

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Ribosoomi alaiühikutevaheliste eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll  
IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioonil *S.cerevisiae* näitel**

Magistritöö

30 EAP

Jekaterina Nebogatova

Juhendaja: vanemteadur Tiina Tamm

TARTU 2017

## Infoleht

### **Ribosoomi alaühikutevaheliste eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioonil *S.cerevisiae* näitel**

Valgu biosüntees ehk translatsioon on keeruline protsess, mis on tähtis rakkude elutegevuse osa. Seda protsessi teostavad ribosoomid. Ribosoomide struktuuri ja funktsiooni uuritakse juba ammu, aga paljudele küsimustele ei ole veel vastust leitud. Selles töös uuritakse kuidas ribosoomi alaühikutevahelised eukarüoodi spetsiifilised sillad eB12, eB13 ja eB14 mõjutavad IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*.

Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*; ribosoom; eukarüoodi spetsiifilised sillad; translatsiooni initsiatsioon.

CERCS kood: P320; Nukleinhappesüntees, proteiinisüntees.

### **The role of eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 in IRES dependent translation initiation in *S.cerevisiae***

Protein biosynthesis or translation is a complicated process, which is an important part of cell life cycle. Ribosomes catalyze translation process. Structure and function of ribosomes are studied for years, but there are still a lot of unanswered questions. In this work the influence of eukaryote specific bridges eB12, eB13 and eB14 on IRES-dependent translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* was investigated.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; ribosome; eukaryote specific bridges; translation initiation.

CERCS code: P320; Nucleic acids, protein synthesis

## Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord .....	3
Kasutatud lühendid.....	6
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1. Ribosoomi ehitus.....	8
1.1.1. Alaühikutevahelised sillad .....	10
1.1.2. Konserveerunud sillad .....	11
1.1.2.1. Valk-valk tüüpi konserveerunud sild.....	11
1.1.2.2. rRNA-rRNA tüüpi konserveerunud sillad.....	12
1.1.2.3. Valk-rRNA tüüpi konserveerunud sillad.....	13
1.1.2.4. Segatüüpi konserveerunud sillad.....	13
1.1.3. Eukarüoodi spetsiifilised sillad .....	14
1.1.3.1. Eukarüoodi spetsiifiline sild eB12 .....	15
1.1.3.2. Eukarüoodi spetsiifiline sild eB13 .....	16
1.1.3.3. Eukarüoodi spetsiifiline sild eB14 .....	18
1.2. Translatsioon .....	19
1.2.1. Translatsiooni üldiseloomustus.....	19
1.2.2. Eukarüootse raku kanooniline translatsiooni initsiatsioon.....	20
1.2.3. 7-metüülguanosiinmütsi-sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni mehhanism .....	22
1.2.4. Viiruselised IRES elemendid .....	22
1.2.5. Eukarüootsed IRES elemendid.....	25
1.2.5.1. <i>URE2</i> .....	25
2. Eksperimentaalosa.....	29

2.1.	Töö eesmärgid .....	29
2.2.	Materjal ja metoodika .....	29
2.2.1.	Kasutatud tüved, plasmiidid, praimerid ja rakkude kasvutingimused .....	29
2.2.2.	eIF2A deletsioonimutantide valmistamine .....	31
2.2.3.	eL24 mutantide valmistamine .....	32
2.2.4.	IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades bitsistronset reportersüsteemi .....	32
2.2.5.	Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades $\beta$ -galaktosidaasi reportersüsteemil põhineva meetodi.....	34
2.2.6.	Mutantide stressitaluvuse analüüs tilk-külv meetodil .....	36
2.3.	Tulemused .....	37
2.3.1.	Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades bitsistronset reportersüsteemi.....	37
2.3.2.	Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades $\beta$ -galaktosidaasi reportersüsteemi .....	39
2.3.2.1.	Ribosoomi alaühikutevahelise silla eB12 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil .....	40
2.3.2.2.	eL24 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil.....	41
2.3.2.3.	Ribosoomi alaühikutevahelise silla eB14 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil .....	43
2.3.2.4.	eB12 ja eB14 sildade mõju IRES sõltuvale translatsioonile .....	44
2.3.2.5.	Valgu eL24 mutantide ja silla eB14 puudumise mõju IRES sõltuvale translatsiooni initsiatsioonile.....	45
2.3.3.	Eukarüoodi spetsiifiliste sildade mutantide stressitaluvuse analüüs tilk-külv meetodil	46
2.4.	Arutelu.....	53
	Kokkuvõte .....	57
	Summary .....	58

Kirjanduse loetelu .....	60
LISAD .....	63
Lihtlitsents.....	66

## Kasutatud lühendid

7-MGM – 7-metüülguanosiinmüts, ingl k *7-Methylguanosine cap*

BUT – tert-butüül hüdroperoksiid

CrPV – ingl k *cricket paralysis virus*

CUM – kumeen hüdroperoksiid

dsRNA – ingl k *double strand RNA*

eGFP – ingl k *enhanced green fluorescent protein*

eIF – eukariootne translatsiooni initsiatsiooni faktor , ingl k *eukaryotic initiation factor*

eIF2A – eukariootne initsiatsiooni faktor 2A

EMCV – ingl k *encephalomyocarditis virus*

ES – lisasegment, ingl k *expansion segment*

FACS – ingl k *fluorescence-activated cell sorting*

FMDV – ingl k *foot-and-mouth disease virus*

GSH – glutatioon

HCV – hepatiit C viiruse

IF2 – initsiatsiooni faktor 2

IRES – ingl k *Internal Ribosome Entry Site*

ITAF – ingl k *IRES trans-acting factors*

MEN – menadioon

met-tRNA<sub>i</sub> – initsieeriv metüül tRNA

mRFP – ingl k *monomeric red fluorescent protein*

mRNA – informatsiooni-mRNA

ORF – avatud lugemisraam, ingl k *Open reading frame*

PIC – preinitsiiooni kompleks, ingl k *preinitiation complex*

PKI – ingl k *pseudoknot I*

RLU – ingl k *Relative light unit*

rRNA – ribosomaalne RNA

ssRNA – ingl k *single strand RNA*

TC – ternaarne kompleks

TOR – ingl k *target of rapamycin*

tRNA – transport RNA

WT – metsiktüüp

## Sissejuhatus

Translatsioon on valgu biosünteesi protsess, mille üldine mehhanism on konserveerunud arhedes, bakterites ja eukarüootides. Lisaks konserveerunud mehhanismile on kirjeldatud spetsiifilisi erinevusi elu domeenide vahel. Kõige rohkem lahknevusi translatsiooni toimimise mehhanismis on selle esimeses etapis – initsiatsioonil. Selleks, et määrata korrektne avatud lugemisraam (ORF, ingl k *Open reading frame*) on väga oluline leida ja alustada translatsiooni õigest startkoodonist. Eukarüoodil eristatakse translatsiooni initsiatsioonil kahte mehhanismi: mRNA 5'-otsa 7-metüülguanosiinmütsist (7-MGM, ingl k *7-Methylguanosine cap*) sõltuv ja 7-MGM sõltumatu. IRES (ingl k *Internal Ribosomal Entry Site*) on 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni mehhanism. Enamik tänaseks annoteeritud mRNA molekulidest, mis sisaldavad IRES elemente, kodeerivad valke, mis on olulised rakkude kasvus, diferentseerumises, apoptoosis, hüpoksia ja kuumašokki vastuses (Chatterjee ja Pal, 2009; Hellen *et al.*, 2001).

Translatsiooni katalüüsivad kahest alaühikust koosnevad ribosüümid ehk ribosoomid. Valkude biosünteesi toimumiseks on vajalik mõlema alaühiku dünaamiline koos püsimine. Ribosoomi alaühikuid hoiavad koos alaühikutevahelised sillad. Eristatakse konserveerunud ja elu domeeni spetsiifilisi alaühikutevahelisi sildasid. Eukarüootses pagaripärmi ribosoomis on kirjeldatud 17 alaühikutevahelist silda, millest 5 on eukarüoodi spetsiifilised (Ben-Shem *et al.*, 2010; Melnikov *et al.*, 2012).

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kuidas ribosoomi alaühikutevahelised eukarüoodi spetsiifilised sillad eB12, eB13 ja eB14 mõjutavad IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni ning oksüdatiivse stressiga toimetulekut *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi näitel.

# 1. Kirjanduse ülevaade

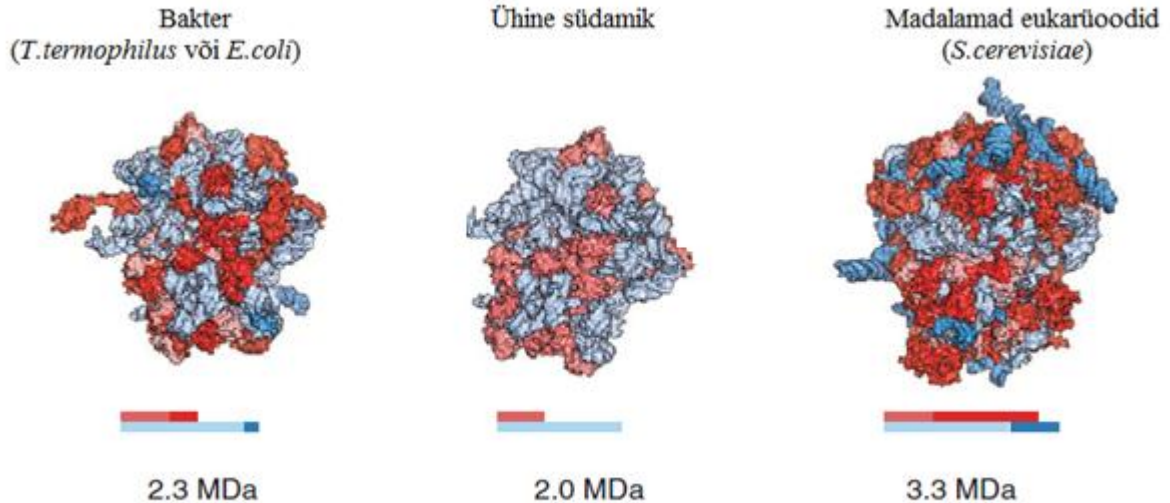
## 1.1. Ribosoomi ehitus.

Ribosoomid on kahest alaühikust koosnevad ribosüümid, mis katalüüsivad polüpeptiidahelate sünteesi ehk translatsiooni. Alaühikute koosseisu kuuluvad ribosomaalsed RNA (rRNA) molekulid ja ribosomaalsed valgud. Ribosoomide koostis varieerub erinevate elu domeenide vahel (tabel 1). Käesoleva töö raames antakse ülevaade bakterite (*Escherichia coli* näitel) ja madalamate eukarüootide (pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* näitel) ribosoomide ehitusest.

Pro- ja eukarüootide ribosoomidel on iseloomulik konserveerunud põhistruktuur, mille molekulmass on ~2.0 MDa. Konserveerunud põhistruktuuri koosseisu kuuluvad rRNA molekulid ja ribosomaalsed valgud. Konserveerunud südamik suure alaühiku koosseisu kuulub 19 valku, 5S ja 23S rRNA; väikese alaühiku koosseisu kuulub 15 valku ja 16S rRNA (joonis 1, tabel 1) (Ben-Shem *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012).

**Tabel 1.** Erinevate elu domeenide ja konserveerunud põhistruktuuri ribosoomi alaühikute koostis.

	Suur alaühik		Väike alaühik	
	rRNA	valgud	rRNA	valgud
Konserveerunud südamik (~2.0 MDa)	5S ja 23S	19	16S	15
Bakteriaalne ribosoom <i>E.coli</i> näitel (~2.3 MDa)	5S ja pikem 23S võrreldes konserveerunud südamikuga	33	pikem 16S võrreldes konserveerunud südamikuga	21
Madalamate eukarüootide ribosoom <i>S.cerevisiae</i> näitel (~3.3 MDa)	5S, 5.8S ja 25S	46	18S	33



**Joonis 1.** Ribosoomide põhistruktuur on konserveerunud elu domeenide vahel. Vasakpoolisel joonisel on toodud bakteriaalne ribosoom, parempoolisel madalamate eukariootide ribosoom ja keskmisel ühine südamik. Tumedama sinisega on värvitud domeenide spetsiifilised rRNA molekulid, helesinisega konserveerunud rRNA molekulid, tumedama punasega domeenide spetsiifilised valgud ja helepunasega konserveerunud valgud. Värviline skaala näitab konserveerunud ja domeenide spetsiifilise rRNA ja valkude osakaalu. Muudetud Melnikov *et al.*, 2012 järgi.

Bakteriaalse ribosoomi uurimiseks kasutatakse mudelorganismina *Escherichia coli* ribosoomi, mille molekulmass on ~2.3 MDa. *E.coli* 50S suur alaühik koosneb kahest rRNA molekulist (5S ja 23S) ja 33 ribosomaalsest valgust. Võrreldes konserveerunud südamikuga on suures alaühikus valgumolekule 14 võrra rohkem ja 23S rRNA molekul on pikem. *E.coli* ribosoomi 30S väike alaühik koosneb ühest rRNA molekulist (16S) ja 21 ribosomaalsest valgust. Võrreldes konserveerunud südamikuga on väikeses alaühikus valgumolekule 6 võrra rohkem ja 16S rRNA on pikem (joonis 1, tabel 1) (Ben-Shem *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2011; Melnikov *et al.*, 2012).

Eukariootse ribosoomi uurimiseks kasutatakse mudelorganismina *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi, mille molekulmass on ~3.3 MDa. *S.cerevisiae* 60S suur alaühik koosneb kolmest rRNA molekulist (5S, 5.8S ja 25S) ja 46 ribosomaalsest valgust. *S.cerevisiae* ribosoomi 40S väike alaühik koosneb ühest rRNA molekulist (18S) ja 33 ribosomaalsest valgust (joonis 1, tabel 1) (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Struktuursed ja kompositsioonilised erinevused põhjustavad lahknevusi sedimentatsiooni kiiruses tsentrifuugaaljõuvaljas ja ribosoomi suuruses. Pagaripärmi 80S ribosoom on 40% suurem kui bakteriaalne 70S ribosoom. Erinevused on põhjustatud sellega, et pagaripärmi 80S ribosoomi koostisesse on lisandunud uued struktuursed elemendid: 5,8S rRNA molekul 60S suures alaühikus ja teistel rRNA molekulitel on lisandunud rRNA lisasegendid (ES, ingl *expansion segment*); eukariöodi spetsiifilised ribosomaalsed valgud ja valkude domeenid (tabel 1) (Ben-Shem *et al.*, 2010).

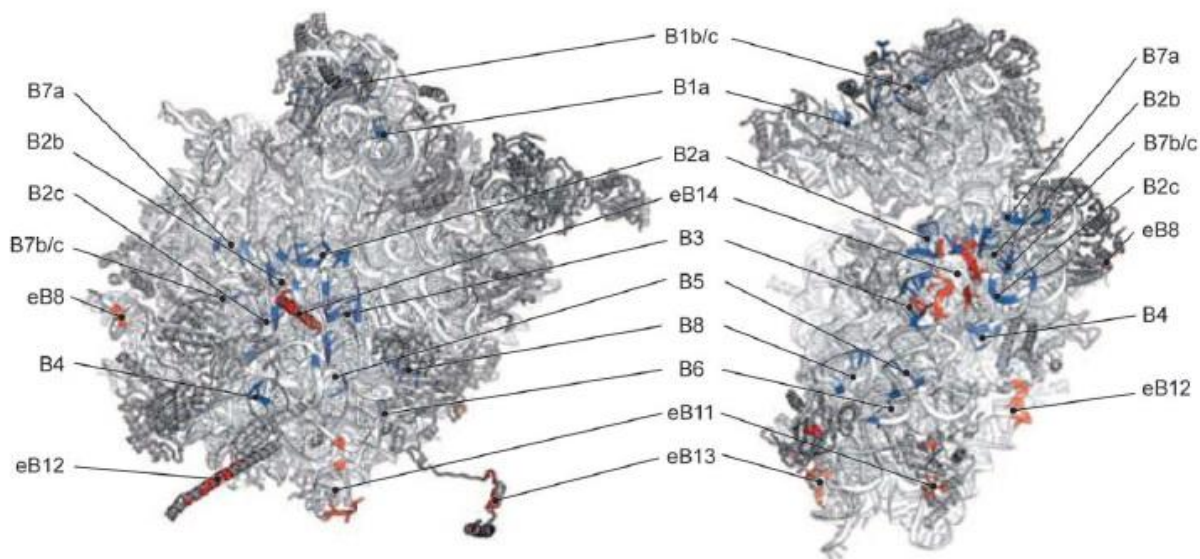
### 1.1.1. Alaühikutevahelised sillad

Translatsiooni toimumiseks on vaja alaühikute dünaamiline koos püsimine, mis on vahendatud ribosomaalsete sildade kaudu (joonis 2). Alaühikutevahelisi sildu moodustavad kontaktid rRNA ja ribosomaalsete valkude vahel. Eristatakse kolme tüüpi kontakte: rRNA-rRNA, rRNA-valk ja valk-valk kontaktid. Ribosoomi alaühikutevahelised sillad koosnevad ühest või rohkemast arvust kontaktidest ning sildu võivad moodustada eri tüüpi kontaktid (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Polüpeptiidahela sünteesi ajal toimub ribosoomi konformatsiooni muutus. Alaühikute rotatsioon on vajalik mRNA dekodeerimise, mRNA ja tRNA translokeerimise, translatsiooni termineerimise, ribosoomide retsükleerimise jt protsesside toimumiseks. Translatsiooniga kaasneb ribosoomi alaühikute kontaktide moodustumine ja katkemine (Wilson ja Doudna Cate, 2012).

Ben-Shem *et al.* on uurinud pagaripärmi *S.cerevisiae* 80S ribosoomi kristallstruktuuri. Nad kirjeldasid kontakte, mis moodustuvad ribosoomi pre- ja post-translokatsioonilises konformatsioonides. Translatsiooni ajal toimub mRNA ja tRNA translokeerimine, millega kaasneb väikese alaühiku rotatsioon. Pre- ja post-translokatsioonilises konformatsioonides alaühikute omavaheline paigutus ja nende vaheliste kontaktide arv sildades varieerub (tabelid 2-6). Eristatakse püsivaid ja dünaamilisi kontakte. Püsivad kontaktid on kirjeldatud mõlemas konformatsioonis, dünaamilised ainult ühes konformatsioonis. Pre-translokatsiooni oleku konformatsioonis paikneb väike alaühik  $4^\circ$  nurga all võrreldes suure alaühikuga ja väikese alaühiku pea domeeni pöörlemise määr on  $15,5^\circ$ . Post-translokatsiooni oleku konformatsioonis paikneb väike alaühik  $9^\circ$  nurga all võrreldes suure alaühikuga ja väikese alaühiku pea domeeni pöörlemise määr on  $10,5^\circ$  (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Pagaripärmi ribosoomis on kirjeldatud 12 konserveerunud ja 5 eukarüoodi spetsiifilist silda (joonis 2) (Ben-Shem *et al.*, 2011).



**Joonis 2.** Pagaripärmi ribosoomi alaühikutevahelised sillad. Vasakul on toodud pagaripärmi ribosoomi suur alaühik ja paremal pagaripärmi ribosoomi väike alaühik. Sinisega on toodud konserveerunud sillad; punasega on toodud eukarüoodi spetsiifilised sillad. Muudetud Ben-Shem *et al.*, 2011 järgi.

### 1.1.2. Konserveerunud sillad

Alaühikutevahelisi sildu moodustavad sama või erinevat tüüpi kontaktid. Allpool on toodud konserveerunud sildade klassifikatsioon vastavalt sildu moodustavate kontaktide tüüpidele: valk-valk (tabel 2); rRNA-rRNA (tabel 3); rRNA-valk (tabel 4) ja segatüüpi (tabel 5) konserveerunud sillad (Ben-Shem *et al.*, 2011).

#### 1.1.2.1. Valk-valk tüüpi konserveerunud sild

Ainus valk-valk kontaktidega sild on B1b/c. Selle silla moodustavad pre-translokatsioonilises konformatsioonis suure alaühiku valk uL18 ja väikse alaühiku valgud uS15 ning uS19; post-translokatsioonilises konformatsioonis jääb alles ainult üks kontakt suure alaühiku valgu uL18 ja

väikese alaühiku valgu uS15 vahel (tabel 2). B1b/c paikneb ülalpool P-saiti ja on oluline translatsiooni täpsuse tagamisel (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011).

**Tabel 2.** Valk-valk tüüpi konserveerunud silla kontaktid.

Sild	Kontakti komponent		Kontaktide arv pre-translokatsioonilises ribosoomis	Kontaktide arv post-translokatsioonilises ribosoomis
	60S	40S		
B1b/c	uL18	uS15	2	1
	uL18	uS19	6	puudub

### 1.1.2.2.rRNA-rRNA tüüpi konserveerunud sillad

Ainult rRNA-rRNA kontakte sisaldavad sillad on B2a, B2b, B2c, B3 ja B7a (tabel 3) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011; Petrov *et al.*, 2014; Schuwirth *et al.*, 2005; Yusupov *et al.*, 2001).

rRNA-rRNA tüüpi konserveerunud sillad on stabiilsed ja on leitavad ribosoomi pre- ja post-translokatsioonilises konformatsioonis. B7a silla moodustavad 2 kontakti. B2c silla moodustavad ribosoomi pre-translokatsioonilises konformatsioonis 4 kontakti ja post-translokatsioonilises konformatsioonis 2 kontakti. B2a ja B3 sildu moodustavad rohkem kui 15 kontakti (tabel 3).

