraloog *RPL15B* on transkriptsiooniliselt inaktiivne (Simoff jt., 2009).

$\Delta rpl19A$  ja  $\Delta rpl19B$  mutantide ribosoomide profiilide analüüsil selgus, et mõlemas mutandis kogunevad vabad 40S subühikud. Mutandi  $\Delta rpl19B$  ribosoomide profiil näitab temperatuuri alanemisega tetrasoomide kadumist polüsoomide fraktsioonist ning suuremat vabade 40S subühikute piiki (joonis 13). Arvatavasti põhjustab ühe paraloogilise geeni deleteerimine

rpL19 valgu koguse vähenemist rakkudes. See avaldub selgemini *Δrpl19B* mutandis. Samas, rpL19 valgu vaesus ei mõjuta oluliselt 60S subühikute küpsemist. On võimalik, et rakkudes tekib mittefunktsionaalsete 60S partiklite populatsioon, mille koostises puudub rpL19 valk. Sarnane protsess toimub näiteks *Δrpl1B* deletsiooni puhul. rpL1 valgu hulga vähenemine rakkudes põhjustab küpsete 60S subühikute teket, millest puudub rpL1 valk. Sellised 60S subühikud saavad assotsieeruda 40S subühikutega ning moodustada mittefunktsionaalseid 80S ribosome (McIntosh jt., 2011). Selliste ribosoomide 60S subühikud suunatakse degradeerimisele aktiveeruva mittefunktsionaalse ribosoomi RNA degradatsiooni (25S NRD, ingl. *nonfunctional rRNA decay*) raja poolt (Fujii jt., 2012; LaRiviere jt., 2006). 25S NRD süsteemi aktiveerivad 25S rRNA mutatsioonid, mille tõttu kaotavad 80S ribosoomi partiklid oma funktsionaalsuse. Need mutatsioonid ei mõjuta ribosoomi biogeneesi, kuna mutantse rRNA sekundaarstruktuur on sarnane metsiktüüpi rRNA struktuurile. Mittefunktsionaalse 80S ribosoomis ubikvitineeritakse 60S ribosoomi valgud E3 ubikvitiin ligaasi poolt ning seejärel 80S partiklid dissotsieeritakse Cdc48 kompleksi poolt. Mittefunktsionaalsed 60S subühikud degradeeritakse proteasoomi ja RNAaside poolt. Täiesti funktsionaalne vaba 40S subühik jääb tsütoplasmasse, kuna seda on energeetiliselt otstarbekas taaskasutada järgnevas translatsiooni initsiatsioonis (Fujii jt., 2012)

Galaktoosi promootori kontrolli all oleva *RPL19A* geeni transkriptsiooni seiskamisel avaldub pärmirakkudes rpL19 valgu puudus. Sellist nn „*shut-off*“ tüve kasutati 60S subühiku biogeneesi uurimisel (Pöll jt., 2009). RNA radioaktiivne märgistamine näitas, et rpL19 valgu puudumisel akumulerevad rakutuumas 27S pre-rRNA molekulid juba esimesel tunnil pärast transkriptsiooni seiskamist (Pöll jt., 2009). Radioaktiivselt märgistatud 25S rRNA molekulid tsütoplasmas ja tuumas puuduvad (Pöll jt., 2009). *Nothern blot* analüüsil 8 tundi pärast transkriptsiooni seiskamist selgus, et rpL19 valgu puudumisel on häiritud 27SB pre-rRNA lõikamine 7S ja 25,5S pre-rRNA-deks. 18S rRNA protsessing toimub sarnaselt metsiktüübi rakkudega (Pöll jt., 2009). „*Shut-off*“ tüve ribosoomide profiilide analüüs näitas vabade 40S subühikute kogunemist 12, 18 ja 24 tundil pärast transkriptsiooni seiskamist. Polüsoomide kadumine viitab sellele, et rakkudes on häiritud translatsioon. 24 tundi pärast transkriptsiooni seiskamist akumulerevad defektsed subühikud, mis arvatavasti sisaldavad 27SB pre-rRNA molekule.

R-valke kodeerivate geenide deletsioon võib põhjustada häireid ribosoomide biogeneesis. Juhtumitel, kui rakkudes väheneb 60S subühiku hulk või kui 60S subühikud ei ole võimeliselt efektiivselt moodustama 80S ribosoomipartikleid, kogunevad nn „*half-mer*“ ribosoomid. Need on oma struktuurilt polüsoomid, kus mRNA-ga on lisaks 80S ribosoomidele seotud 43S

preinitsiatsiooni kompleks (40S subühik ja translatsiooni initsiatsiooni faktorid) (Helser jt., 1981). Näiteks kirjeldati „half-mer“ ribosoomide teke *Δrpl11A* ja *Δrpl4A* mutantide puhul (McIntosh jt., 2011; Rotenberg jt., 1988). Nii *Δrpl19A* ja *Δrpl19B*, kui ka *Δrpl19AΔrpl19B* mutantide ribosoomide profiilide analüüs ei näidanud „half-mer“ ribosoomide olemasolu (joonised 13 ja 16). Lisaks, *Δrpl19A* ja *Δrpl19B* mutantide ribosoomide profiilid on väga sarnased kuid nende kasvufenotüüp on erinev (joonised 12 ja 13). Eelnevalt on näidatud, et rakkude generatsiooniaeg ei peegelda ribosoomi biogeneesi seisundi. Näiteks, mutantide *Δrps27A* ja *Δrps27B* võrdlusel selgus, et metsiktüüpi tasemel kasvanud *Δrps27A* mutandil olid defektid ribosoomi biogeneesis (Baudin-Baillieu jt., 1997).

