

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

Kristiina Raja

**Pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll
aminohapete näljaga toimetulekul**

Magistritöö

Geenitehnoloogia

30 EAP

Juhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2017

INFOLEHT

Pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll aminohapete näljaga toimetulekul

Ribosoomid on konserveerunud rRNA-valk kompleksid, mis viivad läbi translatsiooni. Ribosoomi funktsioneerimiseks on olulised ribosoomi subühikutevahelised sillad, mis vahendavad subühikutevahelist liikumist. Antud töös selgitati pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 funktsiooni aminohapete näljaga toimetulekul, reinitsiatsioonil uORFe sisaldaval mRNA-l ning ribosoomisildade eB12, eB13 ja eB14 kooperatsiooni aminohapete näljaga toimetulekul ning reinitsiatsioonil uORFe sisaldavalt mRNA-lt.

Märksõnad: ribosoom, subühikutevahelised sillad, aminohapetenälg

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

The role of *Saccharomyces cerevisiae* intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 during amino acid starvation

Ribosomes are conserved rRNA-protein complexes that conduct translation. Ribosomal intersubunit bridges are essential for the functionality of the ribosome. Ribosomal intersubunit bridges mediate the movement of the ribosomal subunits. In the current thesis the function and cooperation of the eukaryote specific bridges eB12, eB13 and eB14 was described during amino acid starvation conditions and translation of uORF containing mRNAs.

Keywords: ribosome, intersubunit bridges, amino acid starvation

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Ülevaade <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ribosoomist	7
1.1.1 Ribosoomi põhistruktuur	7
1.1.2 Ribosoomi 40S subühik	8
1.1.3 Ribosoomi 60S subühik	9
1.2 Ribosoomi subühikutevahelised sillad	10
1.2.1 Eukarüoodispetsiifiline sild eB12	11
1.2.2 Eukarüoodispetsiifiline sild eB13	13
1.2.3 Eukarüoodispetsiifiline sild eB14	14
1.3 Translatsioon <i>S. cerevisiae</i>	15
1.3.1 Translatsiooni initsiatsioon <i>S. cerevisiae</i>	15
1.4 Translatsiooni kontroll pagaripärmis	17
1.4.1 GCN4 translatsiooni kontroll	18
EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1 Töö eesmärgid	22
2.2 Materjal ja metoodika	22
2.2.1 Δ gcn2 tüve konstrueerimine	24
2.2.2 Funktsionaalse HIS3 lookuse taastamine	25
2.2.3 Tilk-külv	25
2.2.5 Miniprep RNA eraldamine pagaripärmi rakkudest	26
2.2.6 DNAas I töötlus	27
2.2.7 cDNA süntees ja kvantitatiivne reaala PCR	27
2.3 Tulemused ja arutelu	29
2.3.1 Δ gcn2 mutandi histidiinilja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil	29

2.3.2 Ribosoomi subühikutevahelise silla eB12, eB13 või eB14 mutantide histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil	30
2.3.3 Valgu eL24 mutantide histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil	31
2.3.4 Ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12 ja eB14 mutandi histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil	32
2.3.5 Valgu eL24 ja ribosoomi subühikutevahelise silla eB14 mutandi histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil	33
2.3.6 Renilla ja Firefly lutsiferaaside reportersüsteem	33
2.3.7 Lutsiferaaside reporteri aktiivsuse analüüs eL24 mutantides	35
2.3.8 Lutsiferaaside reporteri aktiivsuse analüüs valgu eL24 mutandi ja ribosoomi eB14 sillamutandis	37
2.3.9 mRNA taseme kontroll qRT-PCR meetodil	38
2.4 Arutelu	42
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY	48
TÄNUSÕNAD	50
KASUTATUD KIRJANDUS	51
LISAD	58
LISA 1. Töös kasutatud pärmi söötmete koostised	58
LISA 2. Töös kasutatud praimerid	59
LISA 3. Töös kasutatud plasmiidid	61
LISA 4. Rakkude kasv SC-TRP selektiivsöötmel	62
LISA 5. Kahe lutsiferaasi reporteri skeem	63
LIHTLITSENTS	64