**Tabel 3.** rRNA-rRNA tüüpi konserveerunud sildade kontaktid.

Sild	Kontakti komponent		Kontaktide arv pre-translokatsioonilises ribosoomis	Kontaktide arv post-translokatsioonilises ribosoomis
	60S 25S rRNA	40S 18S rRNA		
B2a	IV domeen	3' minoorne domeen	15	15
B2b	IV domeen	tsentraalne ja 3' minoorne domeenid	6	5 (katkeb üks kontakt 18S rRNA 3' minoorse domeeniga)
B2c	IV domeen	tsentraalne domeen	4	2
B3	IV domeen	3' minoorne domeen	17	18
B7a	IV domeen	tsentraalne domeen	2	2

### 1.1.2.3. Valk-rRNA tüüpi konserveerunud sillad

Sillad B6, B7b/c ja B8 on valk-rRNA tüüpi püsivad sillad (tabel 4) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011; Petrov *et al.*, 2014; Schuwirth *et al.*, 2005; Yusupov *et al.*, 2001).

**Tabel 4.** rRNA-valk tüüpi konserveerunud sildade kontaktid.

Sild	Kontakti komponent		Kontaktide arv pre-translokatsioonilises ribosoomis	Kontaktide arv post-translokatsioonilises ribosoomis
	60S valk	40S rRNA		
B6	eL24	18S 3' minoorne domeen	2	2
B7b/c	uL2	18S tsentraalne domeen	6	4
	eL43	18S tsentraalne domeen	1	5
B8	eL14	18S 5' domeen	4	5

### 1.1.2.4. Segatüüpi konserveerunud sillad

B1a, B4 ja B5 sildade koosseisu kuuluvad kõik kolme tüüpi kontaktid (tabel 5) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011; Petrov *et al.*, 2014; Schuwirth *et al.*, 2005; Yusupov *et al.*, 2001).

B1a on dünaamiline sild ja moodustub ainult ribosoomi pre-translokatsioonilises konformatsioonis. B4 ja B65 on püsivad sillad ja on leitavad post- ja pre-translokatsioonilistes konformatsioonides.

**Tabel 5.** Segatüüpi konserveerunud sildade kontaktid.

Sild	Kontakti komponent		Kontaktide arv pre-translokatsioonilises ribosoomis	Kontaktide arv post-translokatsioonilises ribosoomis
	60S	40S		
B1a	25S II domeen	eS19	1	puudub
	25S II domeen	18S 3' minoorne domeen	2	puudub
B4	25S II domeen	18S tsentraalne domeen	6	7
	25S II domeen	uS19	1	4
	eL30	uS19	1	puudub
B5	eL14	18S 5' ja 3' minoorne domeenid	5	5
	25S IV domeen	18S 3' minoorne domeen	1	2

### 1.1.3. Eukariöodi spetsiifilised sillad

Eukariootne ribosoom on 40% suurem kui bakteriaalne ribosoom ja alaühikutevaheline kontaktpiirkond on umbes kaks korda suurem, mis põhjustab suurema sildade arvu perifeersetes piirkonnades (Ben-Shem *et al.*, 2010; Wilson ja Doudna Cate, 2012). Eukariootses ribosoomis on alaühikute vahel 17 silda, millest 5 on eukariöodi spetsiifilised: eB8, eB11, eB12, eB13 ja eB14 (tabel 6) (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Pre-translokatsioonilises konformatsioonis moodustavad eukariöodi spetsiifilise silla eB8 kaks kontakti 40S väikese alaühiku valgu eS1 ja 60S suure alaühiku 25S rRNA V domeeni ES31a vahel (tabel 6). Post-translokatsioonilises konformatsioonis lisanduvad interaktsioonid 40S väikese alaühiku valgu eS1 ja 60S suure alaühiku eL43 valgu vahel (tabel 6). Eksperimentaalselt on leitud, et 40S väikese alaühiku eS1 valk interakteerub hepatiit C viiruse (HCV) IRES (ingl k *internal ribosome entry site*) struktuuriga (Babaylova *et al.*, 2009).

Pre-translokatsioonilises konformatsioonis moodustavad eukariöodi spetsiifilise silla eB11 kuus kontakti 40S väikese alaühiku valgu eS8 ja 60S suure alaühiku 25S rRNA VI domeeni lisasegmenti ES41 vahel ning üks kontakt 60S suure alaühiku 25S rRNA II domeeni ja 40S

väikese alaühiku valgu eS8 vahel (tabel 6). Post-translokatsioonilises konformatsioonis katkeb 25S rRNA II domeeni ja eS8 vaheline kontakt (tabel 6) (Ben-Shem *et al.*, 2011).

**Tabel 6.** Eukariöodi spetsiifiliste sildade kontaktid.

Sild	Kontakti komponent		Kontaktide arv pre-translokatsioonilises ribosoomis	Kontaktide arv post-translokatsioonilises ribosoomis
	60S	40S		
eB8	25S rRNA lisasegment ES31a	eS1	2	puudub
	eL43	eS1	2	2
eB11	25S rRNA lisasegment ES41	eS8	6	5
	25S rRNA II domeen	eS8	1	puudub
eB12	eL19	eS17	3	puudub
	eL19	18S rRNA lisasegment ES6	13	14
	eL19	eS7	puudub	2
eB13	uL3	eS6	3	2
	eL24	eS6	8	11
	eL24	18S 3' minoorne domeen	puudub	3
	eL24	18S 5' domeen	puudub	7
eB14	eL41	18S tsentraalne domeen	10	10
	eL41	18S 3' minoorne domeen	18	19

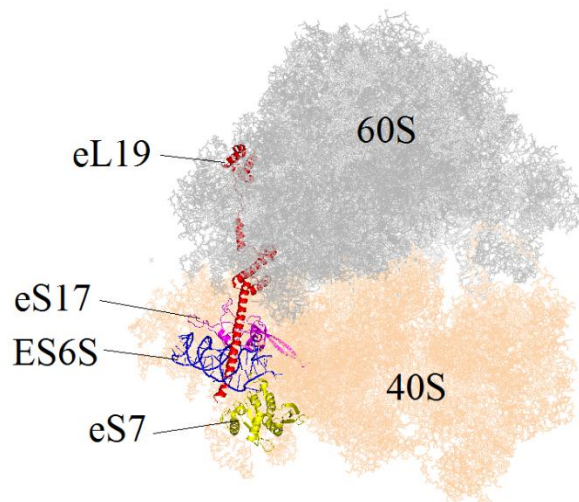
Käesolevas töös uuriti eukariöodi spetsiifilisi sildasid eB12, eB13 ja eB14.

### 1.1.3.1. Eukariöodi spetsiifiline sild eB12

Eukariöodi spetsiifiline sild eB12 asub alaühikutevahelise kontakti piirkonna perifeerses alas. eB12 põhistruktuuri määrab 60S suure alaühiku eL19 valgu C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi interaktsioon 40S väikese alaühiku 18S rRNA tsentraalse domeeni lisasegmentiga ES6. Pre-translokatsioonilises konformatsioonis moodustab eL19 valk lisakontakti 40S väikese alaühiku valguga eS17. Post-translokatsioonilises konformatsioonis moodustub selle asemel interaktsioon 40S väikese alaühiku valguga eS7 (joonis 2, tabel 6) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011).

Suure alaühiku ribosomaalne valk eL19 on kodeeritud kahe paraloogi poolt *RPL19A* ja *RPL19B*. Nende geenide poolt kodeeritud valgud on identsed (Song *et al.*, 1996). Mõlema paraloogi deleteerimine on letaalne. *RPL19B* deleteerimine põhjustab rakkude aeglasemat kasvu (Song *et al.*, 1996; Steffen *et al.*, 2012). Bakteri ribosoomis puudub eL19 valgu homoloog (Lecompte *jt.*, 2002). Imetajate valk eL19 ja arhede (*H. marismortui*) valk L19 on pagaripärmi valgu eL19 homoloogid (Ban *et al.*, 2014; Song *et al.*, 1996).

Uuringud näitavad, et eukariooti spetsiifiline sild eB12 mängib olulist rolli alaühikute liitumisel. eL19 mutantsed 60S alaühikud ei ole võimelised moodustada 80S ribosoomi *in vitro* ning reassotsieerumist ei mõjuta  $Mg^{2+}$  kontsentratsioon. eL19 deletsioonimutandid, kus on deleteeritud eB12 silda moodustav regioon, on aeglasema kasvuga, tundlikud paromomütsiini ja neomütsiini suhtes ja suurema hüperosmootse stressi taluvusega (Kisly *et al.*, 2016).



**Joonis 3.** Eukariooti spetsiifilise silla eB12 struktuur. Halliga on toodud 60S suur alaühik; roosaga on toodud 40S väike alaühik. Punasega on toodud valk eL19, kollasega valk eS7, lillaga valk eS17, sinisega 18S rRNA lisasegment ES6S. Joonis on valmistatud PyMOL tarkvaraga kasutades Ben-Shem *et al.*, 2011 avaldatud kristallstruktuuri.

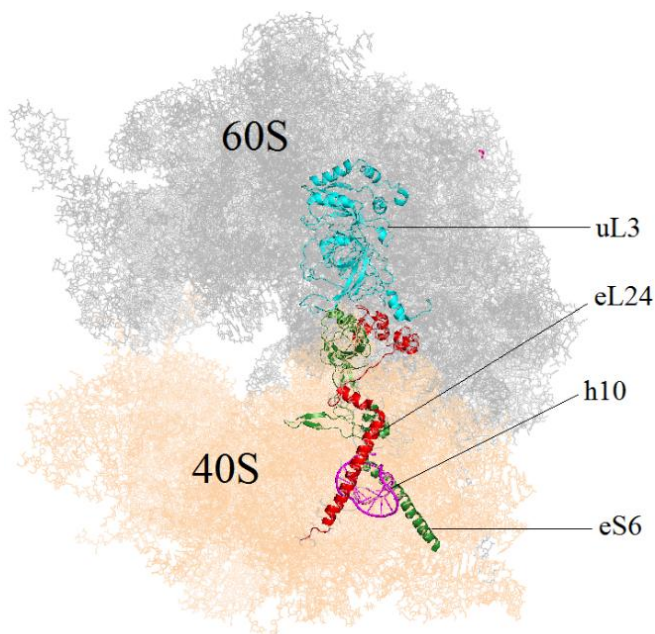
### 1.1.3.2. Eukariooti spetsiifiline sild eB13

Eukariooti spetsiifiline sild eB13 asub samuti alaühikutevahelise kontaktpiirkonna perifeerses alas. eB13 põhistruktuuri määrab 60S suure alaühiku eL24 valgu C-terimnaalse  $\alpha$ -heeliksi interaktsioon väikese alaühiku valguga eS6. Põhistruktuuri aitavad stabiliseerida kontaktid 40S väikese alaühiku valgu eS6 ja suure alaühiku valgu uL3 vahel. Post-translokatsioonilises konformatsioonis lisanduvad interaktsioonid 60S suure alaühiku valgu eL24 ja 40S väikese

alaühiku 18S rRNA 3' minoorse ja 5' domeenide vahel (joonis 3, tabel 6) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011).

Suure alaühiku valk eL24 on kodeeritud kahe paraloogi *RPL24A* ja *RPL24B* poolt (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Nende paraloogide poolt kodeeritud valgud erinevad üksteisest viie aminohappejäagi poolest (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). eL24 ei ole eluks hädavajalik (Baronas-Lowell ja Warner, 1990). Mõlema eL24 kodeeriva geeni deleteerimisel rakkude pooldumisaeg pikeneb (Steffen *et al.*, 2012). Bakteri ribosoomis ei ole eL24 valguga homoloogi (Lecompte *et al.*, 2002). Pagaripärmi eL24 järjestus on homoloogiline L2 valguga imetajates (Ban *et al.*, 2014). Arhede ribosoomi koostises on eL24 valk, millel puudub C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks (Armache *et al.*, 2013).

On leitud, et eL24 mutantses tüves 60S suur alaühik seob initsiatsiooni kompleksi madalal tasemel ja selle tagajärjel rakkudes akumulereerub 43S PIC (Ban *et al.*, 2014; Dresios *et al.*, 2006).

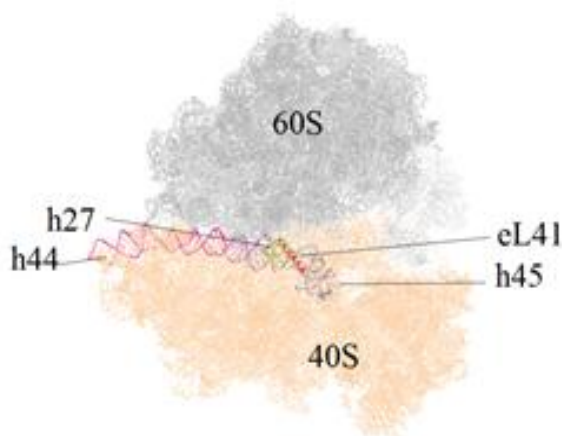


**Joonis 4.** Eukariöodi spetsiifilise silla eB13 struktuur. Halliga on toodud 60S suur alaühik; roosaga on toodud 40S väike alaühik. Punasega on toodud valk eL24, rohelisega valk eS6, lillaga 18S rRNA h10, sinisega valk uL3. Joonis on valmistatud PyMOL tarkvaraga kasutades Ben-Shem *et al.*, 2011 avaldatud kristallstruktuuri.

### 1.1.3.3. Eukariöodi spetsiifiline sild eB14

eB14 on ainuke eukariöodi spetsiifiline sild, mis paikneb alaühikutevahelise kontaktpiirkonna tsentraalses alas dekodeeriva tsentri lähedal. eB14 põhistruktuuri määravad kontaktid 60S suure alaühiku ribosomaalse valguga eL41 ja 40S väikese alaühiku 18S rRNA heeliksiite h27, h44, h45 vahel. Sild säilib pre- ja post-translokatsioonilistes ribosoomi konformatsioonides (joonis 4, tabel 6) (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011).

60S suure alaühiku valk eL41 on kodeeritud kahe paroloogi poolt *RPL41A* ja *RPL41B* ning ei ole eluks hädavajalik (Yu ja Warner, 2001). Valgu deletsioon ei mõjuta rakkude generatsiooniaega (Dresios *et al.*, 2003; Steffen *et al.*, 2012). Bakteri ribosoomis ei ole eL41 valgu homoloogi (Lecompte *et al.*, 2002). Pagaripärmi eL41 järjestus on homoloogiline L41 valguga imetajates (Ban *et al.*, 2014; Ben-Shem *et al.*, 2011). Arhede (*H.marismortui*) ribosoomi koostises on homoloogiline eL41 valk (Armache *et al.*, 2013).



**Joonis 5.** Eukariöodi spetsiifilise silla eB14 struktuur. Halliga on toodud 60S suur alaühik; roosaga on toodud 40S väike alaühik. Punasega on toodud valk eL41, rohelisega 18S rRNA h27, lillaga 18S rRNA h144, sinisega 18S rRNA h45. Joonis on valmistatud PyMOL tarkvaraga kasutades Ben-Shem *et al.*, 2011 avaldatud kristallstruktuuri.

On leitud, et valgu eL41 puudumine mõjutab peptidüültransferaasset aktiivsust (Dresios *et al.*, 2003; Dresios *et al.*, 2006). Rakkudes, kus puudub eL41 on suurenenud ka -1 programmeeritud ribosomaalne raamihke toimumine (Meskauskas *et al.*, 2003).

## 1.2. Translatsioon

### 1.2.1. Translatsiooni üldiseloomustus

Translatsioon on biosünteesi protsess, mille jooksul dekodeeritakse mRNA nukleotiidses järjestuses talletatud geneetiline informatsioon valkude aminohappeliseks järjestuseks. Süntees on katalüüsitud ribosoomide poolt. Translatsiooni protsessis saab eristada kolm etappi: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Initsiatsioon ühendab endas reaktsioone, mis toimuvad enne polüpeptiidahelas olevate aminohapete liitmist. Initsiatsiooni lõpus moodustub funktsionaalne ribosomaalne kompleks, kus P saidis asuvad startkoodon ja initsieeriv metüül-tRNA (met-tRNA<sub>i</sub>). Elongatsiooni käigus toimub aminoatsüül-transport-RNA (tRNA) seondumine, peptiididemetete moodustumine ja ribosoomi translokatsioon. Translatsiooni terminatsioon toimub, kui ribosoomi A-saiti jõuab terminaatorkoodon. Protsess lõpeb informatsiooni-RNA (mRNA) molekuli vabanemisega ja ribosoomi lagunemisega alaühikuteks. Iga translatsiooni protsessi etapp on vahendatud vastavate initsiatsiooni-, elongatsiooni- või terminatsioonifaktoritega (Melnikov *et al.* 2012; Sonenberg ja Hinnebusch, 2009).

Bakterite translatsiooni initsiatsioonil seondub väike alaühik kohe startkoodonile. Protsess on vahendatud bakteriaalsete initsiatsioonifaktoritega. Startkoodoni identifitseerimise protsess on vahendatud Shine-Dalgarno järjestusega, mis paikneb startkoodonist ülesvoolu. 16S rRNA 3' otsas paikneb anti-Shine-Dalgarno järjestus, mis interakteerub komplementaarse mRNA Shine-Dalgarno järjestusega. Selline protsess tagab korrektse startkoodoni identifitseerimise ja aitab vältida translatsiooni initsiatsiooni operoni sisemist metioniini kodeeritavast koodonist (Melnikov *et al.* 2012; Sonenberg ja Hinnebusch, 2009).

Eukarüootse ribosoomi koosseisu kuulub 16S rRNA asemel 18S rRNA. 18S rRNA järjestuses puudub anti-Shine-Dalgarno järjestus, mis põhjustab lahknevusi translatsiooni initsiatsiooni mehhanismides bakteriaalsetes ja eukarüootsetes rakkudes. Täpsemalt eukarüootse raku translatsiooni initsiatsiooni kirjeldatakse järgmistes peatükkides.

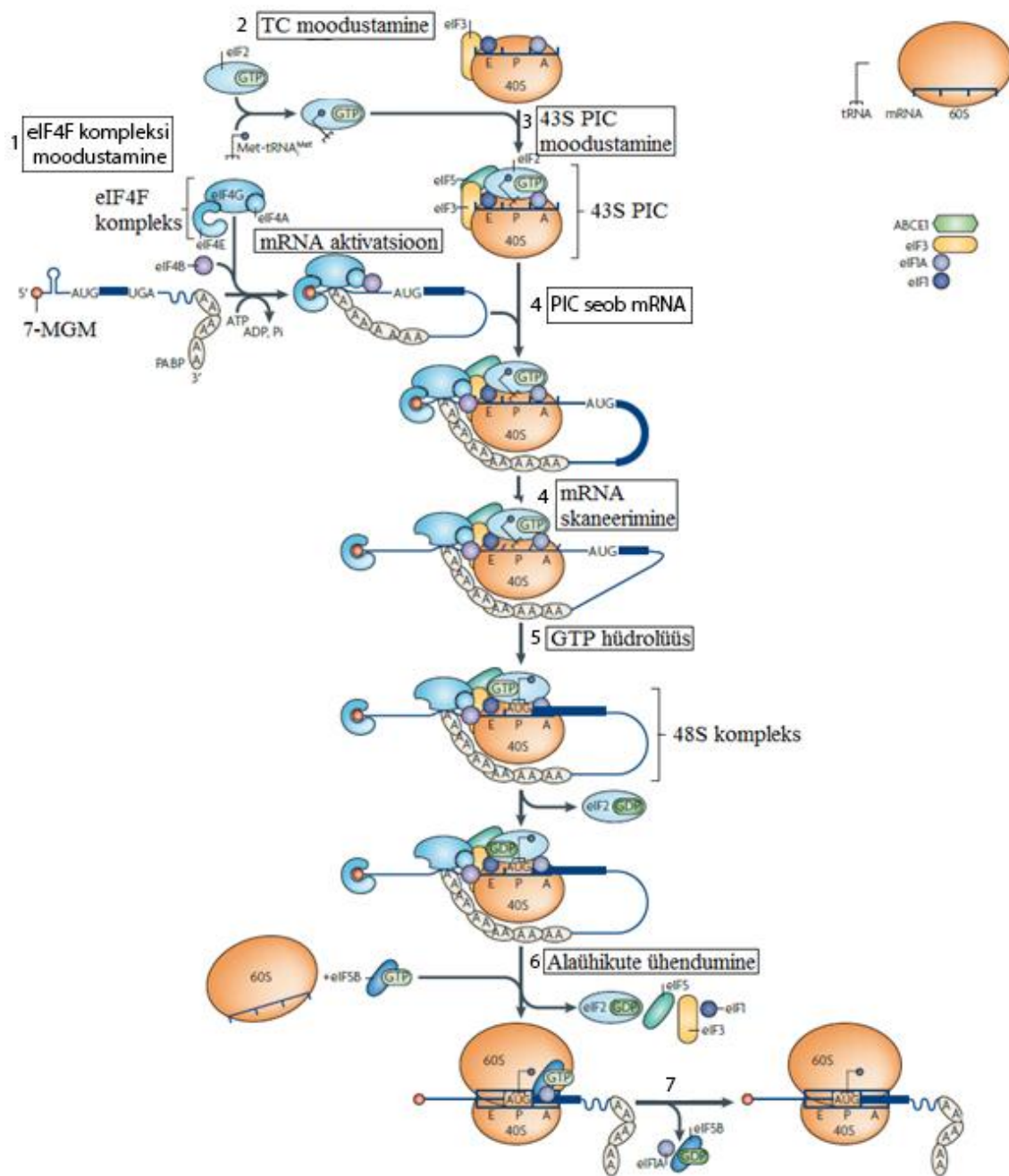
Erinevatel keskkonnatingimustel vajab rakk erinevate valkude transleerimist. Stressi korral (näiteks mitoos, apoptoos, viirusnakkus, hüpooksia) surutakse üldine translatsioon maha ning rakk vajab stressiga toimetulekuks spetsiifiliste valkude transleerimist (Hellen *et al.*, 2001). Lisaks, on vaja reguleerida valkude kogust rakus ning selleks kasutatakse erinevaid mehhanisme. Üks võimalus on reguleerida translatsiooni taset läbi erinevate initsiatsiooni mehhanisme.