Saadud tulemused näitavad, et ühe paraloogilise geeni deletsiooniga kaasnev rpL19 valgu vähesus ei põhjusta nähtavat ribosoomi biogeneesi defekti ning selle valgu vähenenud populatsioon toetab 60S subühikute küpsemist. rpL19 valgu täielikul puudumisel ei toimu 27SB pre-rRNA protsessingut ning rakus hakkavad kogunema defektsed 60S subühikud.

Käesolevas töös analüüsitud rpL19 C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi deletsioonimutandid on defektsed subühikute vahelise eB12 silla moodustamisel. Mutantide ribosoomide profiilide analüüsil selgus vabade 60S subühikute kogunemine (joonis 18). Võib oletada, et mutantse valgu lülitumine 60S subühiku koosseisu võib põhjustada vähenenud funktsionaalsusega ribosoomipartiklite moodustumise. Sellistel ribosoomipartiklitel on probleemid kas subühikute vaheliste kontaktide hoidmises, mis on seotud kontaktide kadumisega sillal eB12, või väheneb 80S partiklite translatsiooniefektiivsus.

Uurimistöös saadud tulemuste põhjal saab mutante jagada kahte rühma. Esimesse rühma kuulub *rpl19A-183*, kellel on deleteeritud ainult rpS7 valguga interakteeruv heeliksi osa. Teises rühmas on mutandid *rpl19A-154* ja *rpl19A-146*, kellel puuduvad interaktsioonid valkudega rpS17 ja rpS7 ning 18S rRNA lisasegmenidiga ES6S. Mutant *rpl19A-183* kasvab sarnaselt metsiktüüpi rakkudega. Antud mutatsioon ei avalda olulist mõju üldistele transkriptsiooni ja translatsiooni tasemetele. Saadud tulemused näitavad, et ainult rpS7 valguga interakteeruva osa kadumine (oluline ainult ribosoomi B konformatsioonis) on minimaalse mõjuga ribosoomide funktsionaalsusele.

Mutante *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* iseloomustab aeglase kasvu fenotüüp. Lisaks tekkib neil külmatundlikkus 16°C, 20°C ja 25°C juures kasvades. Mõlemas mutandis toimub üldise translatsioonitaseme langus (joonis 19). Mutandis *rpl19A-154* ei ole muutunud üldine transkriptsioonitase võrreldes kontrolltüvega. Seega põhjustab translatsioonitaseme languse eelkõige ribosoomide vähenenud funktsionaalsus. Mutandis *rpl19A-146* võib üldine

translatsioonilangus olla põhjustatud ka osaliselt transkriptsioonitaseme langusest, mis viitab rpL19 valgu teadmata lisafunktsioonile. R-valkude osalemist teistes rakulistes protsessides oli nähtud ka varem. Näiteks, rpL38 valk reguleerib hiirtes mõnede Hox mRNA-de translatsiooni spetsiifiliselt initsieerides nendel 80S kompleksi moodustumise (Kondrashov jt., 2011).

*rpl19A-146* mutandi translatsioonitäpsuse analüüsil määrati -1 PRF ja +1 PRF toimumise või UAA stoppkoodoni supressiooni sagedused kasutades *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside reportersüsteemi. Samuti mõõdeti *missense* koodoni supressiooni toimumise sagedust. -1 PRF toimumine sõltub sellest, kui edukalt saab aa-tRNA A-saidis libiseda piki mRNA (Rhodin ja Dinman, 2010). Kõikidel uuritud temperatuuridel näitab *rpl19A-146* mutant -1 PRF efektiivsuse alanemist, mis võib viidata kõrgele aa-tRNA afiinsusele A-saidi suhtes. +1 PRF toimumisel mängib rolli P-saidi peptidüül-tRNA libisemine piki mRNA. *rpl19A-146* mutandil tuvastati +1 PRF toimumise kasv, mida saab seletada alanenud peptidüül-tRNA afiinsusega P-saidi suhtes. Stoppkoodoni ja *missense* koodoni supressioonide toimumise sagedused on samuti *rpl19A-146* mutandis kõrgemad võrreldes kontrolltüvega. Neid efekte võib põhjustada eB12 silla funktsionaalsuse kadumine, mis kutsus esile defektid subühikute omavahelises rotatsioonis.