KASUTATUD LÜHENDID

3AT – 3-aminotriasool

DMSO – dimetüül-sulfoksiid

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

eIF – eukarüootne initsiatsioonifaktor

ES6S – eukarüoodispetsiifiline rRNA lisasegment 6S

FLuc – *Firefly* lutsiferaas

GAAC – üldine aminohapete kontroll (ingl. k *general amino acid control*)

oORF – põhi lugemisraamist 5' suunas algav, kuid põhilugemisraamiga kattuv avatud lugemisraam (ingl. k *overlapping open reading frame*)

ORF – avatud lugemisraam (ingl. k *open reading frame*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (ingl. k *polymerase chain reaction*)

PIC – preinitsiatsioonikompleks (ingl. k *preinitiation complex*)

PMSF - fenüülmetüülsulfonüülfluoriid

qRT-PCR – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

RLA – suhtelised lutsiferaasi aktiivsused (ingl. k *relative luciferase activities*)

RLuc – *Renilla* lutsiferaas

TLS – mRNA 5' liiderjärjestus

uORF – põhi lugemisraamist 5' suunas asuv avatud lugemisraam (ingl. k *upstream open reading frame*)

WT – metsiktüüp (ingl. k *wild type*)

SISSEJUHATUS

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud rRNA-valk kompleksid, mis viivad läbi valkude biosünteesi (Ramakrishnan, 2002). Pagaripärmi ribosoom koosneb kahest subühikust: väikesest 40S subühikust ning suurest 60S subühikust. Ribosoomi subühikute vahelist interaktsiooni ning subühikutevahelist liikumist vahendavad ribosoomi subühikutevahelised sillad (Zhou *et al.*, 2013; Ben-Shem *et al.*, 2010).

Ribosoomi subühikutevahelised sillad jaotatakse konserveerunud sildadeks ning bakteri-, arhe- ja eukarüoodispetsiifilisteks sildadeks. Konserveerunud sillad paiknevad ribosoomi konserveerunud põhistruktuuris, bakteri-, arhe- ning eukarüoodispetsiifilised sillad paiknevad valdavalt ribosoomi solvendipoolsel pinnal (Ben-Shem *et al.*, 2011). Pagaripärmi ribosoomis on 17 subühikutevahelist silda, neist sildadest 12 on konserveerunud. Eukarüoodispetsiifilisi sildu on pagaripärmi ribosoomis 5.

Käesolevas töös käsitleti lähemalt pagaripärmi ribosoomi subühikutevahelisi sildu eB12, eB13 ja eB14. Ribosoomi sillad eB12 ja eB13 on dünaamilised sillad, mis paiknevad ribosoomi pinnal. Ribosoomi subühikutevahelise silla eB12 põhikontaktid moodustuvad valgu eL19 ja 18S rRNA ES6S vahel. Ribosoomi silla eB13 põhikontaktid moodustuvad valgu eL24, eS6 ja 18S rRNA h10 vahel. Ribosoomi subühikutevaheline sild eB14 on ainus eukarüoodispetsiifiline sild, mis paikneb ribosoomi keskosas. Ribosoomi silla eB14 põhikontaktid moodustuvad eL41 ja konserveerunud 18S rRNA vahel.

Antud töö eesmärgiks on uurida, kuidas mõjutab ribosoomi eukarüoodispetsiifiliste subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ning eB14 puudumine aminohapete näljaga toimetulekut ning reinitsiatsiooni uORFe sisaldavalt mRNAlt. Lisaks uuritakse, kuidas toimub ribosoomi sildade eB12, eB13 ja eB14 koöperatsioon histidiininälja korral ning reinitsiatsioonil.