Eukarüootses rakkus eristatakse kanoonilist 7-MGM (7-MGM, ingl k *7-Methylguanosine cap*) sõltuvat ja 7-MGM sõltumatut mehhanisme.

### 1.2.2. Eukarüootse raku kanooniline translatsiooni initsiatsioon

Eukarüootses rakus osaleb translatsiooni initsiatsioonis vähemalt 12 erinevat eukarüootset initsiatsioonifaktorit (eIF, ingl k *eukaryotic initiation factor*). Protsessi võib jagada järgmisteks etappideks (joonis 6):

1. mRNA 5' otsas paiknevale 7-MGM struktuurile moodustub eIF4F kompleks mitmest eIFist: eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF4E. 7-MGM sidumisega aktiveeritakse mRNA.
2. Samal ajal toimub eIF2 ternaarse kompleksi (TC) moodustumine.
3. eIF3 ja eIF5 vahendusel seob TC met-tRNA<sub>i</sub> ja moodustub 43S preinitsiatsiooni kompleksi (PIC, ingl k *preinitiation complex*).
4. PIC seob aktiveeritud mRNA ja algab mRNA skaneerimine.
5. Startkoodonil (AUG) hüdrolüüsitakse eIF2 seotud GTP ja moodustub 48S kompleks, kus met-tRNA<sub>i</sub> on seotud startkoodoniga P saidis.
6. Vabastatakse osa eIF. Seejärel toimub eIF5B vahendusel suure alaiühiku liitumine 48S kompleksile. Vabastatakse ülejäänud eIF.
7. Translatsiooni initsiatsiooni lõpuks moodustub funktsionaalne 80S kompleks, kus P saidis asuvad startkoodon ja met-tRNA<sub>i</sub> (Dever *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2010; Hinnebusch ja Lorsch, 2012).



**Joonis 6.** Kanoonilise eukariootse translatsiooni initsiatsiooni skeem. eIF4F kompleks seob mRNA 7-MGM struktuuri ja aktiveerib mRNA. Toimub TC moodustumine ja seejärel 43S PIC moodustumine. 43S PIC seob aktiveeritud mRNA ja algab mRNA skaneerimine. Kui startkoodon on leitud, toimub GTP hüdrolüüs ja 48S kompleksi moodustumine. Osa eIF lahkuvad ja toimub alaühikute assotsieerumine. Seejärel lahkuvad ülejäänud eIF. Initsiatsiooni lõpuks on moodustunud funktsionaalne 80S ribosoom, kus P saidis asuvad startkoodon ja met-tRNA<sub>i</sub>. Muudetud Jackson *et al.*, 2010 järgi.

### 1.2.3. 7-metüülguanosiinmütsi-sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni mehhanism

7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni mehhanism on IRES (ingl k *Internal Ribosome Entry Site*), mis on mRNA cis-regulaatorne element. Selline translatsiooni regulaatorne mehhanism on eriti oluline olukorras, kus rakkudes on üldine translatsiooni maha surutud ja ei saa toimuda initsiatsioon 7-MGM sõltuval viisil. Põhjuseks võib olla see, et 7-MGM struktuur on mRNA 5' otsast ära lõigatud või seotud regulaatorsete elementidega.

Esimesed tähelepanekud IRES struktuurist pärinevad Dorner *et al.* tööst, kus uuriti polioviiruse translatsiooni *in vitro*. Dorner *et al.* pakkusid, et polioviirused kasutavad enda polüproteiinide sünteesiks peremehe kanoonilisest translatsiooni initsiatsioonist erinevat mehhanismi (Dorner *et al.*, 1984). Hiljem pakuti, et mRNA sisemised sekundaarstruktuurid võivad siduda ribosome mRNA 5'-otsa 7-MGM sõltumatul viisil (Jang *et al.*, 1988; Pelletier ja Sonenberg, 1988). Hiljuti on näidatud, et 7-MGM sõltumatu valgu sünteesi initsiatsioon võib toimuda sekundaarstruktuuridele lisaks ka spetsiifilistest polü(U) motiividest ja 18S rRNA komplementaarsetest elementidest (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2016).

Tänapäeval eristatakse viiruseliseid, eukarüootseid ja sünteetilisi IRES elemente. Mokrejs *et al.* koostasid andmebaasi, kus on annoteeritud eksperimentaalselt kinnitatud IRES struktuurid (Mokrejs *et al.*, 2006; Mokrejs *et al.*, 2010).

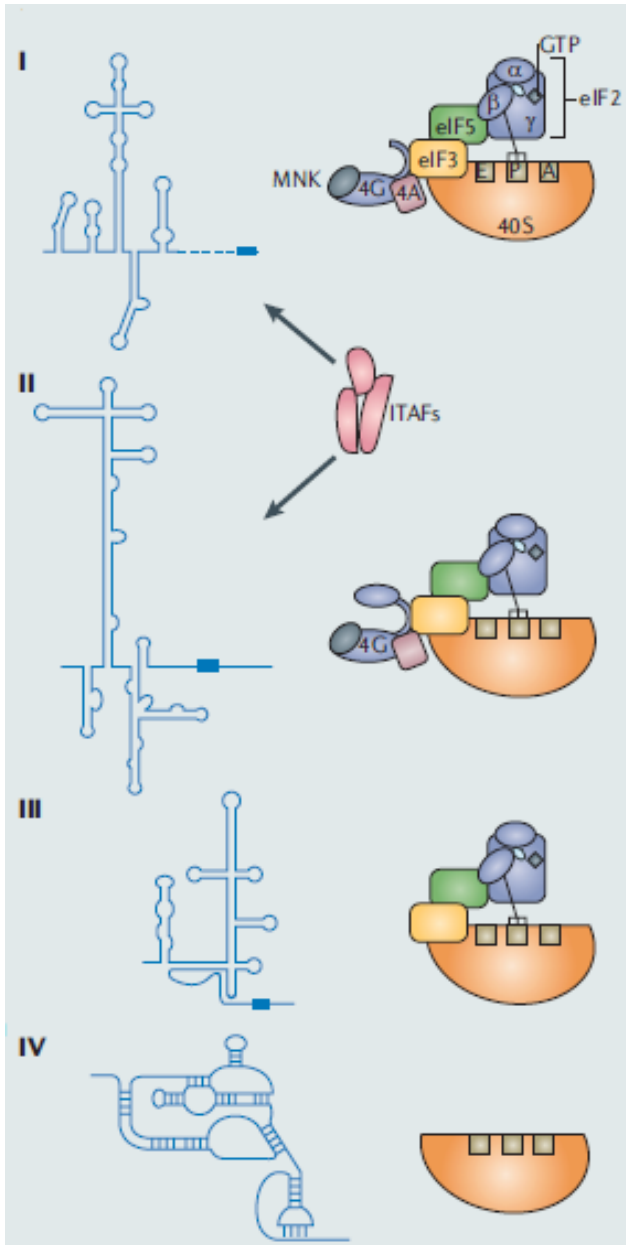
### 1.2.4. Viiruselised IRES elemendid

Viirused kasutavad peremeesraku ribosome ja valke oma polüproteiinide sünteesiks. Peremeesraku ressursside kasutamiseks on viirused võimelised inhibeerima raku üldist translatsiooni. Selleks, kasutavad viirused mitmeid mehhanisme. Viirused sünteesivad valke, mis seovad eIF4E. Initsiatsioonifaktor eIF4E seob mRNA 7-MGM struktuuri aktiveerides peremehe mRNA. Kui eIF4E on seotud viiruseliste valkude poolt, siis ei moodustu mRNA-d aktiveerivat kompleksi ja peremehe mRNA-d ei transleerita. Viirused, kelle genoomiks on +ssRNA (ingl k *single strand RNA*), on võimelised inhibeerima peremehe 7-MGM sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni. Kuna peremehe üldine translatsioon on mahasurutud, siis kasutavad viirused IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni mehhanismi enda polüproteiinide sünteesiks (Walsh ja Mohr, 2011). Viiruseliseid IRES elemente jagatakse neljaks tüübiks sõltuvalt nende funktsionaalsest eripärast ja struktuurist (joonis 7) (Hellen *et al.*, 2009; Walsh ja Mohr, 2011).

IRES tüüp I ja tüüp II vajavad initsiatsiooniks kõiki eukarüootseid initsiatsioonifaktoreid välja arvatud eIF4E, sest nad ei vaja 7-MGM sõltuvat mRNA aktivatsiooni. Tüübid erinevad IRES elementide mRNA sekundaarstruktuuri poolt. IRES tüüp I on kirjeldatud +ssRNA viirustel (näiteks poliovirus ja rinovirus). IRES tüüp II on kirjeldatud FMDV (ingl k *foot-and-mouth disease virus*) ja EMCV (ingl k *encephalomyocarditis virus*) viirustel (joonis 7) (Hellen *et al.*, 2009; Walsh ja Mohr, 2011).

IRES tüüp III korral seondub 43S kompleks kohe mRNAle ja vajab ainult PIC initsiatsioonifaktoreid (eIF2, eIF3, eIF5). IRES tüüp III on kirjeldatud hepatiit C viirusel (joonis 7) (Hellen *et al.*, 2009; Walsh ja Mohr, 2011).

IRES tüüp IV ei vaja initsiatsioonifaktoreid ja initsieerivat tRNA-d translatsiooni initsiatsiooniks. IRES-e domeen mimikeerib koodon-antikoodon paardumist ja seondub ribosoomi P-saiti. IRES tüüp IV on kirjeldatud CrPV (ingl k *cricket paralysis virus*) viirusel (joonis 7) (Hellen *et al.*, 2009; Walsh ja Mohr, 2011).



**Joonis 7.** Erinevat tüüpi viiruseliste IRES elementide sekundaarstruktuurid ja vajalikud faktorid. Värvilised kujundid on ribosoomi väike alaühik 40S ja erinevad eukarüootsed initsiatsioonifaktorid. Joonise vasakul pool on toodud IRES elementide struktuurid vastavalt nende tüübile (I, II, III ja IV); paremal pool on toodud eri tüüpi ITAF (ingl k IRES *trans-activating factors*) vajadus IRES sõltuvaks initsiatsiooniks. Muudetud Walsh and Mohr, 2011 järgi.

### 1.2.5. Eukariootsed IRES elemendid

Lisaks viiruselistele IRES sekundaarstruktuuridele on annoteeritud eukariootsed IRES elemendid. Eukariootsetes rakkudes on eelistatud 7-MGM sõltuv translatsiooni initsiatsioon ja 7-MGM sõltumatu initsiatsioon toimub väga madalal tasemel. Sellepärast on raske uurida IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni eukariootses rakkus.

Hiljuti kirjeldati 583 rakulist IRES elementi. Weingarten-Gabbay *et al.* disainisid raamatukogu 55 000 oligonukleotiidist. Oligonukleotiidide ekspresioonitaseme mõõtmiseks tehti suure läbilaskvusvõimega bitsistronse reporteri analüüs, mis põhines FACS (ingl k *fluorescence-activated cell sorting*) meetodil ja suure läbilaskvusvõimega DNA sekveneerimise meetodil. Oligonukleotiidide raamatukogu kloneeriti plasmidi kahe reporteri vahele: mRFP (ingl k *monomeric red fluorescent protein*) ja eGFP (ingl k *enhanced green fluorescent protein*). Saadud plasmiididega nakatati kopsu kartsinoomi rakke H1288, integreerides igasse rakku ühe reporterplasmidi. Esimeses etapis sorteeriti välja eGFP<sup>+</sup> populatsioone. eGFP<sup>+</sup> signaal näitab, et rakkudes on 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni aktiivsus. Teises etapis kasvatati eGFP<sup>+</sup> populatsioone veel ühe nädala ja analüüsiti nende eGFP<sup>+</sup> aktiivsust. Viimases etapis jagati populatsioonid mitmesse rühma 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni aktiivsuse taseme järgi (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2016).

Lisaks, teostasid Weingarten-Gabbay *et al.* süstemaatilist mutageneesi, mille tulemusena kirjeldati kaks funktsionaalset IRES klassi: struktureeritud (sekundaarstruktuuriga IRES elemendid) ja struktureerimata (polü(U)-motiivid) (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2016).

*S.cerevisiae* geenid, mille puhul on tõestatud IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon, on *TIF4631* (Verge *et al.*, 2004) ja *URE2* (Komar *et al.*, 2003). Käesoleva töö eksperimentaalses osas kasutatakse reporterit, mis on konstrueeritud *URE2* mRNA baasil.

#### 1.2.5.1. *URE2*

*URE2* on eluks mittehädavajalik geen, mis paikneb *Saccharomyces cerevisiae* 14.kromosoomis. *URE2* deletsioon põhjustab aeglasema kasvu fenotüüpi (Deutschbauer *et al.*, 2005). *URE2* kodeerib valku, mis reguleerib lämmastiku katabolismi või oksüdatiivse stressi vastust (Courchesne *et al.*, 1988; Rai ja Cooper, 2005).

Kui keskkonnas on saadaval optimaalsed lämmastiku allikad (nt glutamiin, asparagiin), siis Ure2p valk moodustab kompleksi GATA transkriptsioonifaktoriga Gln3. See kompleks blokeerib nn vaeste lämmastiku allikate (nt arginiin, urea) assimilatsiooni reguleerivate geenide transkriptsiooni. Tulemuseks ekspresseeritakse optimaalse lämmastiku allikate assimilatsiooni reguleerivaid geene (Wickner *et al.*, 2000). On näidatud, et TOR (ingl k *target of rapamycin*) signaalirada reguleerib geeni ekspressiooni lämmastiku nälja korral. Täpne stressiga toimetuleku mehhanism ei ole kirjeldatud (Cardenas *et al.*, 1999).

Ure2p valgu teine funktsioon on oksüdatiivse stressi vastuse regulatsioon. Ure2p kristallstruktuur näitab, et valk moodustab homodimeeri ja selle struktuur sarnaneb glutatiooni-S-transferaasile. Glutatioon-S-transferaas katalüüsib redutseeritud glutatiooni (GSH) seondumist ligandile. GSH on antioksüdant ja on võimeline siduma reaktiivseid hapnikuühendeid rakus. Ure2p, mimikeerides glutatiooni-S-transferaasi, reguleerib oksüdatiivse stressiga toimetulekut (Bousset *et al.*, 2001; Coschigano ja Magasanik *et al.*, 1991).

URE2 mRNA molekulilt transleeritakse 7-MGM sõltuval viisil täispikk valk (354 aminohapet) ja IRES sõltuval viisil lühem valk (260 aminohapet) (joonis 8) (Komar *et al.*, 2003). Ure2p täispikal valgul on kaks funktsioonilist domeeni: priooni moodustav N-terminaalne domeen ja Gln3 siduv C-terminaalne domeen (Masison *et al.*, 1995). Täispikk Ure2p võib moodustada amüloidseid fibrille, mis on prioonsete omadustega. Prioonsetes vormis valk muudab Ure2p natiivset vormi inaktiivseks ja põhjustab [*URE3*] fenotüüpi (Baxa *et al.*, 2002). *De novo* prioonsete valkude moodustamise mehhanism ei ole veel selge. IRES sõltuval viisil transleeritav lühem Ure2p valk on 260 aminohapet (94-354) pikk ja sellel puudub priooni moodustav N-terminaalne domeen (joonis 8). Ure2p valgu lühem versioon on võimeline parandama prioonsetes vormis oleva valgu poolt põhjustatud [*URE3*] fenotüüpi (Komar *et al.*, 2003; Wickner *et al.*, 2000).



Käesolevas töös kasutati reporterplasmidi, kus *URE2* järjestuse esimesed kaks startkoodonit (joonis 8, joonis 12) on muteeritud ja täispika valgu transleerimine 7-MGM sõltuval viisil ei toimu. Kontrolliks kasutakse plasmidi, kus 94. startkoodon on muteeritud CTT leutsiini kodeerivaks koodoniks (joonis 12) ja IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon ei toimu.

On näidatud, et eIF2A (eukariootne initsiatsioonifaktor 2A) deleteerimine *S. cerevisiae* rakkudes suurendab Ure2p 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni toimumist. eIF2A seob väikest alühikut AUG-sõltuval viisil sarnaselt bakteriaalsele initsiatsioonifaktorile 2 (IF2). eIF2A toimel seondub PIC kohe mRNA startkoodonile (Reineke *et al.*, 2008).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Uurida, kuidas mõjutab ribosoomi alaühikutevaheliste eukarioidi spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 puudumine IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni.
2. Analüüsida eukarioidi spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 kooperatiivsust IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil.
3. Uurida, kuidas sillad eB12, eB13 ja eB14 mõjutavad *S.cerevisiae* rakkude toimetulekut oksüdatiivse või raskemetalli poolt tekitatud stressiga.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud tüved, plasmiidid, praimerid ja rakkude kasvutingimused

*S.cerevisiae* tüved on konstrueeritud S288C tüve baasil. *S.cerevisiae* tüvesid kasvatati temperatuuril 30° C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pöört/min). Taardsöötme valmistamiseks lisati vedelsöötmele 2% agarit. Töös kasutatud tüved on toodud tabelis 7. Töös kasutatud plasmiidid on toodud lisa 1. Töös kasutatud praimerid on toodud lisa 2.

**Tabel 7.** Töös kasutatud pagaripärmi tüved

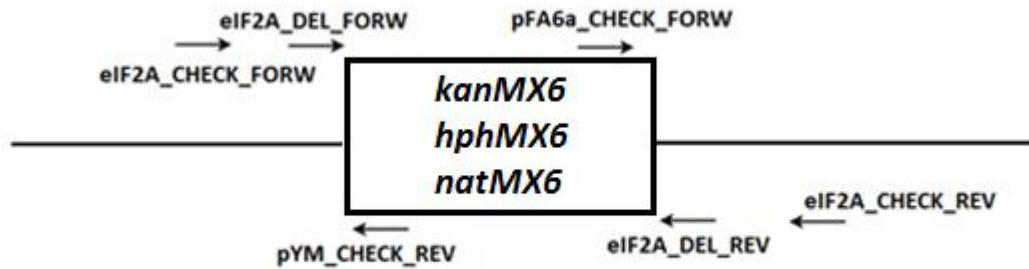
Tüve nr	Nimi	Genotüüp	Päritolu
Sc309	WT	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Labori kolleksioon
Sc360	ΔeB12	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19<sub>1-146</sub>]</i>	Labori kolleksioon
Sc466	ΔeIF2A	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ΔeIF2A::natMX6</i>	Valmistatud selles töös
Sc488		<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6</i>	Labori kolleksioon

Sc511	$\Delta eB12\Delta eB13$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl 19A::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl 19B::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl24A::hphMX6 <math>\Delta</math>rpl24B::hphMX6 [pRS315-rpl19 1-146] [pRS314-rpl24 1-65]</i>	Labori kollektsoon
Sc532	$\Delta eB14$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6</i>	Labori kollektsoon
Sc561	$\Delta eB13\Delta eB14$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6 <math>\Delta</math>rpl24A::hphMX6 <math>\Delta</math>rpl24B::hphMX6</i>	Labori kollektsoon
Sc572	$\Delta eB12\Delta eB14$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl19A::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl19B::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6 [pRS315-rpl19 1-146]</i>	Labori kollektsoon
Sc579	$\Delta eB12\Delta eIF2A$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl19A::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl19B::kanMX6 <math>\Delta eIF2A::natMX6</math></i>	Valmistatud selles töös
Sc580		<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl24A::hphMX6 <math>\Delta</math>rpl24B::hphMX6 <math>\Delta eIF2A::natMX6</math></i>	Valmistatud selles töös
Sc581	$\Delta eB14\Delta eIF2A$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6 <math>\Delta eIF2A::kanMX6</math></i>	Valmistatud selles töös
Sc592	$\Delta URE2$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta ure2::kanMX6</math></i>	Labori kollektsoon
Sc598		<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6 <math>\Delta</math>rpl24A::hphMX6 <math>\Delta</math>rpl24B::hphMX6 <math>\Delta eIF2A::kanMX6</math></i>	Valmistatud selles töös
Sc600	$\Delta eB12\Delta eB14\Delta eIF2A$	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta</math>rpl19A::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl19B::kanMX6 <math>\Delta</math>rpl41A::natMX6 <math>\Delta</math>rpl41B::natMX6 <math>\Delta eIF2A::hphMX6</math> [pRS315-rpl19 1-146]</i>	Valmistatud selles töös
$\Delta YGR054W$		<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>36 <math>\Delta</math>arg4 <math>\Delta</math>lys1 <math>\Delta eIF2A::kanMX6</math></i>	EUROSCARF

### 2.2.2. eIF2A deletsioonimutantide valmistamine

eIF2A deletsioonimutandid valmistati tüve  $\Delta$ YGR054W kasutades.  $\Delta$ YGR054W genomne DNA eraldati LiOAc-SDS meetodiga (Lõoke *et al.*, 2011). *KanMX6*, *hphMX6* või *natMX6* antibiootikumi resistentsuskasseti amplifitseerimise esimeses etapis valmistati PCR meetodil 2 DNA fragmenti: eIF2A\_DEL\_5 ja eIF2A\_DEL\_3. eIF2A\_DEL\_5 paljundamiseks kasutati praimereid eIF2A\_DEL\_FORW ja pYM\_CHECK\_REV. eIF2A\_DEL\_3 puhul kasutati praimereid eIF2A\_DEL\_REV ja pFA6A\_CHECK\_FORW (joonis 10, lisa 2). Antibiootikumi resistentsuskasseti amplifitseerimise teises etapis teostati ülekattuv PCR (Higuchi *et al.*, 1988). Ülekattuva PCR reaktsioonisegu maht oli 50 $\mu$ l, mis sisaldas 1x PCR puhvrit (100mM Tris-HCl (pH 8,85); 25mM KCl; 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2mM MgSO<sub>4</sub>), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTP; 2,5U Pfu DNA polümeraasi (Biokeemia laboris puhastatud); 0,055M DMSO; 1 $\mu$ l pFA6a-kanMX6, pFA6a-hphMX6 või pFA6a-natMX6 antibiootikumi resistentsuskassetti sisaldavat plasmiidset DNA-d, 15pmol eIF2A\_DEL\_FORW, 15pmol eIF2A\_DEL\_REV, 4 $\mu$ l eIF2A\_DEL\_5, 1 $\mu$ l eIF2A\_DEL\_3 praimereid. PCR produkti eraldamiseks geelist kasutati GEL/PCR Purification Mini Kit (FavorPrep).