Kokkuvõtteks, võrreldes töö esimeses osas kasutatud mutantidega, on *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutatsioonidega pärmirakkudes rpL19 valku piisavas koguses. Samas, sisaldab selline rpL19 valk C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi deletsioone. Valkudega rpS17 ja rpS7 ning 18S rRNA lisasegmendiga ES6S interakteeruvate aminohapete puudumine põhjustab nii üldist translatsiooni- kui ka üldist transkriptsioonitaseme langust. Mutatsioonid rpL19 mõjutavad subühikute omavahelist rotatsiooni, mis peegeldub ribosoomide translatsioonitäpsuse muutumises. Selle hüpoteesi kontrollimiseks on vajalik läbi viia täpsemad ribosoomi rotatsiooni analüüsid. Lisaks saab oletada, et valgul rpL19 on ka teised, senini kindlaks tegemata funktsioonid.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti eukarüoodi spetsiifilise eB12 silla olulisust ribosoomide funktsionaalsuse seisukohast. Silla eB12 põhikomponendiks on rpL19, mis on kodeeritud paraloogiliste *RPL19A* ja *RPL19B* geenide poolt. Töö esimeses osas analüüsiti  $\Delta$ *rpL19A* ja  $\Delta$ *rpL19B* deletsioonide mõju rakkude fenotüübile. Temperatuuritundlikkuse analüüs näitas, et  $\Delta$ *rpL19A* mutantsed rakud kasvavad sarnaselt metsiktüüpi rakkudega.  $\Delta$ *rpL19B* mutandil avaldub YPD söötmel kasvundefekt temperatuuridel 30°C ja 25°C ning külmatundlikkus temperatuuridel 20°C ja 16°C. Polüsoomide profiilide analüüsil selgus, et nii  $\Delta$ *rpL19A* kui ka  $\Delta$ *rpL19B* mutantide rakulüsaadis kogunevad vabad 40S subühikud. On võimalik, et ühe paraloogilise geeni deletsioon põhjustab rakkudes rpL19 valgu hulga vähenemist, mille tagajärjel tekivad mittefunktsionaalsed, rpL19 mittesisaldavad 60S subühikud. Sellised mittefunktsionaalsed 60S subühikud võidakse rakkudes degradeerida aktiveeruva mittefunktsionaalse ribosoomi RNA degradatsiooni (NRD) raja poolt.

$\Delta$ *rpL19A $\Delta$ *rpL19B* mutatsioon põhjustab rakkudes sünteetilist letaalsust. Seda saab komplementeerida *RPL19A* või *RPL19B* geene ekspresseeriva plasmiidiga. Töös näidati, et *pRS316-RPL19A*, *pRS316-RPL19B* ja *pRS315-RPL19A* plasmiidid komplementeerivad edukalt  $\Delta$ *rpL19A $\Delta$ *rpL19B* sünteetilist letaalsust YPD, Sc ja Sm söötmel ning temperatuuridel 16°C, 20°C, 25°C, 30°C ja 36°C.**

Selleks, et uurida rpL19 valgu puudumise mõju ribosoomide profiilile, kasutati nn. „shut-off“ tüve. Selles tüves on  $\Delta$ *rpL19A $\Delta$ *rpL19B* sünteetiline letaalsus komplementeeritud *GALI,10* promootorilt transkribeeritud *RPL19A* geeni poolt. Transkriptsioon *GALI,10* promootorilt on aktiveeritud galaktoosiga ning represseritud glükoosiga. Selliste pärmirakkude kasvatamisel glükoosi sisaldavas söötmes toimub transkriptsiooni seiskamine ning pärmirakkudes tekib rpL19 puudus. Ribosoomide profiilide analüüsi tulemused näitasid, et 24 tunnil pärast transkriptsiooni peatamist kogunevad rakkudes vabad 40S subühikud ja tekivad defektsed 60S subühikud. Saab oletada, et need defektsed 60S partiklid sisaldavad 27SB pre-rRNA molekule.*

Uurimaks eB12 silla olulisust ribosoomi funktsionaalsuse seisukohalt, kasutati rpL19 valgu deletsioonimutante, millistes puuduvad eB12 silda moodustavad aminohapped. *rpL19A-183* mutandil puudub C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi 6 viimast aminohapet, mis interakteeruvad valguga rpS7. See deletsioon ei mõjuta pärmirakkude elujõulisust ja ribosoomide funktsionaalsust.

Mutantidel *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* puuduvad kõik eB12 silda moodustavad aminohapped. Nendes mutantides ei moodustu interaktsioonid valkudega rpS7 ja rpS17 ning 18S rRNA lisasegmendiga ES6S. Katsetulemused näitasid mutandil *rpl19A-154* olulist üldise translatsioonitaseme langust, mida põhjustab selle deletsiooni mõju ribosoomi funktsioneerimisele. Samas, selle tüve rakkude üldine transkriptsioonitase ei erinenud oluliselt kontrolltüvest. Mutatsiooniga *rpl19A-146* rakkudes on nii üldine translatsiooni- kui ka üldine transkriptsioonitase oluliselt alanenud, mis võib viidata rpL19 valgu teisele funktsioonile pärmirakus. Ribosoomide translatsioonitäpsuse analüüs näitas, et *rpl19A-146* mutatsiooniga rakkudes on muutunud -1 PRF, +1 PRF, stoppkoodoni ja *missense* koodoni suppressioonide toimumise sagedused võrreldes kontrolltüve rakkudega. Neid muutusi võivad põhjustada subühikute omavahelise rotatsiooni defektid.

## SUMMARY

### Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome intersubunit bridge eB12

Ivan Kisly

The ribosome is the largest cellular molecular complex composed of rRNA molecules and ribosomal proteins. Ribosome consists of two subunits: the small ribosomal subunit (40S), and the large ribosomal subunit (60S).

It has been shown that the functionality of 80S ribosome depends on the 40S and 60S subunits rotation relative to each other. This process provides translocation of the tRNA across the ribosome and consequently is essential for protein translation. The 17 intersubunit bridges have the main role in regulating the rotation. 12 of them are conserved among the species and contain 3 types of interactions: rRNA-rRNA, protein-rRNA and protein-protein. These bridges locate close to the ribosomal functional centres and coordinate their activity. The rest of the identified intersubunit bridges are eukaryote-specific. They are protein-rRNA or protein-protein type interactions, which are made by eukaryote-specific rRNA expansion segments and eukaryote-specific protein domains. Yeast 80S ribosome is approximately 40% larger than the prokaryotic 70S ribosome. Thereby the function of these bridges is to stabilise the increased 80S structure.

The eukaryote-specific bridge eB12 is formed between the C-terminal  $\alpha$ -helix of rpL19 and rpS7, rpS17, 18S rRNA expansion segment ES6S. Protein rpL19 is coded by paralogous genes *RPL19A* and *RPL19B*. Whereas the deletion of *RL19A* gene has no significant effect on yeast growth, the deletion of *RPL19B* gene causes increased generation time. Cells lacking both *RPL19A* and *RPL19B* genes show the synthetic lethality.

The literature review of the present study gives an overview about the structure and components of the yeast 80S ribosome. All ribosomal intersubunit bridges are described in detail. In addition, structure of the protein rpL19 and mutations in C-terminal  $\alpha$ -helix of rpL19 are presented.

The first aim of the experimental part was the phenotypic characterization of  $\Delta$ *rpl19A* and  $\Delta$ *rpl19B* mutants. Cells carrying the  $\Delta$ *rpl19A* mutation have no obvious difference in growth

when compared with wild type cells. The analysis of the *Δrpl19B* growth on YPD media shows growth defects at 30°C and 25°C and cold sensitivity at 20°C and 16°C. Analysis of the polysome profiles revealed an accumulation of 40S subunits in cell lysates of both mutants. This defect can be caused by the deficiency of rpL19 due to the deletion of one paralogous genes. The deficiency of rpL19 gives rise to population of non-functional 60S subunits lacking rpL19 protein, which are detected and eliminated by quality-control mechanism called non-functional rRNA decay (NRD).

The synthetic lethality of the *Δrpl19AΔrpl19B* mutant can be rescued with the plasmid expressing *RPL19A* or *RPL19B* genes. The present study shows, that plasmids *pRS316-RPL19A*, *pRS316-RPL19B* and *pRS315-RPL19A* are all able to complement the synthetic lethality on YPD, Sc and Sm media and at temperatures 16°C, 20°C, 25°C, 30°C and 36°C.

The second aim of this study was to analyse the influence of the rpL19 protein absence on the polysome profiles. For this purpose synthetic lethality of the *Δrpl19AΔrpl19B* mutant was complemented by the plasmid encoding *RPL19A* gene under the control of the *GAL1,10* promoter. This promoter is widely used in yeast molecular biology and it can be activated by galactose and repressed by glucose. Analysis of the ribosome profiles revealed accumulation of 40S subunits and defective 60S subunits 24 hours after the repression of the *RPL19A* gene transcription. It can be speculated that the defective 60S subunits contain the 27SB pre-rRNA because of the rRNA processing defects in these cells.

The third aim was to analyse the importance of the bridge eB12 in the light of the ribosome functionality. For this purpose several rpL19 mutants lacking the C-terminal amino acids needed for the eB12 formation were used. Mutant *rpl19A-183* lacks the 6 aa in C-terminal  $\alpha$ -helix of rpL19 protein, which disrupts the interaction with protein rpS7. The results indicate that this deletion has no considerable influence on ribosomal functionality and yeast cell vitality. Mutants *rpl19-154* and *rpl19A-146* contain deletion of all amino acids needed for the formation of eB12 bridge. Mutant *rpl19-154* shows reduction in general level of translation, which can be caused by reduced ribosome functionality. However there is no significant influence of this mutation on the general level of transcription. Interestingly, mutant *rpl19A-146* shows significant reduction in both general levels of translation and transcription, which probably indicates involvement of the protein rpL19 in other cellular processes. Analysis of translational fidelity of *rpl19A-146* mutant revealed remarkable changes in rates of -1PRF and +1PRF and inability of these mutant ribosomes to properly identify stop- and missense codons. The observed effects can be caused by the impaired subunit joining and rotation defects.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Andrijako, A. (2013). Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 komponendi L19e mutantide iseloomustamine. Tartu Ülikool, bakalaureusetöö.
2. Anger, A.M., Armache, J-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature*, 497: 80-87.
3. Armache, J-P., Anger, A.M., Marquez, V., Franckenberg, S., Fröhlich, Th., Villa, E., Berninghausen, O., Thomm, M., Arnold, G.J., Beckmann, R., Wilson, D.N. (2013). Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: implications for eukaryotic ribosome evolution. *Nucleic acids research*, 41(2): 1284-1293.
4. Baudin-Baillieu, A., Tollervey, D., Cullin, Ch., Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Molecular and cellular biology*, 17(9): 5023-5032.
5. Ben-Shem, A., de Loubresse, N.G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334: 1524-1529.
6. Chan, Y-L., Lin, A., McNally, J., Peleg, d., Meyuhas, O., Wool, I.g. (1987). The primary structure of rat ribosomal protein L19. *The journal of biological chemistry*, 262(3): 1111-1115.
7. Cherry, J.M., Ball, C., Weng, Sh, Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K., Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 387(6632): 67-73.
8. Delaney, J.R., Murakami, Ch.J., Olsen, B., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M. (2011). Quantitative evidence for early life fitness defects from 32 longevity-associated alleles in yeast. *Cell cycle*, 10(1): 156-165.
9. DeLey, J. (1964). Sedimentation coefficients of yeast ribosomes. *Journal of general microbiology*, 37:153-156.
10. Demeshkina N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M., Yusupova, G. (2012). A new understanding of the decoding principle on the ribosome. *Nature*, 484: 256-259.
11. Dresios, J., Panopoulos, P., Synetos, D. (2006). Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Molecular microbiology*, 59(6): 1651-1663.