*KanMX6* antibiootikumi resistentsuskasseti integreerimiseks transformeeriti PCR produkt  $\Delta$ eB14 $\Delta$ eIF2A (Sc581) või Sc598 pagaripärmi *S.cerevisiae* tüvesse. *NatMX6* antibiootikumi resistentsuskasseti integreerimiseks transformeeriti PCR produkt  $\Delta$ eIF2A (Sc466),  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eIF2A (Sc579) või Sc580 pagaripärmi *S.cerevisiae* tüvesse. *HphMX6* antibiootikumi resistentsuskasseti integreerimiseks transformeeriti PCR produkt  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eB14 $\Delta$ eIF2A (Sc600) pagaripärmi *S.cerevisiae* tüvesse. Pagaripärmi *S.cerevisiae* rakke transformeeriti kasutades LiOAc meetodit (Knop *et al.*, 1999). Pärast transformatsiooni kasvatati rake üleöö YPD vedelsöötmes temperatuuril 30° C (1% Bacto pärmiekstrakt, 2% Bacto pepton, 2% glükoos). Seejärel koguti rakud tsentrifugimise teel Rotina 420R tsentrifuugis (3 min, 3200rpm, 4°C) (Swingout rotor Cat. No. 4723) ja külvati YPD tardsöötmetele, mis sisaldasid erinevaid antibiootikume: G418 genetiisiin lõppkontsetraatsiooniga 200 $\mu$ g/ml, hügomütsiin lõppkontsetraatsiooniga 300 $\mu$ g/ml või nourseotriisiin lõppkontsetraatsiooniga 100 $\mu$ g/ml. Kasseti korrektse integreerimise kontrolliks teostati koloonia PCR kasutades eIF2A\_CHECK\_FORW ja pYM\_CHECK\_REV või eIF2A\_CHECK\_REV ja pFA6a\_CHECK\_FORW praimereid (joonis 10, lisa 2).



**Joonis 10.**  $\Delta eIF2A$  mutantide valmistamisel kasutatud praimerite seondumiskohad.

### 2.2.3. eL24 mutantide valmistamine

eL24 deletsioonimutandid valmistati pagaripärmi tüvedesid Sc488, Sc580 või Sc598 kasutades. Pagaripärmi rakke transformeeriti kasutades LiOAc meetodit (Knop *et al.*, 1999).  $\Delta eL24$  tüve saamiseks transformeeriti tüvesse Sc488 plasmiid pRS314,  $\Delta eB13$  tüve saamiseks transformeeriti sellesse tüvesse plasmiid pRS314-eL24<sub>(1-65)</sub>, +eL24 tüve saamiseks transformeeriti Sc488 rakkudesse plasmidi pRS314-eL24.

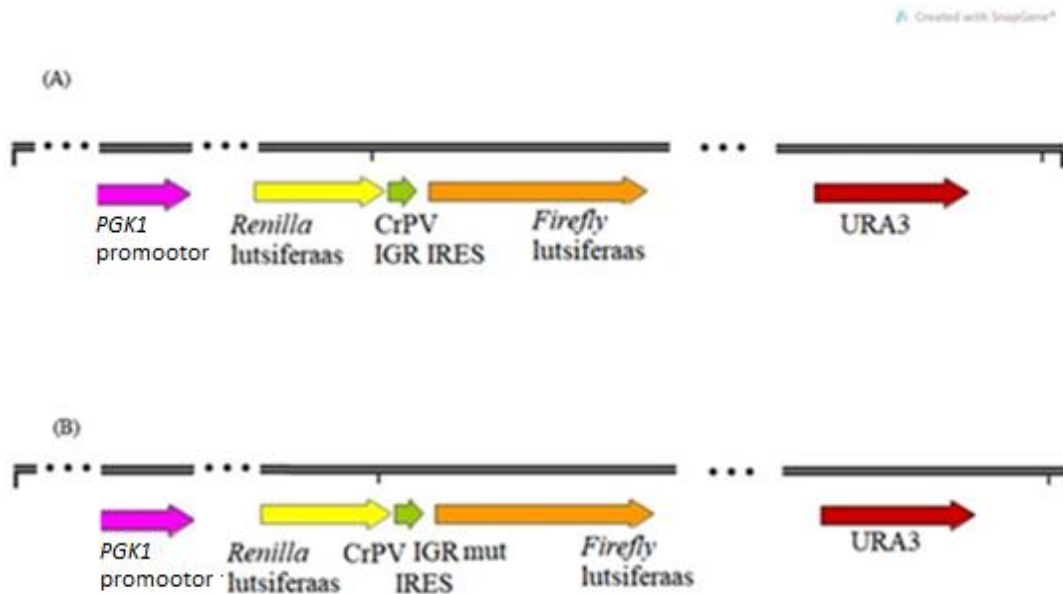
$\Delta eL24\Delta eIF2A$  tüve saamiseks transformeeriti tüvesse Sc580 plasmiid pRS314,  $\Delta eB13\Delta eIF2A$  tüve saamiseks transformeeriti sellesse tüvesse plasmiid pRS314-eL24<sub>(1-65)</sub>, +eL24 $\Delta eIF2A$  tüve saamiseks transformeeriti Sc580 rakkudesse plasmiid pRS314-eL24.

$\Delta eL24\Delta eB14$  tüve saamiseks transformeeriti tüvesse Sc598 plasmiid pRS314 ja

$\Delta eL24\Delta eB14\Delta eIF2A$  tüve saamiseks transformeeriti sellesse tüvesse plasmiid pRS314-eL24<sub>(1-65)</sub>. Kõik transformandid selekteeriti SC-TRP (0,67% pärmi lämmastikaluste segu; 2% glükoos; 0,2% aminohapete segu, kus puudub trüptofaan) agarit sisaldaval söötmel.

### 2.2.4. IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades bitsistronset reportersüsteemi

Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni mõõtmiseks kasutati bitsistronset reportersüsteemi, mis põhines *PGK1* promootoril, *Renilla* lutsiferaasil, CrPV IGR IRES-el ja *Firefly* lutsiferaasil (joonis 11). Kontrolliks kasutati plasmidi pRS316-CrPV IGRmut (joonis 11), mis sisaldas muteeritud CrPV IGR IRES elemendi, kus sekundaarstruktuuri PKI (ingl k *pseudoknot I*) ei ole funktsionaalne (Landry *et al.*, 2009).



**Joonis 11.** Reporterplasmiidide pRS316-CrPV IGR IRES (A) ja pRS316-CrPV IGRmut IRES (B) skeemid. Lillaga on toodud PGK1 promootor, kollasega *Renilla* lutsiferaasi geen, rohelisega CrPV IGR IRES või muteeritud CrPV IGR IRES järjestus, oranžiga *Firefly* lutsiferaasi geen, punasega *URA3* geen. Joonis on valmistatud kasutades SnapGene tarkvara.

Plasmiidide transformeerimiseks pagaripärm rakkudesse kasutati LiOAc meetodit (Knop *et al.*, 1999). Lutsiferaaside aktiivsuse mõõtmiseks kasvatati rakke ja valmistati rakulüsaadid kahte erinevat meetodit kasutades. Esiteks, üksikkoloonia inokuleeriti 2ml SC-URA (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu, kus puudub uratsiil) selektiivsöötmesse ja kasvatati üleöö 30°C juures. Saadud kultuurid lahjendati ( $OD_{600}=0,4$ ) ja kasvatati 10 ml SC-URA selektiivsöötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. 4-5ml kultuurist koguti rakud tsentrifuugimise teel (Rotina 420R tsentrifuugis, 3min, 3200rpm, 4°C). Rakke pesti 1ml PBS+PMSF lahusega (14mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM PMSF). Seejärel lisati 300µl PBS+PMSF lahust ja 200µl klaaskuule (d=0,25-0,5mm). Rakke lüüsi Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisaatoriga (6000rpm, 3x60s, paus 60s, 4°C). Rakulüsaat tsentrifuugiti Rotina 420R tsentrifuugis (5000rpm, 2x5 min, 4°C). Supernatanti kasutati lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmisteks. *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmiseks kasutati Tecan Infinite M200 Pro luminomeetrit ja *Dual Luciferase Assay System* (Promega). 5µl rakulüsaadile lisati 50µl LARII reagenti ja mõõdeti *Firefly* lutsiferaasi aktiivsust.

Saadud segule lisati 50µl Stop&Glo reagenti ning mõõdeti *Renilla* lutsiferaasi aktiivsust. Tulemused esitati kujul *Firefly/Renilla* RLU (ingl k *Relative light unit*). Katset korrati vähemalt kaks korda kolme bioloogilise replikaadiga.

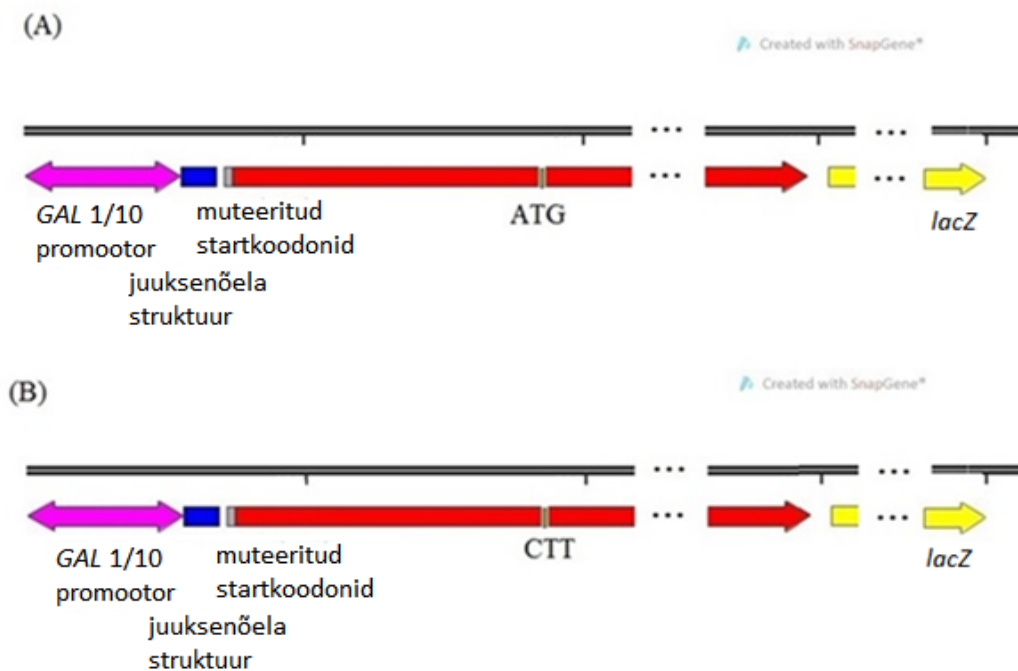
Teiseks, üksikkoloonia inokuleeriti 2ml SC-URA selektiivsöötmesse ja kasvatati üleöö. Saadud kultuurid lahjendati ( $OD_{600}=0,08$ ) ja kasvatati 10ml selektiivsöötmes 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini. 1,5ml kultuuri tsentrifuugiti Rotina 420R tsentrifuugis (3min, 3200rpm, 4°C). Rakkudele lisati 100µl PLB (Promega) lahust, segati Vortexil 15s ja inkubeeriti 1min 45s. *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmiseks kasutati Tecan Infinite M200 Pro luminomeetrit ja Dual Luciferase Assay System (Promega). 4µl rakulüsaadile lisati 40µl LARII reagenti ja mõõdeti *Firefly* lutsiferaasi aktiivsust. Seejärel rakulüsaat lahendati 1000x 100µl vees. 4µl lahjendatud lüsaadile lisati 20µl LARII reagenti ja 20µl Stop&Glo reagenti ja mõõdeti *Renilla* lutsiferaasi aktiivsust. Katset korrati vähemalt kolme bioloogilise replikaadiga. Andmete analüüsiks kasutati *Student* t-testi ( $\alpha=0,05$ ).

### **2.2.5. Eukariootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades $\beta$ -galaktosidaasi reportersüsteemil põhineva meetodi**

*URE2* IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni mõõtmiseks kasutati reportersüsteemi, mis põhines *GAL1/10* promootoril, skaneerimist takistaval juuksenõela struktuuril, *URE2* IRES-el ja *lacZ* geenil (joonis 12).  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus määrati *S.cerevisiae* rakkudest, mis sisaldasid plasmide p281-4-AUG ja p281-4-CTT. p281-4-AUG plasmiidis on *URE2* IRES-es olev AUG koodon funktsionaalne. p281-4-CTT plasmiidis on AUG startkoodon asendatud CTT koodoniga, mis ei võimalda IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumist.

Üksikkolooniad kasvatati 10ml selektiivsöötmes SM Glc (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% galaktoos, 0,2% aminohapete segu (leutsiin, histidiin, trüptofaan, arginiin ja lüsiin või leutsiin, histidiin, arginiin ja lüsiin) 20tundi 30°C juures. Rakkude kogumiseks vedelkultuurid tsentrifuugiti Rotina 420R tsentrifuugis (3 min, 3200rpm, 21°C). Rakkudele lisati 10ml selektiivsöödet SM Gal (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% galaktoos, 0,2% aminohapete segu (leutsiin, histidiin, trüptofaan, arginiin ja lüsiin või leutsiin, histidiin, arginiin ja lüsiin) ja kasvatati 20tundi 30°C juures. 5ml kultuuri tsentrifuugiti Rotina 420R tsentrifuugis (3min, 3200rpm, 21°C). Kogutud rakkudele lisati 100µl BB puhvrit (100mM Tris-HCl pH8.0, 20% glütserool, 1mM DTT) ja kiirkülmutati vedelas lämmastikus. Külmutatud rakke hoiti vähemalt

1tund -80 °C juures. Rakud sulatati jääl ja lisati 100µl BB puhvrit, 4µl 100mM PMSF ja 200µl (d=0,25-0,5mm) klaaskuule. Rakud lüüsi 4°C juures segades Vortexil 3x2min. Lüsaadile lisati 100µl BB puhvrit ja tseentrifuugiti Rotina 420R tseentrifuugis (10min, 13000rpm, 4°C). Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati *Coomasie (Bradford) Protein Assay kit* (Thermo scientific). Rakulüsaat lahjendati 10x100µl vees. Mõõtmiseks kasutati 5µl rakkulüsaati lahjendust ja 250µl *Coomasie (Bradford) Protein Assay Reagent* (Thermo scientific). OD mõõdeti 590nm juures kasutades mikrotiterplaati lugeja POLAR StarOmega (BMG LABTECH). β-galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmiseks lisati 450µl Z-puhvrile (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM β-merkaptotetanool, 0,0005% SDS, pH 7) 50µl rakulüsaati ja inkubeeriti 5min 30°C juures. Seejärel lisati 100µl ONPG lahust ja inkubeeriti 40min 30°C juures. Reaktsioon peatati 250µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lisamisega. Mõõtmiseks kasutati 200µl reaktsiooni lahust ja β-galaktosidaasi aktiivsus mõõdeti lainepikkusel 420nm kasutades mikrotiterplaadi lugejat POLAR StarOmega (BMG LABTECH). Andmete analüüsiks viidi läbi *Student t*-testi (α=0,05). Katset korrati vähemalt kaks korda kolme bioloogilise replikaadiga.



**Joonis 12.** Reporterplasmiidide p281-4-ATG ja p281-4-CTT skeemid. Lillaga on värvitud *GAL1/10* promootor, sinisega juuksenõela struktuur, halliga muudetud 1. ja 2. startkoodid, punasega *URE2* geen, kollasega *lacZ* geen. (A) p281-4-ATG. ATG märgistab sisemist startkoodonit. (B) p281-4-CTT. CTT märgistab müteeritud sisemist startkoodonit. Joonis on koostatud sekveneerimise tulemuste baasil kasutades SnapGene tarkvara.

### **2.2.6. Mutantide stressitaluvuse analüüs tilk-külv meetodil**

Mutantide stressitaluvust analüüsiti tilk-külv meetodiga. Selleks inokuleeriti üksikud kolooniad 4ml YPD vedelsöötmesse ja kasvatati üleöö 30°C juures. Saadud kultuurid lahjendati (OD<sub>600nm</sub>=0,25-0,4) ja kasvatati 10ml YPD vedelsöötmes eksponentsiaalse kasvufaasini. Kultuuridest tehti lahjendused, mis sisaldasid 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 1000 või 200 rakku 1ml kohta. Igast lahjendusest külvati 5µl YPD agar tassidele. Tassid sisaldasid kas 0,03mM CdCl<sub>2</sub>, 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi (Aldrich), 3,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lachner), 0,04mM menadiooni (Aldrich) või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (Aldrich). Kuna menadioon lahjustub DMSO lahuses, siis kasutati kontrollina ka söödet, mis sisaldas 0,022M DMSO-d. Lisaks tehti kontrollkülvamised SC-TRP (0,67% pärmilämmastikaluste segu, 2% glükoos, 0,2% aminohapete segu, kus puudub trüptofaan) tardsöötmetele. Rakke kasvatati 30°C juures 2-3 päeva. Katset korrati vähemalt kaks korda.

Pildistamiseks kasutati kaamerat Seiko Epson Photo PC 3100Z, 3,3 Mpix. Piltide töötlemiseks kasutati programm Adobe Photoshop CS6 ja Adobe Illustrator CS6.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades bitsistronset reportersüsteemi

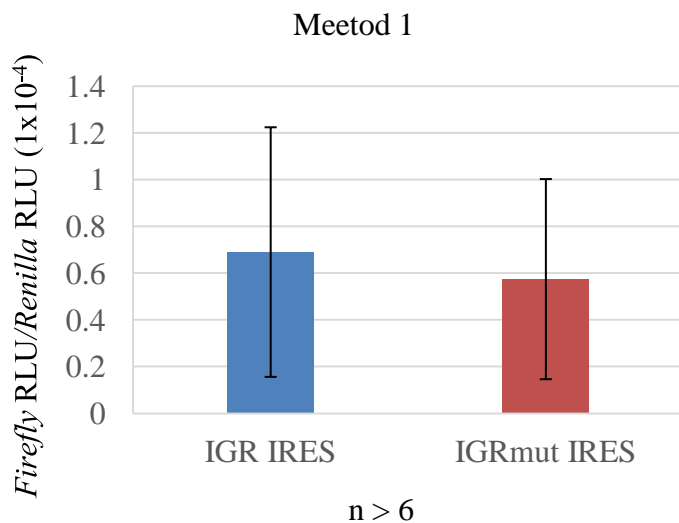
Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüsiks käesolevas töös rakendati bitsistronset reportersüsteemi, mida on varasemalt pagaripärmis kasutatud (Landry *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2001). Reporterplasmiidis pRS316-CrPV IGR on *Renilla* lutsiferaasi translatsioon 7-MGM sõltuv ja *Firefly* lutsiferaasi translatsioon IRES sõltuv (joonis 9). Kahe reporteri vahel asub CrPV IGR IRES järjestus, kus IGR domeen mimikeerib koodon-antikoodon paardumist ja seondub ribosoomi P-saiti initsieerides translatsiooni 7-MGM sõltumatul viisil. Reporterplasmiidis olev IRES elemendi aktiivsusest sõltub *Firefly* lutsiferaasi translatsioon ja seega saab *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse järgi hinnata IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni taset. Kanoonilise, 7-MGM sõltuva translatsiooni initsiatsiooni taset saab hinnata *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse määramisel. Katsetes kasutati kontrolliks plasmidi pRS316-CrPV IGRmut, kus IGR sekundaarstruktuuri PKI (ingl k *pseudoknot I*) on muteeritud ja selle tulemusena IGR IRES ei ole funktsionaalne (Landry *et al.*, 2009). Reporterplasmiid ja kontrolliks kasutatud plasmiid transformeeriti metsiktüübi (WT, Sc309) rakkudesse.