12. Dunkle, J.A., Wang, L., Feldman, M.B., Pulk, A., Chen, V.B., Kapral, G.J., Noeske, J., Richardson, J.S., Blanchard, S.C., Cate, J.H.D. (2011). Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science*, 332(6032): 981-984.
13. Foiani, M., Cigan, A.M., Paddon, Ch.J., Harashima, S., Hinnebusch, A.G. (1991). GCD2, a translational repressor of the *GCN4* gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 11(6). 3203-3216.
14. Frank, J., Agrawal, R.K., Verschoor, A. (2001). Ribosome structure and shape. John Wiley & Sons, Ltd, Encyclopedia of life sciences.
15. Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Ohno, M. (2012). 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in non-functional 25S rRNA decay. *The EMBO journal*, 31: 2579-2589.
16. Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chapman, M.S., Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 113:789-801.
17. Giaver, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K-D., Flahery, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramolli, D., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, Lucy., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C-Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 6896: 387-391.
18. Harger, J.W., Dinman, J.D. (2003). An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 9: 1019-1024.
19. Helser, T.L., Baan, R.A., Dahlberg, A.E. (1981). Characterization of a 40S ribosomal subunit complex in polyribosomes of *Saccharomyces cerevisiae* treated with cycloheximide. *Molecular and cellular biology*, 1(1): 51-57.

20. Horan, L.H., Noller, H.F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of science*, 104(12): 4881-4885.
21. Jacobs, J.L., Dinman, J.D. (2004). Systematic analysis of bicistronic reporter assay data. *Nucleic acids research*, 32: 160-170.
22. Jenner L.B., Demeshkina N., Yusupova, G., Yusupov, M. (2010). Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 17(5): 555-561.
23. Jenner, L., Melnikov, S., de Loubresse, N.G., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current opinion in structural biology*, 22:1-9.
24. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR based strategy: mote tags and improved practical routines. *Yeast*, 15: 963-972.
25. Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, Sh., Ishijima, J., Shiroishi, T., Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*, 145: 383-397.
26. LaRiviere, F.J., Cole, S.E., Ferullo, D.J., Moore, M.J. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Molecular cell*, 24: 619-626.
27. Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J-c., Moras, d., Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic acids research*, 30(24): 5382-5390.
28. Marintchev, A., Edmonds, K.A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, Ch., Herdy, B., Sonenberg, H., Wagner, G. (2009). Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell*, 136(3): 447-460.
29. McIntosh, K.B., Bhattacharya, A., Willis, I.M., Warner, J.R. (2011). Eukaryotic cells producing ribosomes deficient in R11 are hypersensitive to defects in the ubiquitin-proteasome system. *PlosOne*, 6(8): e23579.
30. Melnikov, S., Ben-Shem, A., de Loubresse, N.G., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2012). One core, two cells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19: 560-567.
31. Mortimer R.K., Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Cenetics*, 113: 35-43.