Lutsiferaaside aktiivsuse mõõtmiseks kasvatati rakke ja valmistati rakulüsaadid kahte erinevat meetodit kasutades. Tulemused on esitatud kujul *Firefly* RLU/*Renilla* RLU (RLU, ingl k *Relative light unit*). Andmete analüüsiks viidi läbi *Student* t-testi ( $\alpha=0,05$ ). Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni aktiivsuse mõõtmise tulemused kasutades meetodi 1 on toodud joonisel 14. Esimese meetodi tulemused näitavad, et IGR IRES sõltuv translatsioon toimub väga madalal tasemel, keskmine *Firefly* RLU/*Renilla* RLU metsiktüübi rakkudes on  $(0,69 \pm 0,57) \times 10^{-4}$ . Kontrollina kasutatud reporterplasmidi, mis sisaldab IGRmut IRES järjestust, keskmine *Firefly* RLU/*Renilla* RLU metsiktüübi rakkudes on  $(0,58 \pm 0,42) \times 10^{-4}$  (joonis 13).

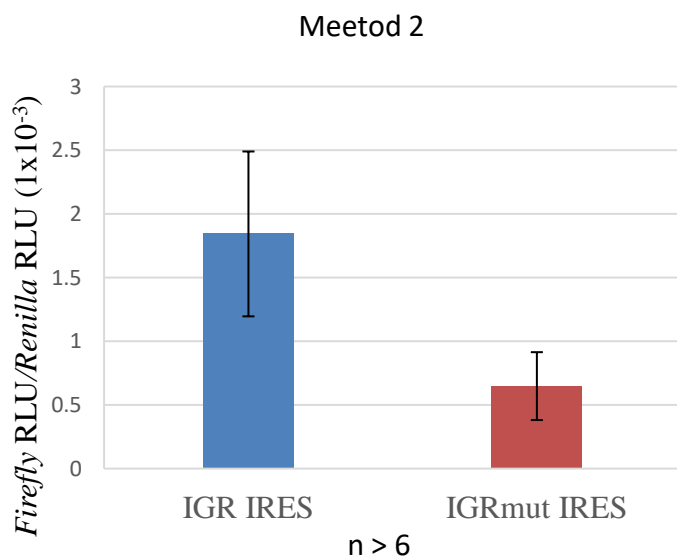
Teise meetodi tulemused näitavad, et IGR IRES sõltuv translatsioon toimub samuti väga madalal tasemel. Keskmine *Firefly* RLU/*Renilla* RLU metsiktüübi rakkudes on  $(1,84 \pm 0,6) \times 10^{-3}$ . Kontrollina kasutatud reporterplasmidi, mis sisaldab IGRmut IRES järjestust, keskmine *Firefly* RLU/*Renilla* RLU metsiktüübi rakkudes on  $(0,64 \pm 0,26) \times 10^{-3}$  (joonis 14).

Mõlemat meetodit kasutades toimus CrPV IGR IRES translatsiooni initsiatsioon väga madalal tasemel. Lisaks, esimest meetodit kasutades reporterplasmidi pRS316-CrPV IGR lutsiferaaside

RLU suhe ei erine kontrollplasmidi pRS316-CrPV IGRmut lutsiferaaside RLU suhest. Seetõttu otsustati *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaasidel põhinevat reportersüsteemi edaspidises töös mitte kasutada.



**Joonis 13.** Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs metsiktüübi rakkudes kasutades bitsistronset reportersüsteemi ja 1. meetodit. Tulemused on esitatud kujul *Firefly* RLU/*Renilla* RLU. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

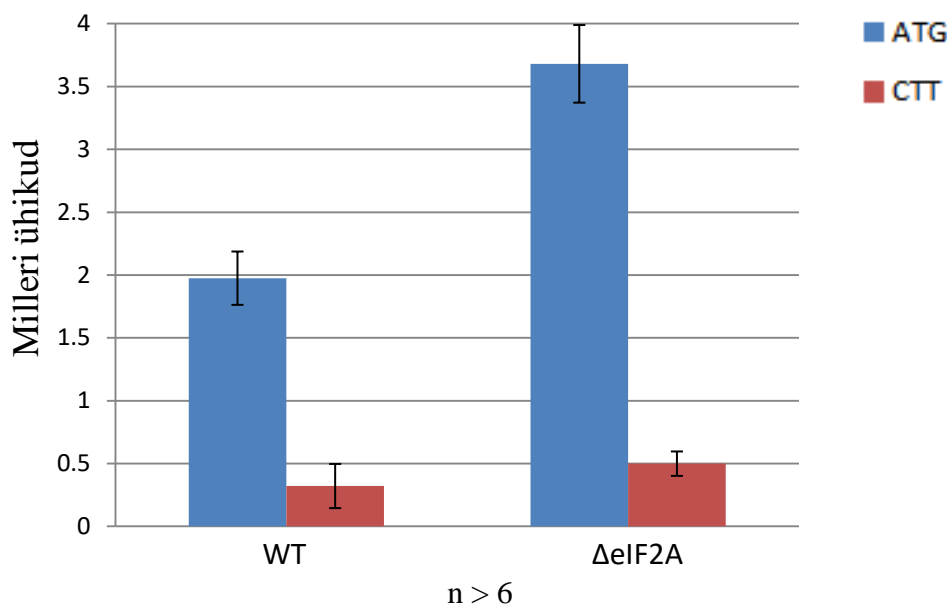


**Joonis 14.** Viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs metsiktüübi rakkudes kasutades bitsistronset reportersüsteemi ja 2. meetodit. Tulemused on esitatud kujul *Firefly* RLU/*Renilla* RLU. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

### 2.3.2. Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs kasutades $\beta$ -galaktosidaasi reportersüsteemi

Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni määramiseks kasutati  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmisel põhinevat reportersüsteemi. Plasmiidis p281-4-ATG paikneb *lacZ* geeni ees *URE2* IRES ning selles järjestuses asuvalt funktsionaalselt AUG koodonilt initsieeritakse translatsioon IRES sõltuvalt (joonis 12). *URE2* IRES-est ülesvoolu paiknev juuksenõela struktuur takistab 7-MGM sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumist. Seega saab  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus määramise abil hinnata IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni taset. Kontrolliks kasutati plasmidi p281-4-CTT, kus AUG startkoodon on asendatud CTT koodoniga, mis ei võimalda IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumist (joonis 12).

Plasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT transformeeriti *S.cerevisiae* tüvedesse WT (Sc309) ja  $\Delta eIF2A$  (Sc466). Eelnevalt on näidatud, et eIF2A deleteerimisel *URE2* IRES sõltuva translatsiooni tase tõuseb (Reineke *et al.*, 2008). Milleri ühikute arvutamiseks mõõdeti lüsaatides totaalse valgu kontsentratsioon ja määrati  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus. Andmete analüüsiks kasutati *Student* t-testi ( $\alpha=0,05$ ). Saadud tulemused näitavad, et deleteerides eIF2A on *URE2* IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon 1,8 korda kõrgem kui metsiktüübis (joonis 15, ATG). Mõlemas tüves jääb muteeritud AUG koodoniga IRES-e aktiivsus madalaks, mis näitab, et just see AUG startkoodon on oluline translatsiooni initsiatsioonil (joonis 15, CTT). Saadud tulemused on kooskõlas eelnevalt avaldatud andmetega (Reineke *et al.*, 2008). *URE2* IRES-el põhinevat reportersüsteemi kasutati IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüsiks ribosoomi alaühikutevaheliste sildade deletsioonimutantides.



**Joonis 15.** Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs metsiktüübi (WT) ja  $\Delta eIF2A$  rakkudes. ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-CTT. Tulemused on toodud Milleri ühikutes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

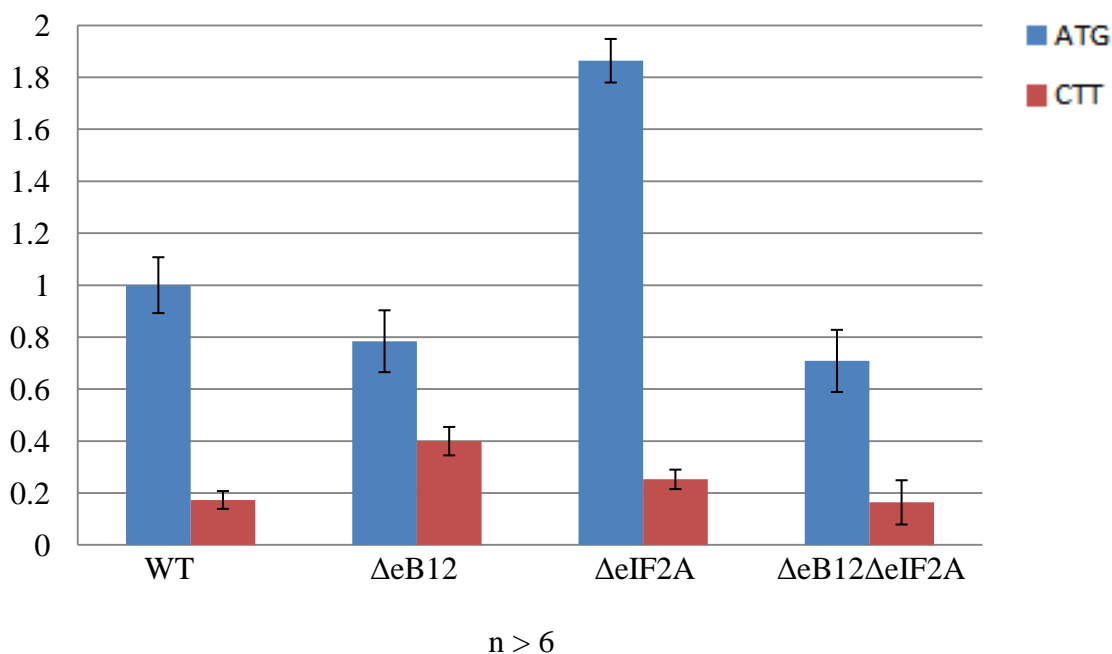
### 2.3.2.1. Ribosoomi alaühikutevahelise silla eB12 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil

Eukarüoodi spetsiifiline sild eB12 asub ribosoomi alaühikutevahelise kontaktpiirkonna perifeerses alas ja selle põhistruktuuri määrab 60S suure alaühiku eL19 valgu C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi interaktsioon 40S väikese alaühiku 18S rRNA tsentraalse domeeni lisasegmendiga ES6 (joonis 3). Mutandis  $\Delta eB12$  on pärmigenoomist deleteeritud eL19 kodeerivad geenid ning plasmiidilt ekspresseerub eL19 variant, millel puudub silda moodustav järjestus.

eB12 puudumise mõju uurimiseks IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioonile transformeeriti plasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT *S.cerevisiae* tüvedesse WT (Sc309),  $\Delta eB12$  (Sc360),  $\Delta eIF2A$  (Sc466) ja  $\Delta eB12\Delta eIF2A$  (Sc579). Saadud tüvede rakulüsaatidest mõõdeti totaalse valgu kontsentratsioon, määrati  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse ning arvutati Milleri ühikud.

Katsetulemused näitavad, et mutandis  $\Delta eB12$  on IRES sõltuv translatsioon langenud 20% võrreldes metsiktüübi rakkudega (joonis 16,  $\Delta eB12$ ). Mutandi  $\Delta eB12\Delta eIF2A$  IRES sõltuv translatsioon on langenud 30% võrreldes metsiktüübiga ja on 60% väiksem võrreldes  $\Delta eIF2A$  tüvega (joonis 16,  $\Delta eB12\Delta eIF2A$ ). Tulemustest järeldub, et eB12 silla puudumisel väheneb

IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon ning eIF2A deletsiooni positiivne mõju *URE2* IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonile kaob.



**Joonis 16.** Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüs metsiktüübis ja mutantides:  $\Delta eB12$ ,  $\Delta eIF2A$  ja  $\Delta eB12\Delta eIF2A$ . ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plasmidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plasmidi p281-4-CTT. Tulemused on normaliseeritud p281-4-ATG plasmidi sisaldava metsiktüübi suhtes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

### 2.3.2.2. eL24 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil

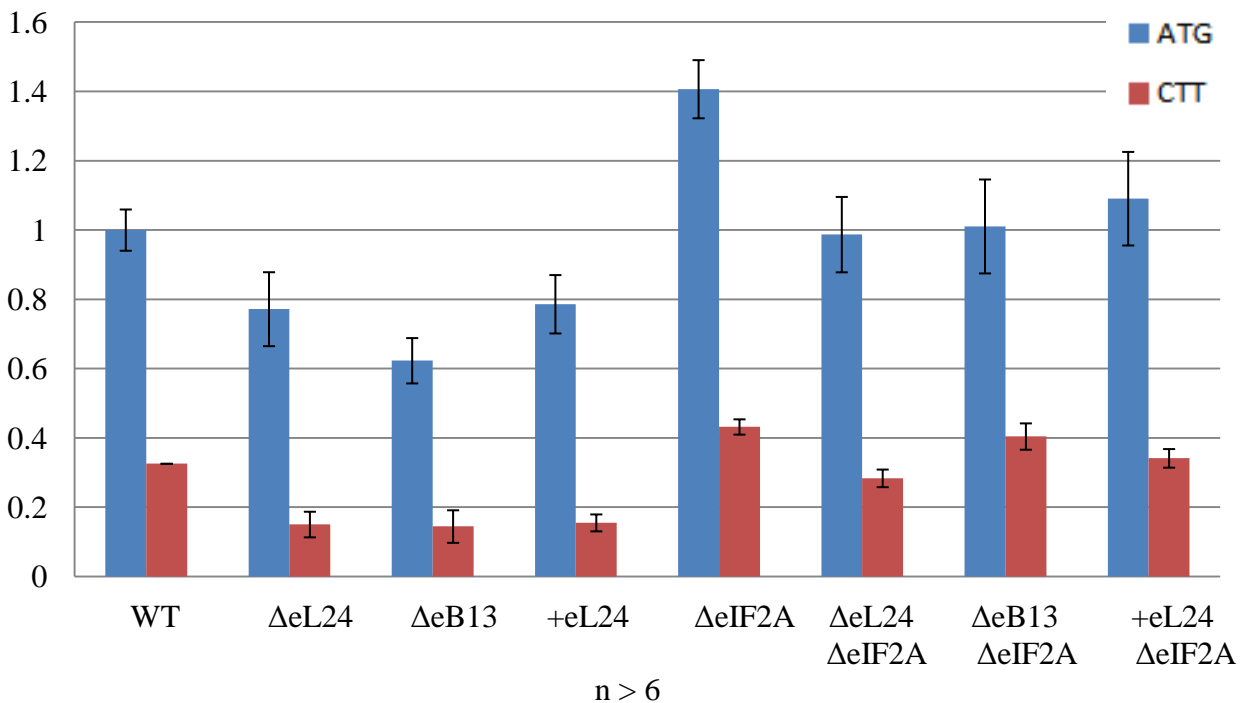
Pagaripärmi valk eL24 on kodeeritud kahe paroloogi *RPL24A* ja *RPL24B* poolt ning ei ole eluks hädavajalik. Seega on võimalik konstrueerida pärmitüvi, kelle ribosoomides puudub eL24 (Sc488). Eukarüoodi spetsiifiline sild eB13 asub ribosoomi alaühikutevahelise kontaktpiirkonna perifeerses alas ja selle põhistruktuuri määrab 60S suure alaühiku eL24 valgu C-terminaalse  $\alpha$ -heeliksi interaktsioon väikese alaühiku valguga eS6. Mutandis  $\Delta eB13$  on genoomist deleteeritud eL24 kodeerivad geenid ning plasmiidilt ekspresseerub eL24 variant, millel puudub silda moodustav järjestus.

Valgu eL24 või silla eB13 olulisuse uurimiseks IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil transformeeriti plasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT *S.cerevisiae* tüvedesse Sc488 ja Sc589. Lisaks reporterplasmiididele transformeeriti nendesse tüvedesse ka plasmiidid, millelt

ekspreseerus metsiktüüpi eL24 (tähistatud +eL24) või eL24 variant, mis ei ole võimeline silda moodustama (tähistatud  $\Delta eB13$ ). Kontrolltüvedena kasutati WT (Sc309) ja  $\Delta eIF2A$  (Sc466) tüvesid. Rakulüsaate analüüsiti eelpool kirjeldatud meetodeid kasutades. Andmete analüüsiks kasutati *Student t*-testi ( $\alpha=0,05$ ).

Katsetulemused näitavad, et mutantides  $\Delta eL24$  ja  $\Delta eB13$  on IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon langnud 20% võrreldes metsiktüübiga (joonis 17;  $\Delta eL24$ ,  $\Delta eB13$ ). Samuti oli IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioon langenud tüves, milles ekspreseerus metsiktüüpi eL24 (joonis 17; +eL24). Andmete analüüs näitas, et saadud tulemused ei erine üksteisest statistiliselt.

Mutantide  $\Delta eL24\Delta eIF2A$  ja  $\Delta eB13\Delta eIF2A$  IRES sõltuv translatsiooni initsiatsiooni on sarnane metsiktüübiga, aga jääb 30% madalamaks kui mutandis  $\Delta eIF2A$  (joonis 17;  $\Delta eL24\Delta eIF2A$ ,  $\Delta eB13\Delta eIF2A$ ). Ka  $\Delta eL24\Delta eIF2A$  rakkudes, kus metsiktüüpi eL24 ekspresseerus plasmiidilt, translatsiooni initsiatsioon ei taastunud (joonis 17, +eL24 $\Delta eIF2A$ ). Saadud tulemused näitavad, et valgu eL24 ning silla eB13 puudumisel väheneb IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioon ja eIF2A deleteerimisel tekkinud positiivne mõju *URE2* IRES sõltuvale translatsioonile säilib.



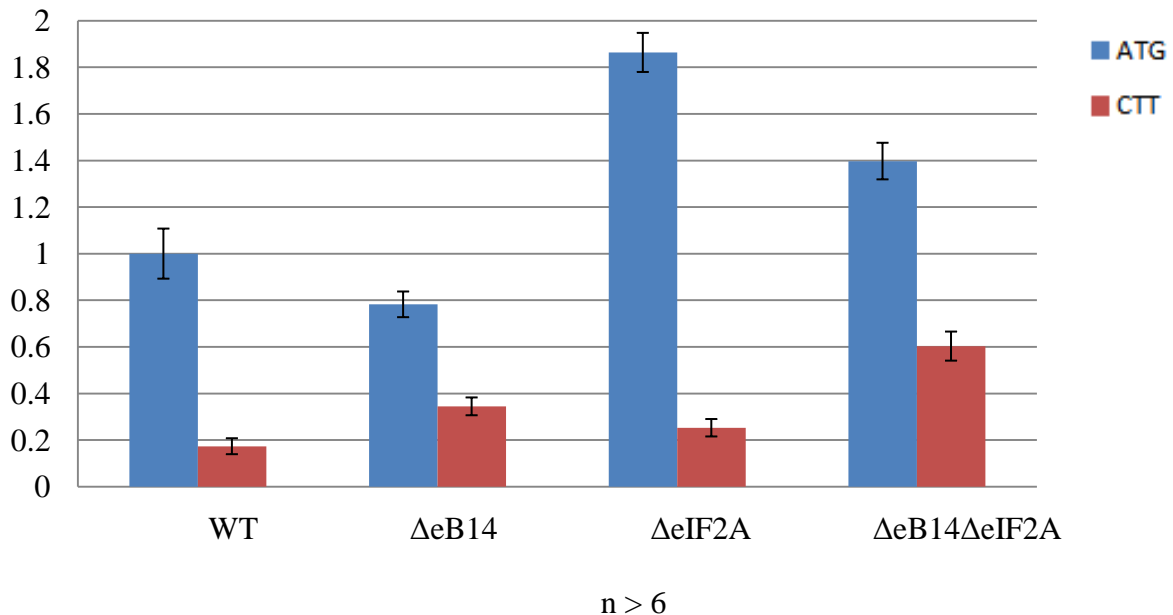
**Joonis 17.** IRES sõltuva translatsiooni tase metsiktüübis ja mutantides:  $\Delta eL24$ ,  $\Delta eIF2A$  ja  $\Delta eL24\Delta eIF2A$ .  $\Delta eB13$  tüvi sisaldab lisaks pRS314 24<sub>1-65</sub> ja selles puudub eB13 sild, eL24 tüvi sisaldab pRS314 24A plasmidi. ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plasmidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plasmidi p281-4-CTT. Tulemused on normaliseeritud p281-4-ATG plasmidi sisaldava metsiktüübi suhtes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

### 2.3.2.3. Ribosoomi alaühikutevahelise silla eB14 olulisus IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil

eB14 on eukarüoodi spetsiifiline sild, mis paikneb alaühikutevahelise kontaktpiirkonna tsentraalses alas ja selle põhistruktuuri määravad kontaktid valgu eL41 ja 18S rRNA heeliksiite h27, h44, h45 vahel (joonis 5). Valk eL41 on kodeeritud kahe paraloogi poolt *RPL41A* ja *RPL41B* ning ei ole eluks hädavajalik. eL41 kodeerivate geenide deletsioonil saadud tüves Sc532 ei moodustu ribosoomi alaühikute vahel silda eB14.