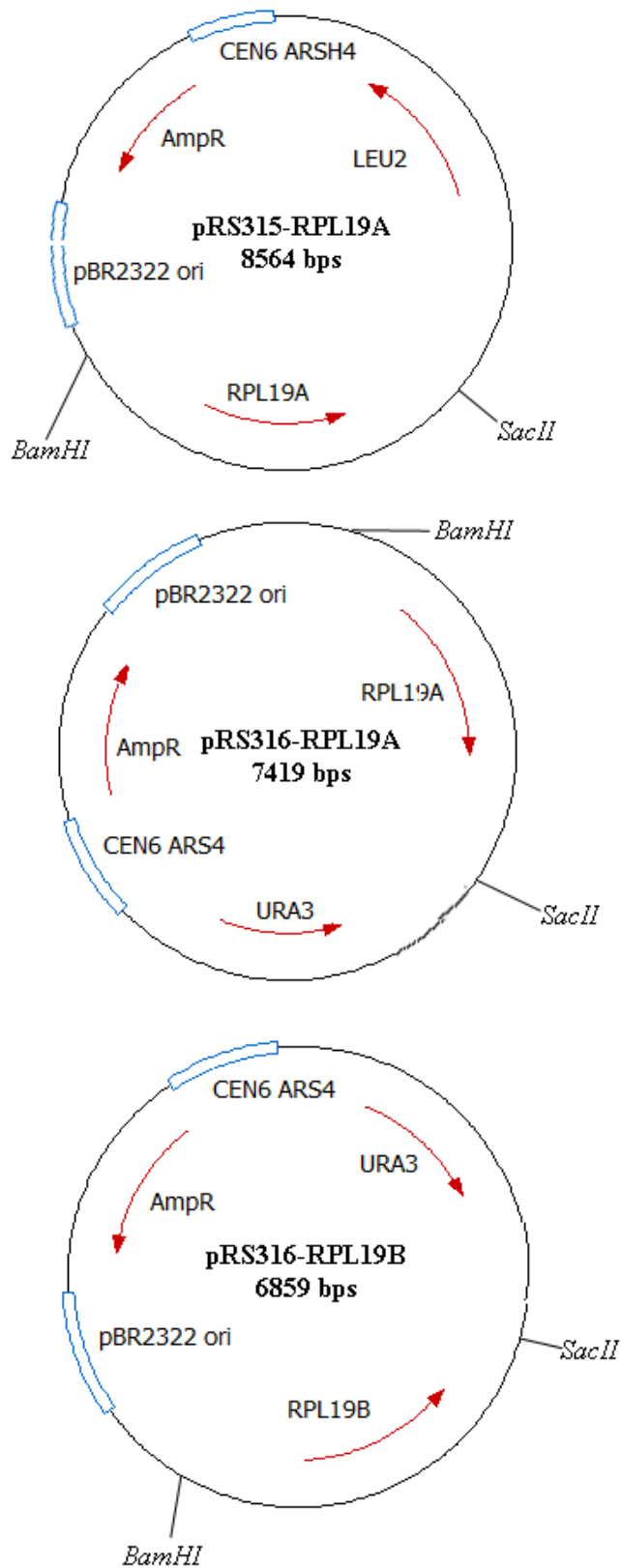
32. Nierhaus K.N. (1990). The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry*, 29(1): 4999-5008.
33. Plant, E.P., Nguyen, P., Russ, J.R., Pittman, Y.R., Nguyen, T., Quesinberry, J., Kinzy, T.G., Dinman, J.D. (2007). Differentiating between near- and non- cognate codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PlosOne*, 6:e517.
34. Pöll. G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford, J.L., Tschochner, H., Milkereit, P. (2009). rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PlosOne*, 4(12): e8249.
35. Ratje, A.H., Loerke1, J., Mikolajka, A., Brünner, M., Hildebrand, P.W., Starosta, A.L., Dönhöfer, A., Connell, S.R., Fucini, P., Mielke, Th., Whitford, P.C., Onuchic, J.N., Yu, Y., Sanbonmatsu, K.Y., Hartmann, R.K., Penczek, P.A., Wilson, D.N., Spahn, Ch.M.T. (2010). Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature*, 468: 713-718.
36. Rhodin, M.H.J., Dinman, J.D. (2010). A flexible loop on yeast ribosomal protein L11 coordinates p-site tRNA binding. *Nucleic acids research*, 38(22): 8377-8389.
37. Rotenberg, M.O., Moritz, M., Woolford, J.L. (1987). Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. *Genes & development*, 2: 160-172.
38. Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., Cate, J.H.D. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310: 827-834.
39. Sikorski, R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122: 19-27.
40. Simoff, I., Moradi, H., Nygard, O. (2009). Functional characterization of ribosomal protein L15 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 55: 111-125.
41. Simonović, M., Steitz, Th.A. (2009). A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochimica et biophysica acta*, 1789(9-10): 6412-623.
42. Smith, T.F., Lee, J.C., Gutell, R.R., Hartman, H. (2008). The origin and evolution of the ribosome. *BioMed central*, 3:16.
43. Song, J.M., Cheung, E., Rabinowitz, J.C. (1996). Organization and characterization of the two yeast ribosomal protein YL19 genes. *Current Genetics*, 30: 273-278.

44. Spahn, Ch.M.T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* - tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*, 107: 373-386.
45. Steffen, K.K., McCormick, M.A., Pham, K.M., MacKay, V.L., Delaney, J.r., Murakami, Ch.J., Kaeberlein, M., Kennedy, b.K. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191: 107-118.
46. Thiébeauld, O., Schepetilnikov, M., Park, H-S., Geldreich, A., Kobayashi, K., Keller, M., Hohn, T., Ryabova, L.A. (2009). A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *EMBO*, 28(20): 3171-3184.
47. Watson, J.D. (1963). Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science*, 140(3562): 17-26.
48. Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., Bakkoury, M.E., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaver, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, d.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Davis, R.W. (1999). Functional characterization of the *S.cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 901-906.
49. Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387: 708-713.
50. Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest., T, N., Cate, J.H.D., Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 resolution. *Science*, 292: 883-896.
51. Yusupova, G.Zh., Yusupov, M.M., Cate, J.H.D., Noller, H.F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, 106: 233-241.