Silla eB14 olulisuse uurimiseks IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonile transformeeriti plasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT *S.cerevisiae* tüvedesse: WT (Sc309),  $\Delta eB14$  (Sc532),  $\Delta eIF2A$  (Sc466) ja  $\Delta eB14\Delta eIF2A$  (Sc581). Saadud tüvede rakulüsaatides määrati  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus, mõõdeti totaalse valgu kontsentratsioon ning arvutati Milleri ühikud.

Katsetulemused näitavad, et mutandis  $\Delta eB14$  on IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioon langenud 20% võrreldes metsiktüübiga (joonis 18,  $\Delta eB14$ ).  $\Delta eB14\Delta eIF2A$  mutandis on IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioon langenud 20% võrreldes  $\Delta eIF2A$  tüvega (joonis 18,  $\Delta eB14\Delta eIF2A$ ). Sellest võib järeldada, et  $eB14$  deletsioonimutandis  $eIF2A$  deleteerimisel säilib positiivne mõju IRES sõltuval translatsioonile ja  $eB14$  silla puudumine mõjutab vähesel määral IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni.

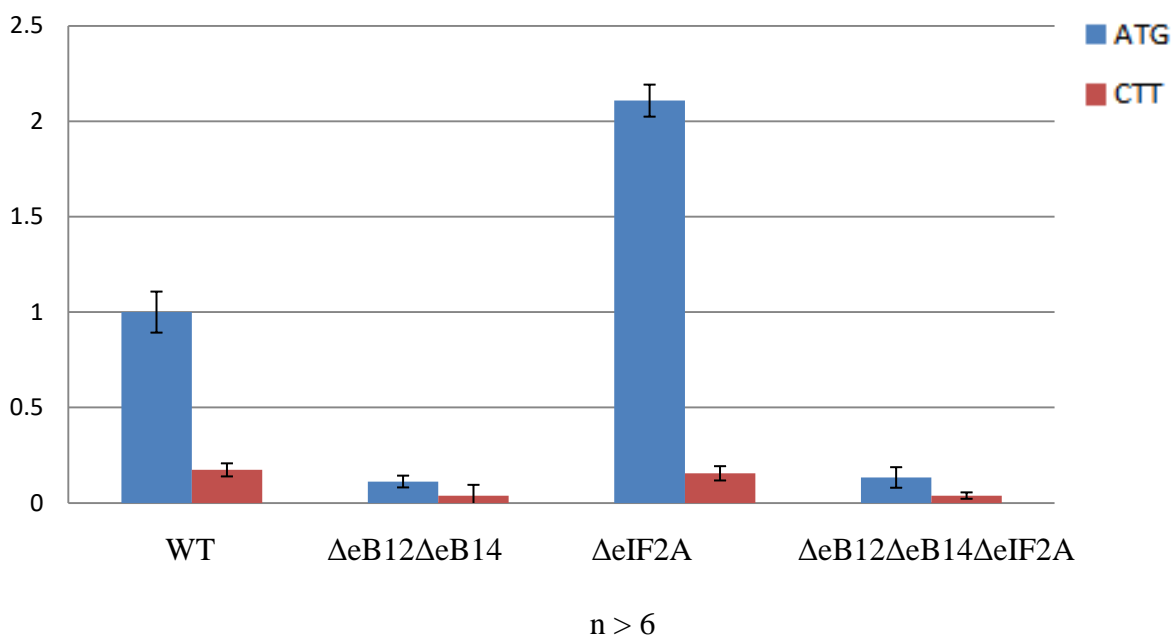


**Joonis 18.** IRES sõltuva translatsiooni tase metsiktüübis ja mutantides:  $\Delta eB14$ ,  $\Delta eIF2A$  ja  $\Delta eB14\Delta eIF2A$ . ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-CTT. Tulemused on toodud p281-4-ATG plamiidi sisaldava metsiktüve suhtes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

#### 2.3.2.4. $eB12$ ja $eB14$ sildade mõju IRES sõltuval translatsioonile

Lisaks üksikute ribosoomi alaühikutevaheliste sildade olulisuse uurimisele analüüsiti ka kahe silla puudumise mõju *URE2* IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonile. Sildade  $eB12$  ja  $eB14$  puudumise mõju uurimiseks transformeeriti reporterplasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT *S.cerevisiae* tüvedesse  $\Delta eB12\Delta eB14$  (Sc572) ja  $\Delta eB12\Delta eB14\Delta eIF2A$  (Sc600). Kontrolltüvedena kasutati WT (Sc309) ja  $\Delta eIF2A$  (Sc466) tüvesid. Rakulüsaate analüüsiti eelpool kirjeldatud meetodeid kasutades.

Katsetulemused näitavad, et mutantides  $\Delta eB12\Delta eB14$  ja  $\Delta eB12\Delta eB14\Delta eIF2A$  puudub IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon (joonis 19;  $\Delta eB12\Delta eB14$ ,  $\Delta eB12\Delta eB14\Delta eIF2A$ ). Nendes tüvedes mõõdetud IRES-e aktiivsused on samasugused kui kontrollina kasutatud muteeritud IRES-e aktiivsused. Sellest järeldub, et ribosoomid, millel puuduvad sillad eB12 ja eB14 ei ole võimelised IRES elemendilt valgu sünteesi alustama.

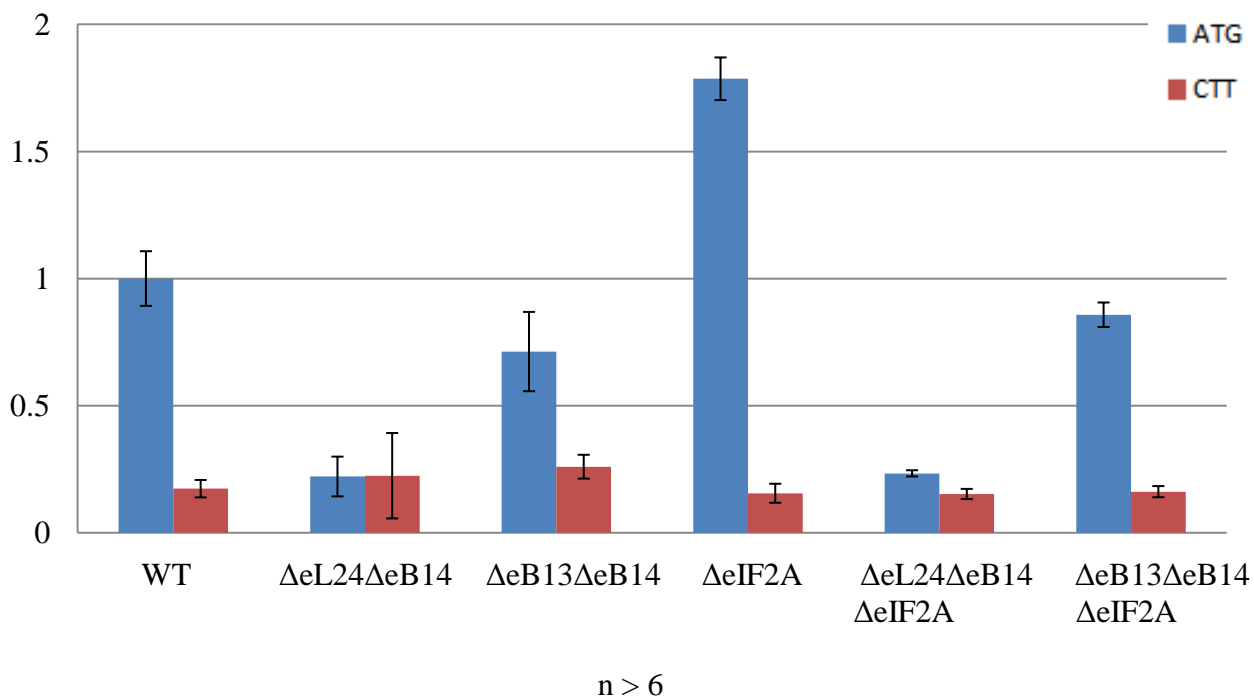


**Joonis 19.** IRES sõltuva translatsiooni tase metsiktüübis ja  $\Delta eB12\Delta eB14$  deletsioonimutandis. ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-CTT. Tulemused on toodud p281-4-ATG plamiidi sisaldava metsiktüve suhtes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

### 2.3.2.5. Valgu eL24 mutantide ja silla eB14 puudumise mõju IRES sõltuvale translatsiooni initsiatsioonile

Kuna ribosoomi valk eL24 ei ole eluks hädavajalik, siis on võimalik uurida kuidas mõjutavad IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni valgu eL24 ja silla eB14 puudumine või sildade eB13 ja eB14 puudumine. Selleks transformeeriti reporterplasmiidid p281-4-ATG ja p281-4-CTT *S.cerevisiae* tüvedesse Sc580 ja Sc598. Lisaks reporterplasmiididele transformeeriti nendesse tüvedesse ka plasmiid, millelt ekspresseerus eL24 variant, mis ei ole võimeline silda moodustama (tähistatud  $\Delta eB13$ ). Kontrollidena kasutati metsiktüüpi (Sc309) ja  $\Delta eIF2A$  (Sc466) tüvesid.

Katsetulemused näitavad, et valgu eL24 ja silda eB14 puudumisel ei toimu rakkudes IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni (joonis 20;  $\Delta eL24\Delta eB14$ ,  $\Delta eL24\Delta eB14\Delta eIF2A$ ). Sildade eB13 ja eB14 puudumisel langeb IRES sõltuva translatsiooni tase 30% võrreldes metsiktüübiga. Nende sildade puudumisel ei suurenda eIF2A deletsioon IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni oluliselt (joonis 20;  $\Delta eB13\Delta eB14$ ,  $\Delta eB13\Delta eB14\Delta eIF2A$ ). Tulemustest saab järeldada, et ribosoomid, millel puuduvad valk eL24 ja sild eB14, ei ole võimelised IRES elemendilt valgu sünteesi alustama.



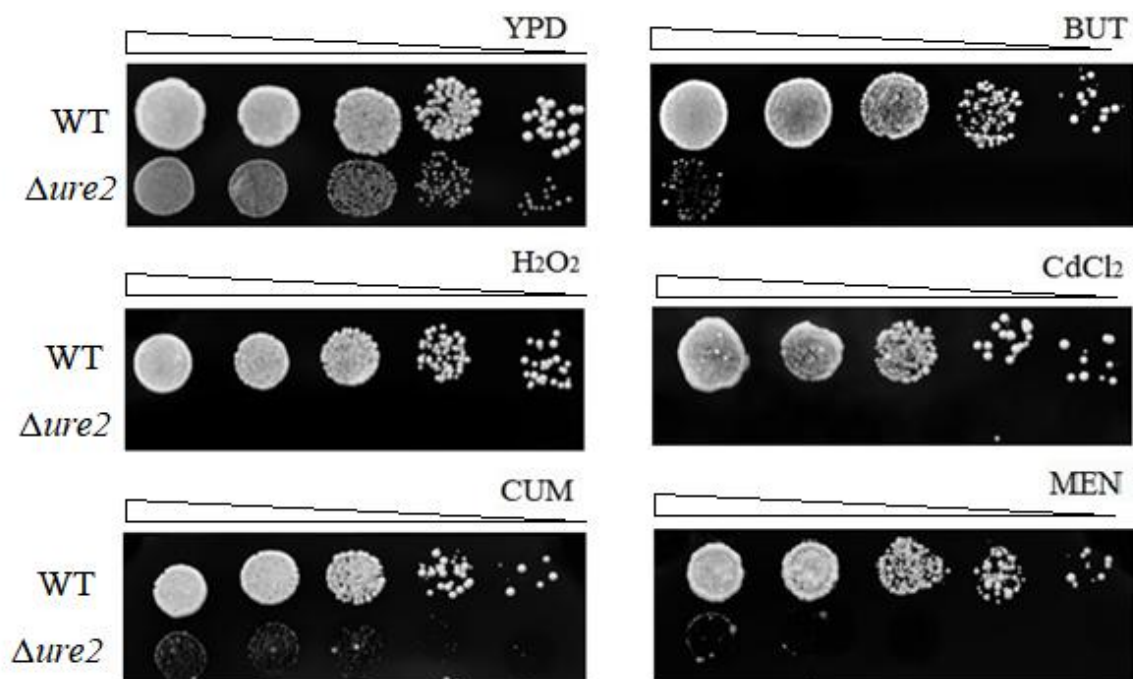
**Joonis 20.** IRES sõltuva translatsiooni tase metsiktüübis ja mutantides:  $\Delta eL24\Delta eB14$ ,  $\Delta eIF2A$  ja  $\Delta eL24\Delta eB14$ .  $\Delta eB13\Delta eB14$  tüvi sisaldab pRS314 24<sub>1-65</sub> ja selles puudub eB13 sild. ATG tähistab funktsionaalse *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-ATG; CTT tähistab mittetöötava *URE2* IRES-ega plamiidi p281-4-CTT. Tulemused on toodud p281-4-ATG plamiidi sisaldava metsiktüve suhtes. n tähistab väiksemat analüüsiks kasutatud kultuuride arvu.

### 2.3.3. Eukariöodi spetsiifiliste sildade mutantide stressitaluvuse analüüs tilk-külv meetodil

Eelnevalt on teada, et Ure2p valk osaleb raskemetalli või oksüdatiivse stressi vastuses (Courchesne *et al.*, 1988; Rai ja Cooper, 2005). Püstitati hüpotees, et stressi korral surutakse pagaripärmi rakkudes üldine translatsioon maha ja Ure2p täispikka valku 7-MGM sõltuval viisil

ei transleerita. Transleeritakse Ure2p lühem valk IRES sõltuval viisil. Juhul, kui käesolevas töös uuritud ribosoomi alaühikutevahelised sillad on olulised IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioonil, siis stressi tingimustes võib sildade puudumine mimikeerida  $\Delta ure2$  mutandi fenotüüpi.

Katsetingimuste kontrollimiseks kasutati mutanti  $\Delta ure2$  ja metsiktüüpi tüve. Analüüsiks kasutati  $CdCl_2$ , tert-butüül hüdroperoksiidi,  $H_2O_2$ , menadiooni või kumeen hüdroperoksiidi. Metsiktüüpi tüvi kasvab sarnaselt rikkal ja analüüsiks kasutatud stressi tekitavaid kemikaale sisaldaval söötmel (joonis 21). Mutant  $\Delta ure2$  kasvab rikkal söötmel (YPD) aeglasemalt kui metsiktüüp. Samasugust fenotüüpi on  $\Delta ure2$  puhul kirjeldatud ka suurte mutandi kollektsioonide kasvukiiruste analüüsil (Yoshikawa *et al.*, 2011). Rakud, mille genoomist on deleteeritud *URE2*, ei ole võimelised kasvama söötmel, mis sisaldasid kas 0,03mM  $CdCl_2$ , 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi, 3,5mM  $H_2O_2$ , 0,04mM menadiooni või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (joonis 21). Kuna menadioon lahjustub DMSO lahuses, siis kasutati kontrollina ka söödet, mis sisaldas 0,022M DMSO-d. Ainult DMSO lisamine söötmesse ei mõjuta mutandi  $\Delta ure2$  kasvu (lisa 4).



**Joonis 21.** Metsiktüüpi rakkude ja mutandi  $\Delta ure2$  raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 päeva 30°C juures rikkal söötmel, mis sisaldas kas 0,03mM  $CdCl_2$ , 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi (BUT), 3,5mM  $H_2O_2$ , 0,04mM menadiooni (MEN) või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (CUM).

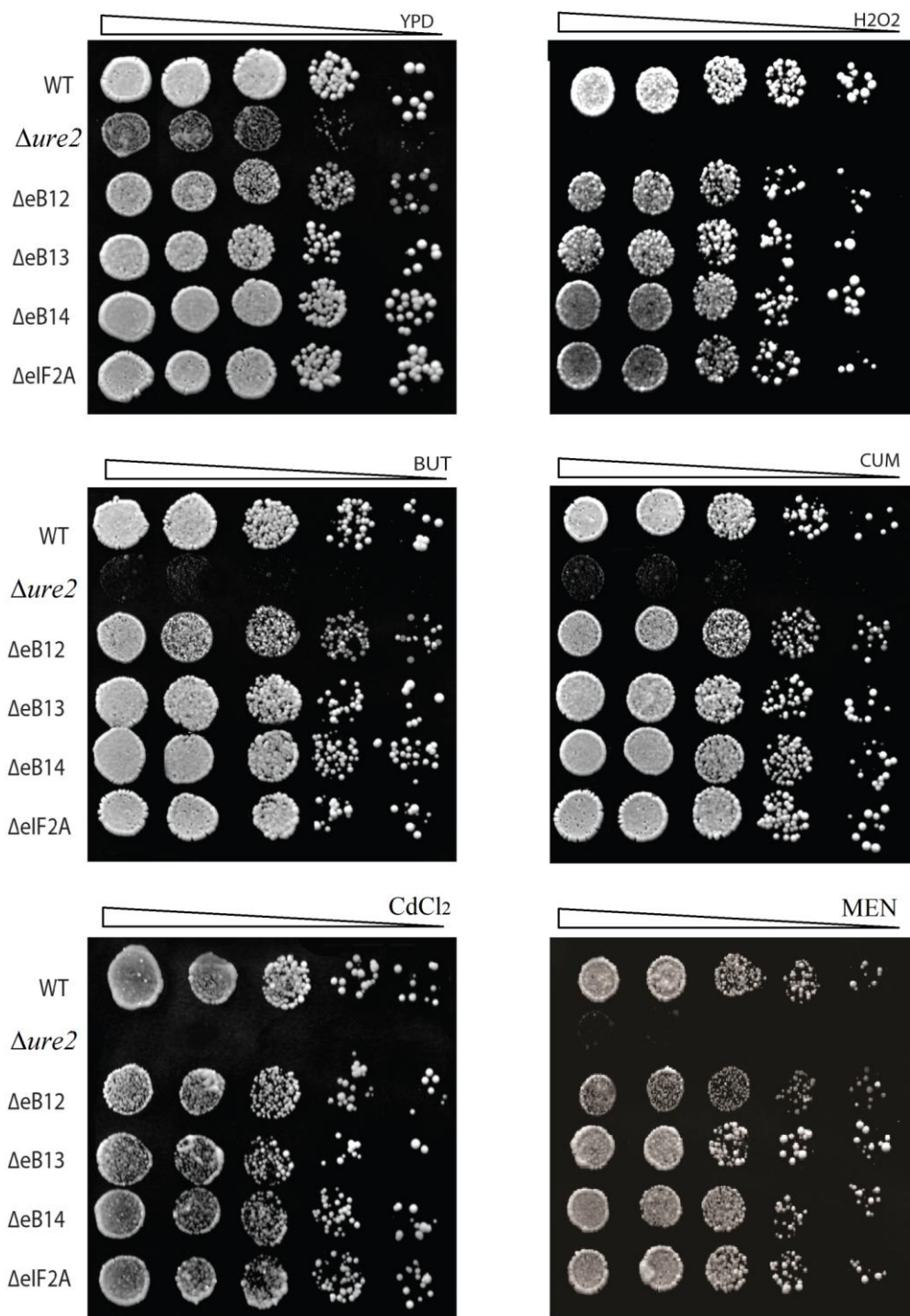
Sildade deletsioonimutantide raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikust analüüsiti tilk-külv meetodiga. Tundlikkuse analüüsiks kasutati tasse, mis sisaldasid kas  $CdCl_2$ , tert-butüül hüdroperoksiidi,  $H_2O_2$ , menadiooni või kumeen hüdroperoksiidi. Kuna menadioon lahjustub DMSO lahuses, siis kasutati kontrollina ka söödet, mis sisaldas 0,022M DMSO-d. Ainult DMSO lisamine söötmesse ei mõjutanud uuritud mutantide kasvu (lisa 4).

Tüved, kus puudub kas eB12 (Sc360), eB13 (Sc488, kus ekspresseerub vastav eL24 valgu variant) või eB14 (Sc532) sild, ei ole tundlikud  $CdCl_2$  ja oksüdatiivset stressi põhjustavate kemikaalide suhtes (joonis 22). Samuti ei ole tundlik tüvi, kus on deleteeritud eIF2A initsiatsioonifaktor (joonis 22). Seega ei mõjuta eB12, eB13, eB14 või eIF2A puudumine rakkude võimet tulla toime raskemetalli või oksüdatiivse stressiga.

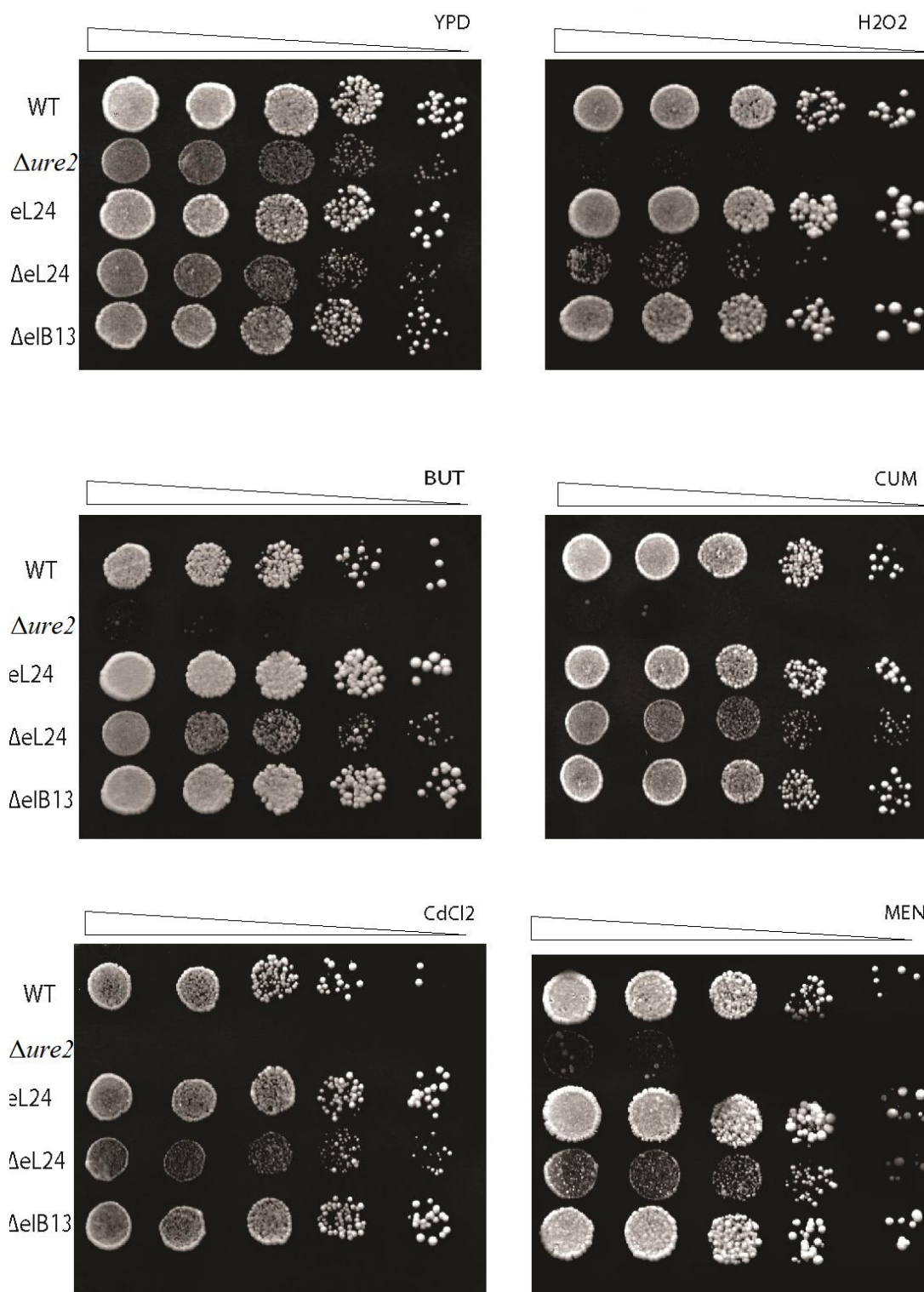
Valgu eL24 mutantide fenotüüpide analüüsimiseks transformeeriti tüvesse  $\Delta eL24$  plasmiidid, mis ekspresseerisid kas metsiktüüpi eL24 valku või eL24 varianti, millel puudub eB13 silda moodustav region. Plasmidi olemasolu kontrolliti selektsioonitassidel SC-TRP (lisa 3). Saadud

tüvede tundlikkust analüüsiti tilk-külv meetodil. Selgus, et rakud, kus puudub eL24 on tundlikud  $H_2O_2$  suhtes (joonis 23). Rakud, kus puudub eB13 sild või kus ekspresseerub metsiktüüpi eL24, kasvavad  $H_2O_2$  sisaldaval söötmel sarnaselt YPD söötmega. Raskemetalli  $CdCl_2$  ja teiste oksüdatiivse stressi tekitajate olemasolu kasvukeskkonnas ei mõjutanud eL24 mutantide kasvu. Katsetulemusest võib järeldada, et eL24 valgu olemasolu on oluline  $H_2O_2$  poolt tekitatud stressiga toimetulekuks.

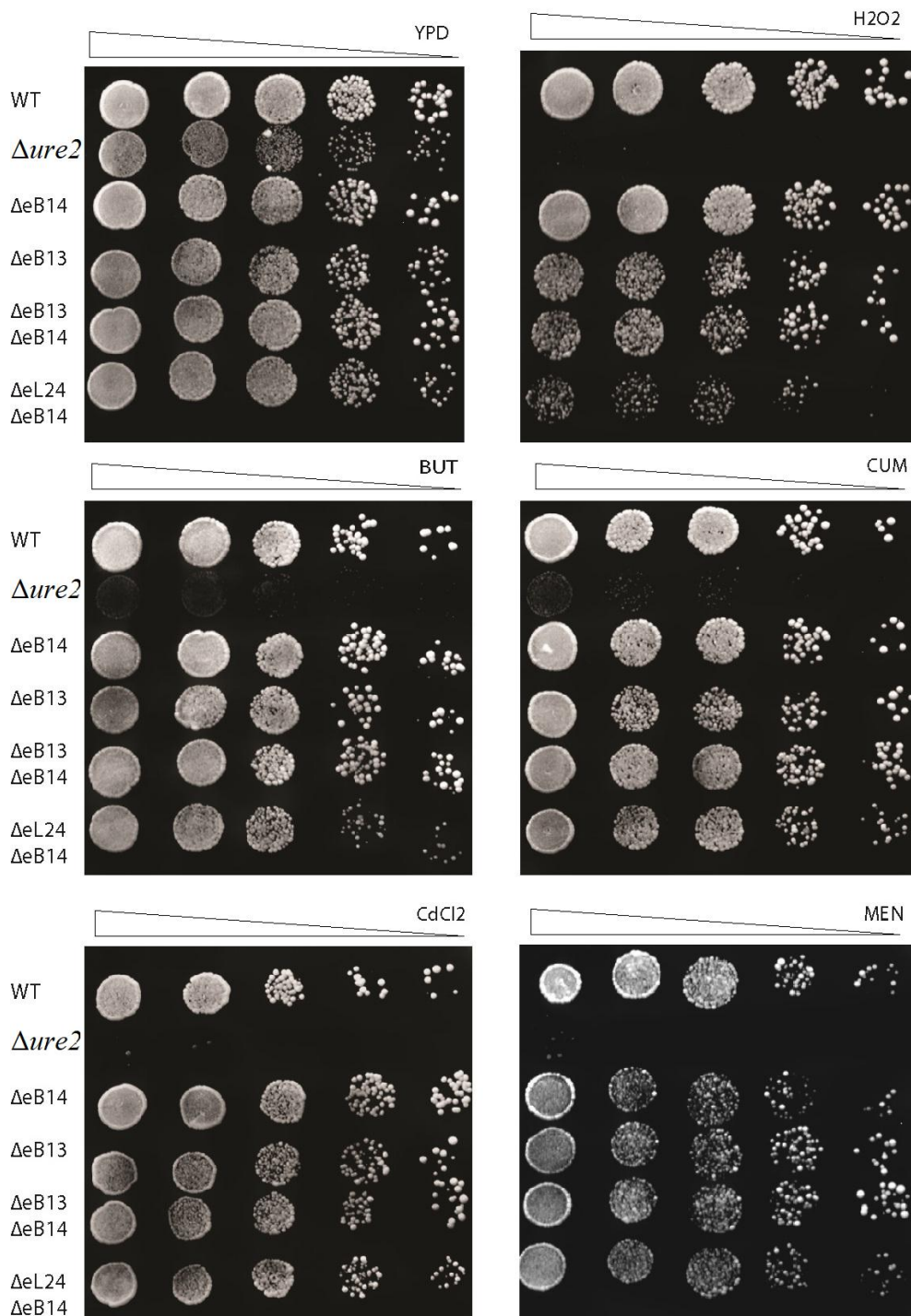
Analüüsiti ka mutantide, kus puuduvad valk eL24 ja sild eB14 või sillad eB13 ja eB14, tundlikkust raskemetalli  $CdCl_2$  või oksüdatiivse stressi suhtes (joonis 24). Katsetulemused näitavad, et rakud, kus on deleleeritud eL24 valk ja eB14 sild kasvavad  $H_2O_2$  sisaldaval söötmel aeglasemalt kui rikkal söötmel. Raskemetalli  $CdCl_2$  ja teiste oksüdatiivse stressi tekitajate lisamine uuritud mutantide kasvu ei mõjutanud.



**Joonis 22.** Metsiktüüpi rakkude ja mutantide  $\Delta ure2$ ,  $\Delta eB12$ ,  $\Delta eB13$ ,  $\Delta eB14$  või  $\Delta eIF2A$  raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Analüüsil kasutati rikka tardsöötmeega tase, mis sisaldasid kas 0,03mM CdCl<sub>2</sub>, 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi (BUT), 3,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,04mM menadiooni (MEN) või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (CUM).



**Joonis 23.** Raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodiga. Analüüsiti  $\Delta eL24$  ja  $\Delta eB13$  mutante. Analüüsil kasutati rikka tardsöötmege tase, mis sisaldasid kas 0,03mM CdCl<sub>2</sub>, 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi (BUT), 3,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,04mM menadiooni (MEN) või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (CUM).



**Joonis 24.** Raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodiga. Analüüsiti  $\Delta eB14$ ,  $\Delta eB13$ ,  $\Delta eL24\Delta eB14$  mutante.  $\Delta eB13\Delta eB14$  tüves ekspresseeritakse plasmidi pRS314 24<sub>1-65</sub>, mis sisaldab eL24 geeni esimesed 65 nukleotiidi ja selles tüves puudub eukarüoodi spetsiifilise sild eB13. Analüüsil kasutati rikka tardsöötme tase, mis sisaldasid kas 0,03mM CdCl<sub>2</sub>, 1mM tert-butüül hüdroperoksiidi (BUT), 3,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,04mM menadiooni (MEN) või 0,3mM kumeen hüdroperoksiidi (CUM).

## 2.4. Arutelu

Pagaripärmi 80S ribosoomi kristallstruktuuri järgi on kirjeldatud 17 alaühikutevahelist silda, millest 5 on eukarüoodi spetsiifilised (Ben-Shem *et al.*, 2011). Käesolev töö on üks osa suuremast uurimisprojektist, kus vaadeldakse eukarüoodi spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 olulisust ribosoomi funktsioneerimisel. Töö esimeses osas uuriti nende kolme eukarüoodi spetsiifilise silla mõju IRES sõltuvale translatsiooni initsiatsioonile. Töö teises osas analüüsiti nende sildade olulisust raskemetalli või oksüdatiivse stressiga toimetulekul.

IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni on vähe uuritud ning selle täpne toimemehhanism ja tingimused ei ole veel selged. Eukarüootsetes rakkudes on eelistatud 7-MGM sõltuv translatsiooni initsiatsioon ning 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsioon toimub madalal tasemel. Selleks, et uurida 7-MGM sõltumatu translatsiooni initsiatsiooni kasutakse erinevaid reportersüsteeme.

Käesolevas töös kasutati viiruselise IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni uurimiseks plasmidi, mis sisaldas CrPV IGR IRES struktuuri (joonis 11). Varasemalt on seda reportersüsteemi pagaripärmis kasutatud (Landry *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2001). CrPV IGR domeen mimikeerib koodon-antikoodon paardumist ja seondub ribosoomi P-saiti konkureerides peremeesraku mRNA-dega (Wickner *et al.*, 2013). Pagripärmi nakatavad dsRNA genoomiga viirused. Nendre viiruste mRNA 5' otsas on 7-MGM struktuur, mistõttu on viiruseliste polüproteiinide translatsiooni initsiatsioon 7-MGM sõltuv (Jan, 2006). Antud töös ei suudetud korrata CrPV IGR reporterplasmiidiga saadud juba avaldatud tulemusi. Katsetes kasutati erinevaid protokolle rakkude kasvatamiseks, rakulüsaadi valmistamiseks ja lutsiferaaside aktiivsuse mõõtmiseks. Vaatamata sellele jäi IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni tase väga madalaks. Võib oletada, et kasutatud viiruseline IRES element ei ole loomulikult transleeritav pagaripärmis. Võimalik, et IGR struktuur ei saa efektiivselt konkureerida pagaripärmi rakuliste mRNA-dega, kui üldine translatsioon rakkudes ei ole maha surutud. Väga madala IRES sõltuva translatsiooni taseme ja suure standarthalbe tõttu otsustati edaspidises töös kasutada *URE2* IRES-el põhinevat reportersüsteemi.

Eukarüootse IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni määramiseks kasutati *URE2* mRNA baasil konstrueeritud reportersüsteemi. *URE2* on pagaripärmi geen, mille mRNA-l on kirjeldatud funktsionaalne IRES struktuur (Komar *et al.*, 2003). Töös kasutatud reporterplasmiidis p281-4-ATG paikneb *lacZ* geeni ees *URE2* IRES ning selles järjestuses asuvalt funktsionaalselt AUG

koodonilt initsieeritakse translatsioon IRES sõltuvalt (joonis 13). *URE2* IRESest ülesvoolu paiknev juuksenõela struktuur takistab 7-MGM sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumist. Seega saab hinnata  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus määramise abil IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni taset. Kontrolliks kasutati plasmidi p281-4-CTT, kus AUG startkoodon on asendatud CTT koodoniga, mis ei võimalda IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumist (joonis 13).

Eelnevalt on teada, et eIF2A deleteerimisel *URE2* IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni tase tõuseb (Komar *et al.*, 2005). Antud töös saadud tulemused näitasid, et rakkudes, kus on deleteeritud eIF2A, on *URE2* IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon 1,8 korda kõrgem kui metsiktüübis. Saadud tulemused on kooskõlas avaldatud andmetega (Reineke *et al.*, 2008). *URE2* IRES-el põhinevat reportersüsteemi kasutati IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni analüüsiks ribosoomi alaühikutevaheliste sildade deletsioonimutantides.

$\Delta$ eB12,  $\Delta$ eB13 ja  $\Delta$ eB14 mutantidel on IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon langenud 20% võrreldes metsiktüübi rakkudega (joonised 16-18). Katsetulemustest järeldub, et ühe alaühikuvahelise ribosomalse silla deleteerimisel IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon on viiendiku võrra vähenenud.

$\Delta$ eB13 $\Delta$ eIF2A ja  $\Delta$ eB14 $\Delta$ eIF2A mutantides oli IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon kõrgem kui  $\Delta$ eB13 ja  $\Delta$ eB14 mutantide rakkudes (joonis 17, joonis 18). Samas,  $\Delta$ eB12 $\Delta$ eIF2A mutandi IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon on langenud 10% võrreldes  $\Delta$ eB12 mutandi rakkudega (joonis 16). Katsetulemustest järeldub, et eB13 ja eB14 deletsioonimutandis eIF2A deleteerimisel säilib positiivne mõju IRES sõltuvale translatsiooni initsiatsioonile ning eB12 deletsioonimutantides positiivne mõju kaob.

Mutantides  $\Delta$ eL24,  $\Delta$ eB13 ja  $\Delta$ eL24 $\Delta$ eIF2A,  $\Delta$ eB13 $\Delta$ eIF2A on IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon langenud 20% võrreldes kontrolltüvedega. IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon ei taastu kontrolltüvede tasemele kui eelmainitud mutantides ekspresseerida plasmiidilt metsiktüüpi eL24. Kasutatud plasmiid sisaldas *RPL24A* geeni. Võimalik, et efektiivseks IRES sõltuva translatsiooni initsiatsiooni toimumiseks on vajalik rakkudes funktsionaalne paraloog *RPL24B* või mõlema geeni ekspressioon.

Kui deleteerida sillad eB12 ja eB14 või valk eL24 ja sild eB14, siis IRES sõltuv translatsiooni aktiivsus kaob (joonis 19). Saadud tulemused näitavad, et eB14 muutub oluliseks IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil, kui ribosoomides puudub eB12 sild või eL24 valk.

Sildade eB13 ja eB14 deletsioonimutantides langeb IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon 30% võrreldes metsiktüübi rakkudega (joonis 20). Mutantides, kus puudus kas eB13 või eB14 sild langes IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon samuti 20-30% (joonis 17, joonis 18). Sellest võib järeldada, et eB13 ja eB14 sildadel puudub kooperatiivne mõju IRES sõltuvale translatsiooni initsiatsioonile.

Töö teises osas analüüsiti alaühikutevaheliste sildade deletsioonimutantide raskemetalli või oksüdatiivse stressi tundlikust tilk-külv meetodiga. Eelnevalt on teada, et Ure2p valk osaleb raskemetalli poolt tekitatud stressi või oksüdatiivse stressi vastuses (Courchesne *et al.*, 1988; Rai ja Cooper, 2005). Püstitati hüpotees, et juhul, kui käesolevas töös uuritud ribosoomi alaühikutevahelised sillad on olulised IRES sõltuva translatsiooni initsiatsioonil, võib stressi tingimustes sildade puudumine mimikeerida  $\Delta ure2$  mutandi fenotüüpi. Rakkude kasvu analüüsiti rikkal söötmel, mis sisaldas kas  $CdCl_2$ , tert-butüül hüdroperoksiidi,  $H_2O_2$ , menadiooni või kumeen hüdroperoksiidi. Kontrolliks kasutati  $\Delta ure2$  tüve, mis ei ole võimeline kasvama valitud kemikaale sisaldavatel söötmetel (joonis 21).

Tilk-külv analüüsi katsetulemused näitavad, et eB12, eB13, eB14 ja eIF2A deletsioonimutandid ei ole tundlikud  $CdCl_2$  ja oksüdatiivset stressi põhjustavate kemikaalide suhtes (joonis 22). Seega ei mõjuta eB12, eB13, eB14 või eIF2A puudumine rakkude võimet tulla toime raskemetalli või oksüdatiivse stressiga. Mutandi, kus puudus valk eL24 ja sild eB14 uurimisel selgus, et see tüvi on tundlik ainult  $H_2O_2$  suhtes (joonis 24). Samas ei olnud sellel mutandil IRES sõltuva translatsiooni aktiivsust. Seega ei leidnud püstitatud hüpotees tõestamist. Võimalik, et stressi korral transleeritakse pagaripärmi rakkudes Ure2p valku 7-MGM sõltuval viisil ja tänu sellele suudavad rakud toime tulla ebasoodsate keskkonnatingimustega.

Rakud, kus puudub valk eL24 või valk eL24 ja sild eB14 on tundlikud  $H_2O_2$  suhtes. Samas, rakud, kus plasmiidilt ekspresseerub metsiktüüpi eL24 või eL24 variant, millel puudub C-terminaalne  $\alpha$ -heeliks, mis on vajalik eB13 silla moodustamiseks, kasvavad  $H_2O_2$  sisaldaval söötmel sarnaselt YPD söötmega (joonis 23, joonis 24). eL24 valk osaleb 2 silla moodustamisel: eukarüoodi spetsiifilise silla eB13 (tabel 6) ja konserveerunud silla B6 (tabel 4). B6 silla

moodustamisel osalevad eL24 aminohapped Arg43 ja Arg47 (Ben-Shem *et al.*, 2011). Seega, tüves kus on deleteeritud valk eL24 puuduvad sillad B6 ja eB13 ja selline tüvi on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suhtes tundlik. Molekulaarbioloogia laboratooriumis konstrueeriti plasmid, milles eL24 valgus silda B6 moodustavad aminohapped Arg43 ja Arg47 on muteeritudalaniinideks. Selle plasmidi transformeerimisel tüvesse, kus puudub eL24 valk, selgus, et B6 silla puudumine ei mõjuta rakkude kasvukiirust (Molekulaarbioloogia labori avaldamata andmed). Selgitamaks, kas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tundlikkus on põhjustatud konserveerunud silla B6 puudumisest, on vaja läbi viia lisakatseid. Põhjus, miks fenotüüp avaldub ainult kasutades H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aga mitte teiste katses kasutatud kemikaalide mõjul, võib olla selles, et tekkivate vaba radikaalide kontsentratsioon on erinev ja on reguleeritud erinevate detoksifitseerimise mehhanismide kaudu (Rai ja Cooper, 2005).

## Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti, kuidas ribosoomi alaühikutevahelised eukarüoodi spetsiifilised sillad eB12, eB13 ja eB14 mõjutavad IRES sõltuvat transaltsiooni initsiatsiooni ja raskemetalli või oksüdatiivse stressiga toimetulekut *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi näitel. Lisaks analüüsiti sildade eB12, eB13 ja eB14 kooperatiivsust IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil.

Töö esimeses osas uuriti nende kolme eukarüoodi spetsiifilise silla mõju IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonile. *URE2* IRES-el põhinevat reportersüsteemi kasutades leiti, et  $\Delta$ eB12,  $\Delta$ eB13 ja  $\Delta$ eB14 mutantidel on IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon langenud 20% võrreldes metsiktüübi rakkudega. Sellest võib järeldada, et ühe alaühikuvahelise ribosomalse silla deleteerimine oluliselt ei mõjuta IRES sõltuvat translatsiooni initsiatsiooni. Töös näidati, et eB13 ja eB14 deletsioonimutandis säilib eIF2A deleteerimise positiivne mõju IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonile ning eB12 deletsioonimutandis see positiivne mõju kaob.

Kui ribosoomides puuduvad sillad B12 ja eB14 või valk eL24 ja sild eB14, siis kaob IRES sõltuv translatsiooni aktiivsus. Sildade eB13 ja eB14 deletsioonimutandis langeb IRES sõltuv translatsiooni initsiatsioon 30% võrreldes metsiktüübi rakkudega, mis on sarnane eB13 või eB14 sillamutantide analüüsil saadud tulemustega. Võib järeldada, et eB12 ja eB14 või eL24 ja eB14 kooperatiivsus on hädavajalik IRES sõltuval translatsiooni initsiatsioonil ning eB13 ja eB14 sildadel kooperatiivne mõju puudub.