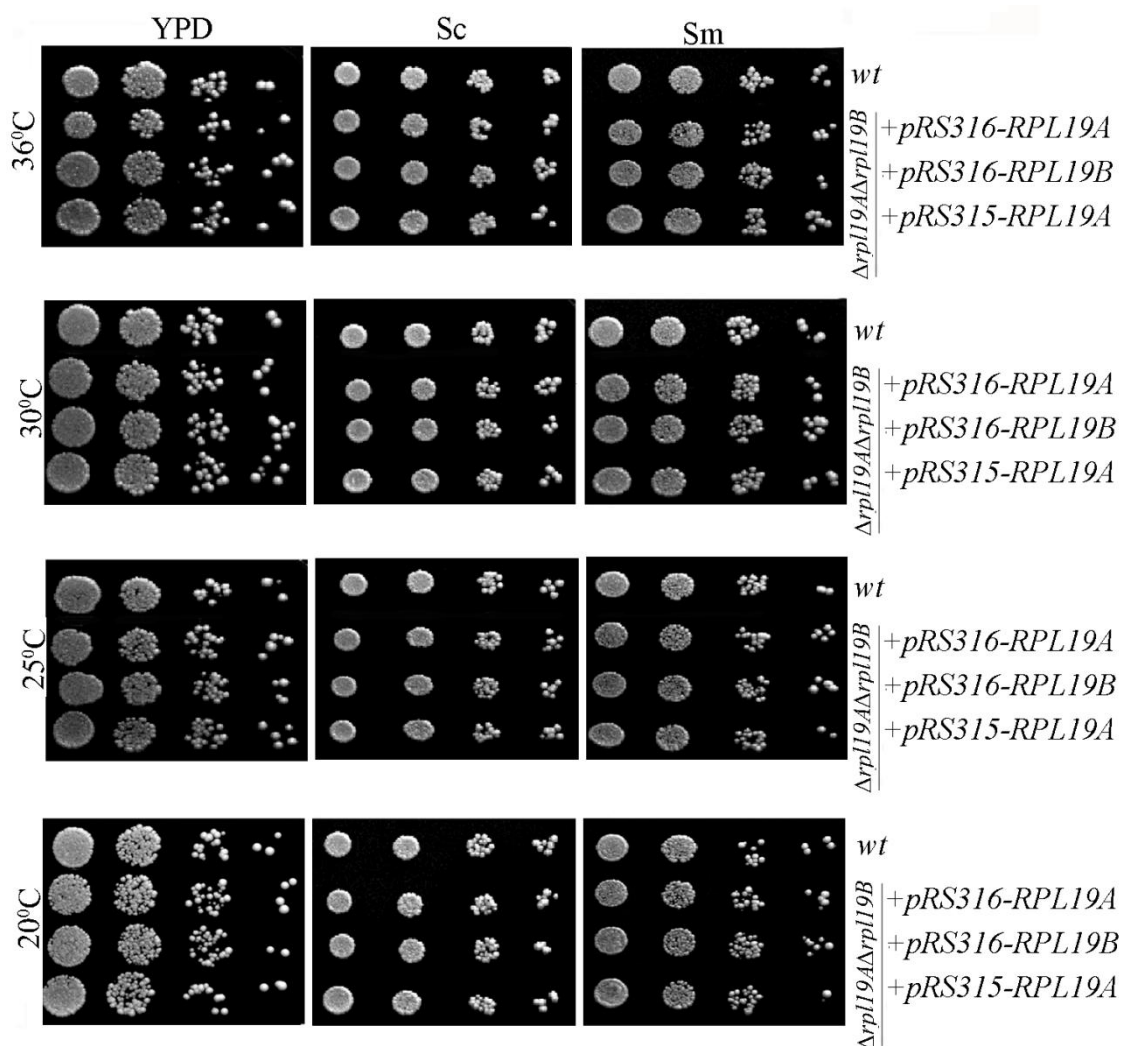
# LISAD

## LISA 1.

pRS315-RPL19A, pRS316-RPL19A ja pRS316-RPL19B plasmiidide skeemid.