Töö teises osas analüüsiti sildade eB12, eB13 ja eB14 olulisust raskemetalli või oksüdatiivse stressiga toimetulekul. Tilk-külvl analüüsi tulemused näitavad, et eB12, eB13 või eB14 deletsioonimutandid ei ole tundlikud  $\text{CdCl}_2$  või oksüdatiivse stressi põhjustavate kemikaalide suhtes. Seega ei mõjuta eB12, eB13 või eB14 puudumine rakkude võimet tulla toime raskemetallide või oksüdatiivse stressiga.

Deletsioonimutandid, kus puudub valk eL24 või valk eL24 ja sild eB14, on tundlikud  $\text{H}_2\text{O}_2$  suhtes. Samas, rakud, kus plasmiidilt ekspresseerub metsiktüüpi eL24 või eL24 variant, mis ei ole võimeline moodustama eB13 silda, ei ole  $\text{H}_2\text{O}_2$  suhtes tundlikud. Sellest võib järeldada, et eL24 valgu N-terminaalne domeen on oluline  $\text{H}_2\text{O}_2$  poolt tekitatud stressiga toimetulekuks.

## Summary

### **The role of eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 in IRES dependent translation initiation in *S.cerevisiae***

Jekaterina Nebogatova

Ribosomes are rRNA and ribosomal protein complexes that carry out protein synthesis. *S.cerevisiae* 80S ribosome consists of two subunits: small (40S) subunit and large (60S) subunit. During translation ribosome subunits are rotating relatively to each other. In *S.cerevisiae* ribosome there are 17 intersubunit bridges, where 5 of them are eukaryote specific. This work is a part of bigger project which is focused on eukaryote specific bridges eB12, eB13 and eB14. The main components of the intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 are proteins eL19, eL24 and eL41, respectively.

There are canonical and non-canonical mechanisms of translation initiation in eukaryotic cells. This work is focused on a non-canonical translation initiation mechanism, which is mediated by an internal ribosomal entry site (IRES). Reporter system used in this study is based on *URE2* IRES element. Ure2p is bifunctional protein that regulates nitrogen catabolite repression and oxidative stress response. Full-length protein is synthesized in cap-dependent canonical way. IRES-dependent translation initiation leads to synthesis of truncated protein form.

The literature review gives an overview of the structure of ribosomes and intersubunit bridges. Also, canonical and IRES-dependent translation initiation are described. The last part of the literature review describes function and structure of *URE2*.

The first aim of the experimental part was to characterize the role of eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 in IRES-dependent translation initiation. It was discovered that IRES dependent translation initiation was decreased by 20% in cells carrying  $\Delta$ eB12,  $\Delta$ eB13 and  $\Delta$ eB14 mutation when compared to wild type cells. Also it was discovered that  $\Delta$ eIF2A increases IRES-dependent translation initiation in  $\Delta$ eB13 and  $\Delta$ eB14, and has no influence on cells carrying  $\Delta$ eB12 mutation.

The second aim of this study was to analyze cooperativity of eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 in IRES-dependent translation initiation. The present study shows,

that IRES-dependent translation initiation is decreased by 30% in cells with deletion of eB13 and eB14 bridges when compared to wild type cells. Interestingly,  $\Delta eB12\Delta eB14$  and  $\Delta eL24\Delta eB14$  mutants show no IRES-dependent translation initiation activity. It can be speculated that the cooperative influence of eB12 and eB14 or eL24 and eB14 is crucial to initiate translation in IRES-dependent way.

The third aim was to analyse the importance of the eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 in oxidative or heavy metal stress response. Spot-test analysis showed, that cells carrying  $\Delta eB12$ ,  $\Delta eB13$  or  $\Delta eB14$  mutation are not sensitive to oxidative or heavy metal stress. In addition, cooperative influence of eB13 and eB14 in oxidative or heavy metal stress response was not reported. Analysis revealed that  $\Delta eL24$  or  $\Delta eL24\Delta eB13$  mutants are  $H_2O_2$  sensitive. Presence of eL24 protein or truncated eL24 variant that lacks eB13 forming C-terminal sequence in the ribosomes restored wild type-like phenotype. It can be speculated, that N-terminal domain of eL24 protein plays crucial role in  $H_2O_2$  stress response.

## Kirjanduse loetelu

- Armache, J. P., Anger, A. M., Márquez, V., Franckenberg, S., Fröhlich, T., Villa, E., et al. (2013). Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: implications for eukaryotic ribosome evolution. *Nucleic Acids Res*, *41*(2), 1284-1293.
- Babaylova, E., Graifer, D., Malygin, A., Stahl, J., Shatsky, I., & Karpova, G. (2009). Positioning of subdomain III<sub>d</sub> and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome. *Nucleic Acids Res*, *37*(4), 1141-1151.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol*, *24*, 165-169.
- Baronas-Lowell, D. M., & Warner, J. R. (1990). Ribosomal protein L30 is dispensable in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *10*(10), 5235-5243.
- Baxa, U., Speransky, V., Steven, A. C., & Wickner, R. B. (2002). Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(8), 5253-5260.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, *334*(6062), 1524-1529.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, *330*(6008), 1203-1209.
- Bousset, L., Belrhali, H., Melki, R., & Morera, S. (2001). Crystal structures of the yeast prion Ure2p functional region in complex with glutathione and related compounds. *Biochemistry*, *40*(45), 13564-13573.
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., & Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev*, *13*(24), 3271-3279.
- Chatterjee, S., & Pal, J. K. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*, *101*(5), 251-262.
- Coschigano, P. W., & Magasanik, B. (1991). The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol Cell Biol*, *11*(2), 822-832.
- Courchesne, W. E., & Magasanik, B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J Bacteriol*, *170*(2), 708-713.
- Deutschbauer, A. M., Jaramillo, D. F., Proctor, M., Kumm, J., Hillenmeyer, M. E., Davis, R. W., et al. (2005). Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast. *Genetics*, *169*(4), 1915-1925.
- Dever, T. E., Kinzy, T. G., & Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *203*(1), 65-107.
- Dorner, A. J., Semler, B. L., Jackson, R. J., Hanecak, R., Duprey, E., & Wimmer, E. (1984). In vitro translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate. *J Virol*, *50*(2), 507-514.
- Dresios, J., Panopoulos, P., Suzuki, K., & Synetos, D. (2003). A dispensable yeast ribosomal protein optimizes peptidyltransferase activity and affects translocation. *J Biol Chem*, *278*(5), 3314-3322.
- Dresios, J., Panopoulos, P., & Synetos, D. (2006). Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Mol Microbiol*, *59*(6), 1651-1663.

- Hellen, C. U. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10), 558-570.
- Hellen, C. U., & Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*, 15(13), 1593-1612.
- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 16(15), 7351-7367.
- Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*, 59, 407-450.
- Hinnebusch, A. G., & Lorsch, J. R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(10).
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 113-127.
- Jan, E. (2006). Divergent IRES elements in invertebrates. *Virus Res*, 119(1), 16-28.
- Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., & Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*, 62(8), 2636-2643.
- Kisly, I., Gulay, S. P., Mäeorg, U., Dinman, J. D., Remme, J., & Tamm, T. (2016). The Functional Role of eL19 and eB12 Intersubunit Bridge in the Eukaryotic Ribosome. *J Mol Biol*, 428(10 Pt B), 2203-2216.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., et al. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15(10B), 963-972.
- Komar, A. A., Lesnik, T., Cullin, C., Merrick, W. C., Trachsel, H., & Altmann, M. (2003). Internal initiation drives the synthesis of Ure2 protein lacking the prion domain and affects [URE3] propagation in yeast cells. *EMBO J*, 22(5), 1199-1209.
- Landry, D. M., Hertz, M. I., & Thompson, S. R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes Dev*, 23(23), 2753-2764.
- 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 Res*, 30(24), 5382-5390.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325-328.
- Masison, D. C., & Wickner, R. B. (1995). Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science*, 270(5233), 93-95.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 560-567.
- Meskauskas, A., Harger, J. W., Jacobs, K. L., & Dinman, J. D. (2003). Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 9(8), 982-992.
- Mokrejs, M., Masek, T., Vopálenský, V., Hlubucek, P., Delbos, P., & Pospíšek, M. (2010). IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), D131-136.
- Mokrejs, M., Vopálenský, V., Kolenaty, O., Masek, T., Feketová, Z., Sekyrová, P., et al. (2006).

- IRESite: the database of experimentally verified IRES structures ([www.iresite.org](http://www.iresite.org)). *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D125-130.
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320-325.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Gulen, B., Waterbury, C. C., Hershkovits, E., Hsiao, C., et al. (2014). Secondary structures of rRNAs from all three domains of life. *PLoS One*, 9(2), e88222.
- Rai, R., & Cooper, T. G. (2005). In vivo specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 22(5), 343-358.
- Reineke, L. C., Cao, Y., Baus, D., Hossain, N. M., & Merrick, W. C. (2011). Insights into the role of yeast eIF2A in IRES-mediated translation. *PLoS One*, 6(9), e24492.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., et al. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310(5749), 827-834.
- Song, J. M., Cheung, E., & Rabinowitz, J. C. (1996). Organization and characterization of the two yeast ribosomal protein YL19 genes. *Curr Genet*, 30(4), 273-278.
- Steffen, K. K., McCormick, M. A., Pham, K. M., MacKay, V. L., Delaney, J. R., Murakami, C. J., et al. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 107-118.
- Thompson, S. R., Gulyas, K. D., & Sarnow, P. (2001). Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(23), 12972-12977.
- Vergé, V., Vonlanthen, M., Masson, J. M., Trachsel, H., & Altmann, M. (2004). Localization of a promoter in the putative internal ribosome entry site of the *Saccharomyces cerevisiae* TIF4631 gene. *RNA*, 10(2), 277-286.
- Walsh, D., & Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol*, 9(12), 860-875.
- Weingarten-Gabbay, S., Elias-Kirma, S., Nir, R., Gritsenko, A. A., Stern-Ginossar, N., Yakhini, Z., et al. (2016). Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science*, 351(6270).
- Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Virus Res*, 86, 1-36.
- Wickner, R. B., Taylor, K. L., Edskes, H. K., Maddelein, M. L., Moriyama, H., & Roberts, B. T. (2000). Prions of yeast as heritable amyloidoses. *J Struct Biol*, 130(2-3), 310-322.
- Wilson, D. N., & Doudna, J. H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5).
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., & Shimizu, H. (2011). Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(5), 349-361.
- Yu, X., & Warner, J. R. (2001). Expression of a micro-protein. *J Biol Chem*, 276(36), 33821-33825.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., et al. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292(5518), 883-896.

## LISAD

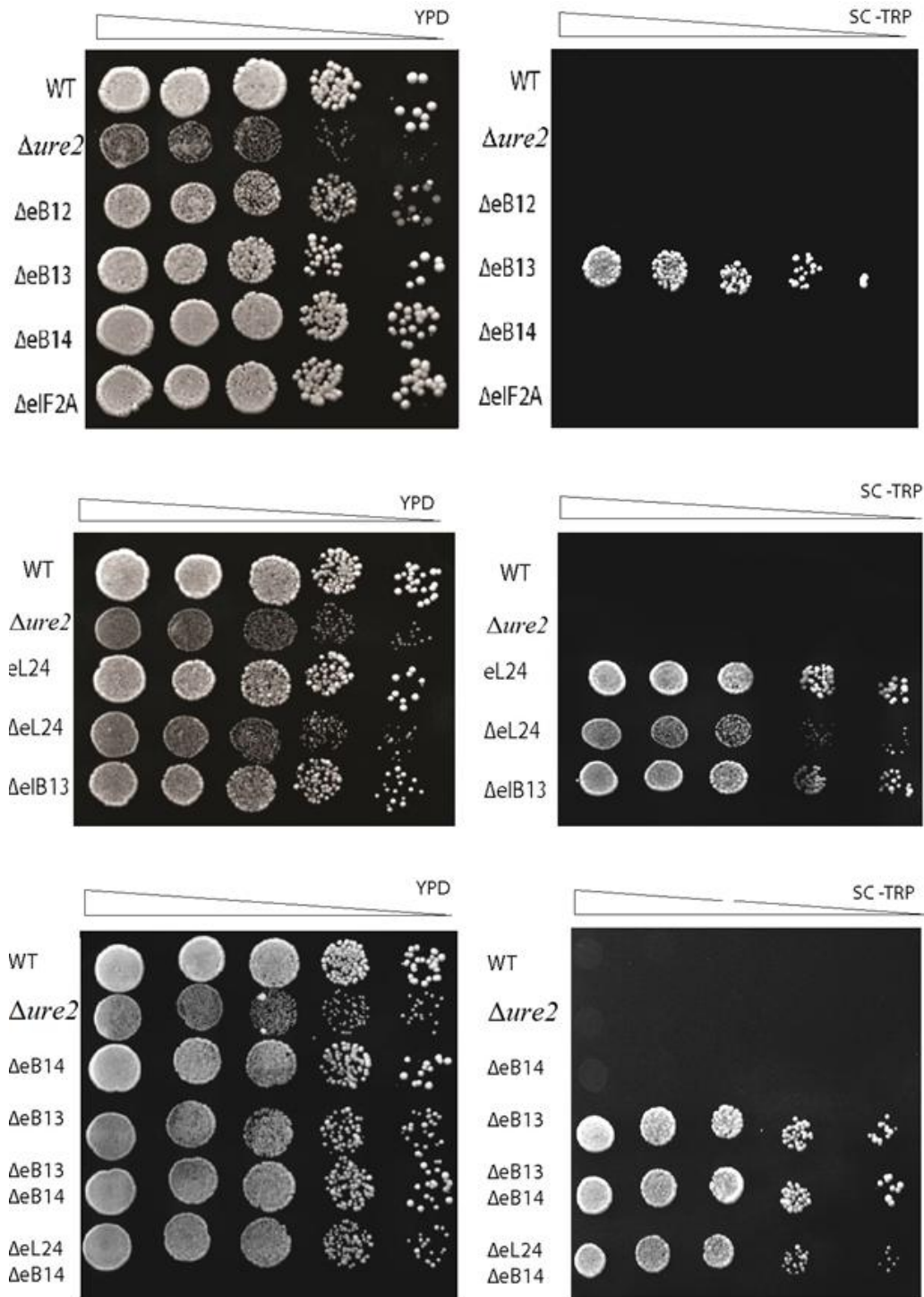
### LISA 1. Töös kasutatud plasmiidid

Nimi	Marker	Insert	Päritolu
p281-4-ATG	<i>URA3</i>	<i>URE2</i> IRES (ATG)- <i>lacZ</i>	Komar <i>et al.</i> , 2003
p281-4-CTT	<i>URA3</i>	<i>URE2</i> IRES (CTT)- <i>lacZ</i>	Komar <i>et al.</i> , 2003
pRS314	<i>TRP1</i>		Sikorski ja Hieter, 1989
pRS314-eL24 <sub>(1-65)</sub>	<i>TRP1</i>		Konstrueeritud I. Kisly poolt
pRS314-eL24	<i>TRP1</i>		Konstrueeritud I. Kisly poolt
pRS316-CrPV IGR IRES	<i>URA3</i>	CrPV IGR IRES	Konstrueeritud I. Kisly poolt kasutades plasmidi pSRT209 (Landry <i>et al.</i> , 2009).
pRS316-CrPV IGRmut IRES	<i>URA3</i>	CrPV IGR muteeritud IRES	Konstrueeritud I. Kisly poolt kasutades plasmidi pSRT210 (Landry <i>et al.</i> , 2009).
pFA6a-kanMX6		<i>kanMX6</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
pFA6a-hphMX6		<i>hphMX6</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
pFA6a-natMX6		<i>natMX6</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999

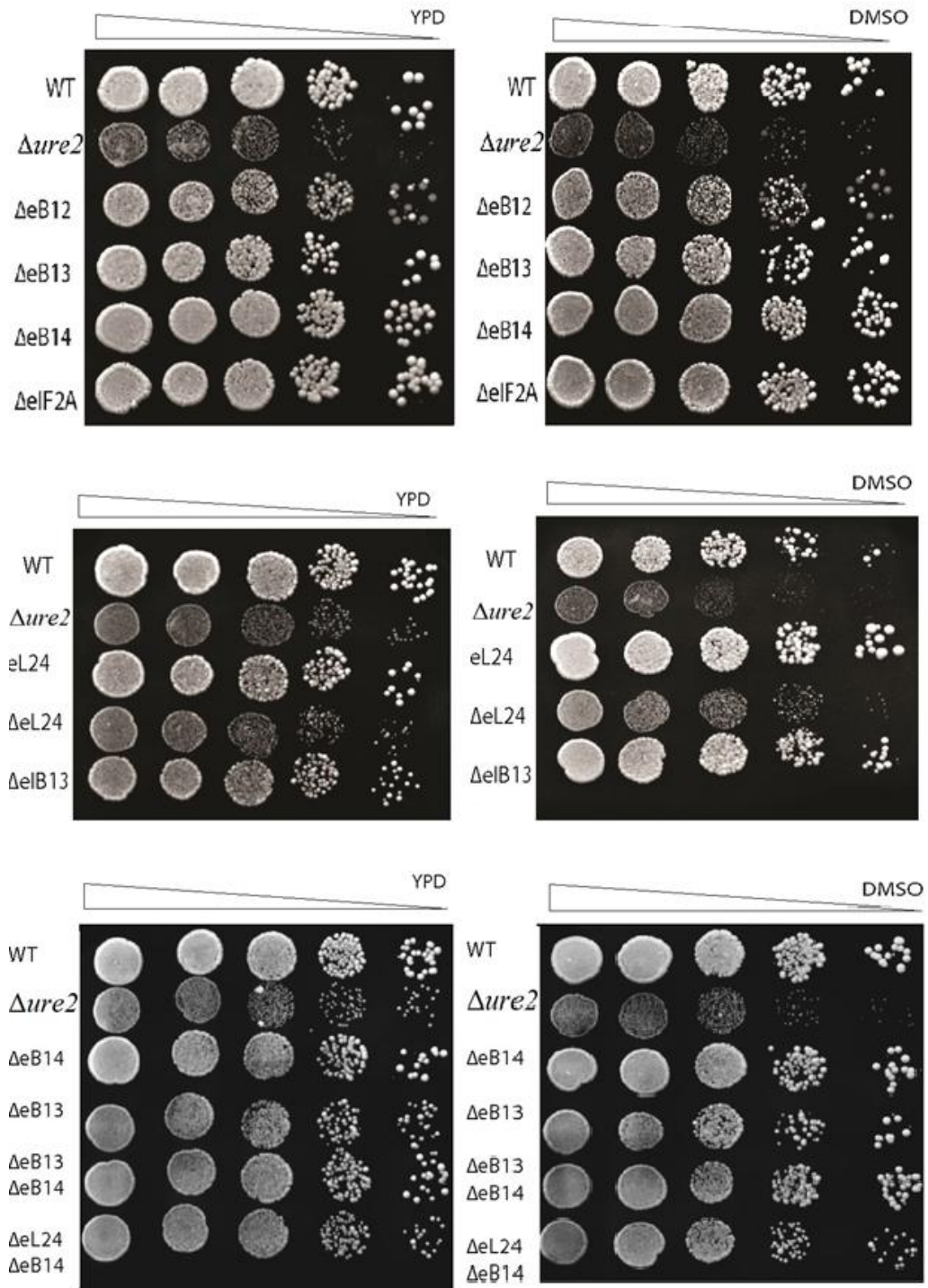
### LISA 2. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus
eIF2A_DEL_FORW	CAGCTTCATAGCGATTTATTTTCAGTGTACG
eIF2A_CHECK_FORW	GAAACTCAGGCAGTTAATGTTGTGTCC
eIF2A_DEL_REV	GTGACACTCCATATTCATTTATTGCCTG
eIF2A_CHECK_REV	GAAATTCACCGCCAAGTAGGAGGAACCAC
pYM_CHECK_REV	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG
pFA6A_CHECK_FORW	CTCGACATCATCTGCCCAGATG

LISA 3. Metsiktüüpi rakkude ja mutantide  $\Delta ure2$ ,  $\Delta eB12$ ,  $\Delta eB13$ ,  $\Delta eB14$ ,  $\Delta eIF2A$   $\Delta eL24$  ja  $\Delta eB13\Delta eB14$ ,  $\Delta eB13$  või  $\Delta eL24\Delta eB14$  kasv SC-TRP söötmel.



LISA 4. Metsiktüüpi rakkude ja mutantide  $\Delta ure2$ ,  $\Delta eB12$ ,  $\Delta eB13$ ,  $\Delta eB14$ ,  $\Delta eIF2A$ ,  $+eL24$ ,  $\Delta eL24$  ja  $\Delta eB13\Delta eB14$ ,  $\Delta eB13$  või  $\Delta eL24\Delta eB14$  kasv rikkal söötmel, mis sisaldas 0,022M DMSO-d.



## Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina \_\_\_\_\_ Jekaterina Nebogatova \_\_\_\_\_  
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: \_\_\_\_\_ 06.07.1990 \_\_\_\_\_)

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

Ribosoomi alaühikutevaheliste eukariootide spetsiifiliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll IRES  
sõltuva translatsiooni initsiatsioonil *S.cerevisiae* näitel  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ vanemteadur Tiina Tamm \_\_\_\_\_,  
(*juhendaja nimi*)

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.12.2020** 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.