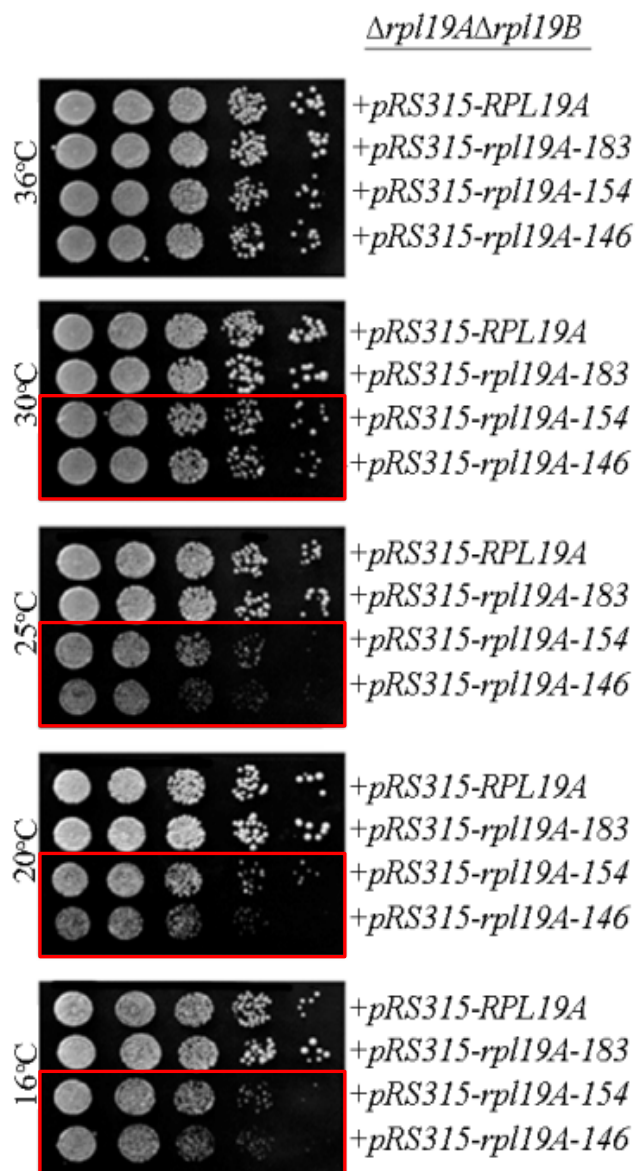


## LISA 2.



***Arpl19A**Arpl19B* kaksikmutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil.** Vasakul on näidatud analüüsitud temperatuurid. Üleval on toodud kasutatud söötmed: YPD, rikas sööde; Sc, sünteetiline täissööde; Sm, sünteetiline miinimumsööde. Paremal on näidatud uuritud tüved: *wt*, metsiktüüp (TYSC138) ning  $\Delta rpl19A\Delta rpl19B$  mutandid, kus sünteetiline letaalsus on komplementeeritud *pRS316-RPL19A* plasmiidiga (TYSC232), *pRS316-RPL19B* plasmiidiga (TYSC242) või plasmiidiga *pRS315-RPL19A* (TYSC248).

### LISA 3.



*rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutantide temperatuuritundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil YPD söötmel. Vasakul on näidatud analüüsitud temperatuurid. Paremalt on näidatud katses kasutatud tüved, kelle *Δrpl19AΔrpl19B* sünteetilist letaalsust komplementeeriti plasmiididega *pRS315-RPL19A* (TYSC248), *pRS315-rpl19A-183* (TYSC262), *pRS315-rpl19A-154* (TYSC257) või *pRS315-rpl19A-146* (TYSC288). Joonise tegemisel on kasutatud T. Tamm poolt saadud andmeid.

## LISA 4.

A. Kontrolltüve, *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutantide generatsiooniajad Sm söötmes 30°C juures (määratud T. Tamm poolt).

Pärmitüvi	Generatsiooniaeg (t)
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-RPL19A]</i> (TYSC248)	2,99
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-183]</i> (TYSC262)	3,08
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-154]</i> (TYSC257)	3,38
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-146]</i> (TYSC288)	3,39

B. Kontrolltüve, *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutantide üldise translatsioonitaseme analüüsil saadud andmed.

Pärmitüvi	Sirge tõus (sõltuvalt kultuuri kasvamise ajast)	Arvutatud sirge tõus (teisendatud rakkude arvu järgi)	Suhe kontrolltüve <i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-RPL19A]</i> suhtes
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-RPL19A]</i> (TYSC248)	0,2632±0,0091	-	1±0,035
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-183]</i> (TYSC262)	0,2269±0,0116	0,2337±0,0122	0,888±0,046
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-154]</i> (TYSC257)	0,1787±0,0029	0,2020±0,0033	0,767±0,012
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-146]</i> (TYSC288)	0,1832±0,0081	0,2080±0,0092	0,790±0,035

C. Kontrolltüve, *rpl19A-183*, *rpl19A-154* ja *rpl19A-146* mutantide üldise transkriptionitaseme analüüsil saadud andmed.

Pärmitüvi	Sirge tõus (sõltuvalt kultuuri kasvamise ajast)	Arvutatud sirge tõus (teisendatud rakkude arvu järgi)	Suhe kontrolltüve <i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-RPL19A]</i> suhtes
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-RPL19A]</i> (TYSC248)	0,3843±0,0024	-	1±0,0063
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-183]</i> (TYSC262)	0,4103±0,0107	0,4227±0,0106	1,100±0,027
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-154]</i> (TYSC257)	0,3023±0,0124	0,3417±0,0140	0,889±0,036
<i>Δrpl19AΔrpl19B+[pRS315-rpl19A-146]</i> (TYSC288)	0,2242±0,0056	0,2542±0,0064	0,661±0,017

## LISA 5.

### Ribosoomi translatsioonitäpsuse määramise katse valim.

T (°C)	Pärmitüvi	Raaminihke signaal või koodoni mutatsioon	Sõltumatute katsete arv	Proovide arv kokku	Välja jäetud proovide arv	Statistilisel analüüsil kasutatud proovide arv
30	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[pRS315- RPL19A] (TYSC248)	-1 PRF	2	9	2	7
		+1 PRF	3	13	2	11
		Stoppkoodon (UAA)	6	24	5	19
		<i>Missense</i> koodon	4	20	4	16
	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[pRS315- rpl19A-146] (TYSC288)	-1 PRF	2	10	1	9
		+1 PRF	2	11	4	7
		Stoppkoodon (UAA)	2	9	2	7
		<i>Missense</i> koodon	5	17	3	14
25	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[pRS315- RPL19A] (TYSC248)	-1 PRF	3	10	2	8
		+1 PRF	3	10	0	10
		Stoppkoodon (UAA)	2	10	1	9
		<i>Missense</i> koodon	3	10	2	8
	<i>Δrpl19AΔrpl19B</i> +[pRS315- rpl19A-146] (TYSC288)	-1 PRF	3	9	2	7
		+1 PRF	2	7	2	5
		Stoppkoodon (UAA)	2	9	1	8
		<i>Missense</i> koodon	2	10	1	9

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Ivan Kisly

(sünnikuupäev: 31.05.1989)

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

*Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi subühikute vahelise silla eB12 funktsionaalne analüüs,

mille juhendaja on PhD Tiina Tamm ja PhD Jaanus Remme

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2014