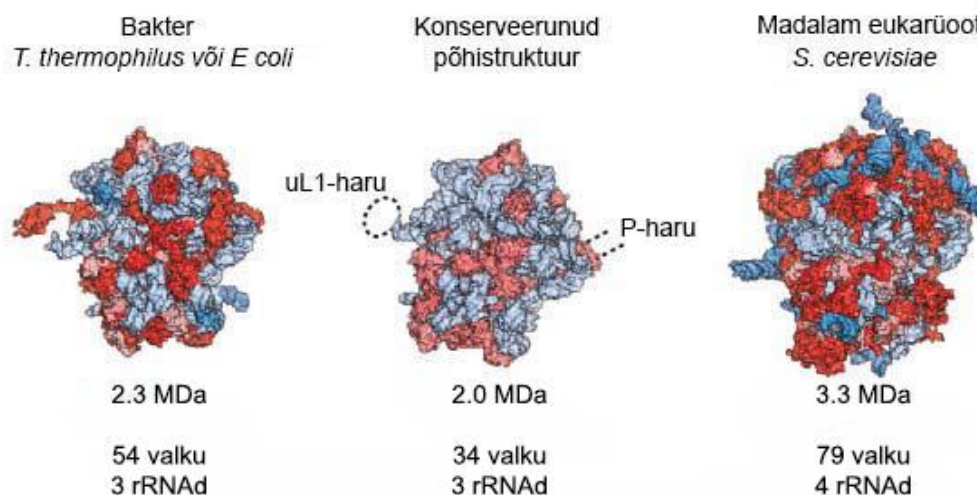
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ülevaade *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomist

1.1.1 Ribosoomi põhistruktuur

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ensüümid, mis viivad läbi valkude biosünteesi ehk translatsiooni. Translatsiooni käigus lülitatakse aminohapped peptiidahelasse vastavalt mRNA nukleotiidsele järjestusele (Ramakrishnan, 2002). Pagaripärmi 80S ribosoom koosneb väikesest 40S ja suurest 60S subühikust, mis omakorda koosnevad rRNAdest ja valkudest.

Ribosoomil on konserveerunud põhistruktuur. Ribosoomi konserveerunud põhistruktuur on olemas kõikides elusorganismides: bakterites, arhedes ja eukarüootides (joonis 1). Ribosoomi konserveerunud põhistruktuur koosneb 34 valgust ja kolmest konserveerunud rRNAst (joonis 1), millel viiakse läbi mRNA dekodeerimist ja peptiidsideme moodustamist. Lisaks kuulub konserveerunud põhistruktuuri ka peptiidi väljumise tunnel. Konserveerunud valkudest 15 asuvad väikeses ja 19 suures subühikus (Schmeing ja Ramakrishnan, 2009; Wilson ja Doudna Cate, 2012). Enamjaolt asuvad konserveerunud põhistruktuuri kuuluvad rRNA ja valgud ribosoomi sees ning konserveerunud põhistruktuuri katavad eukarüooti ribosoomis eukarüoodispetsiifilised valgud, valkude eukarüoodispetsiifilised domeenid ning rRNA lisasegmendid (Ben-Shem *et al.*, 2011).

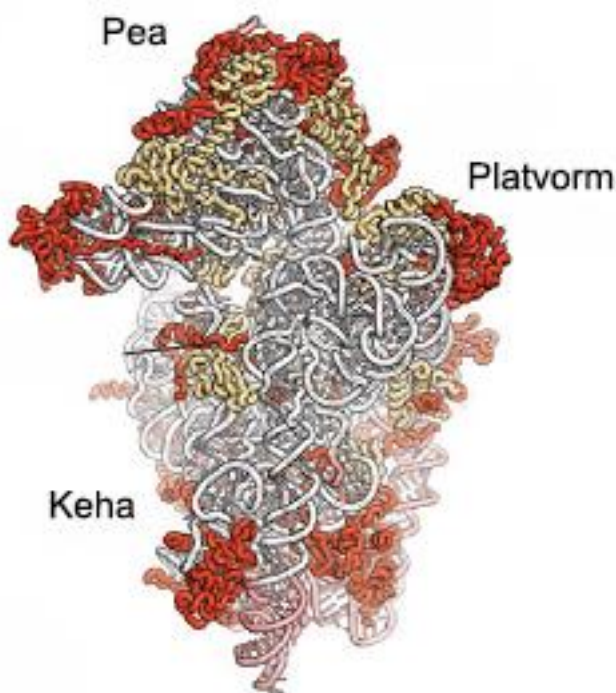


Joonis 1. Bakteri ja eukarüooti ribosoomi võrdlus. Kõikidel ribosoomidel on konserveerunud põhistruktuur, mis moodustub rRNAst (helesinine) ja valkudest (roosa). Bakteri- ja eukarüoodispetsiifilised rRNA lisasegmendid, 5.8S rRNA ja 25 ja 28S rRNA on kujutatud siniselt, valgud punaselt (modifitseeritud Melnikov *et al.*, 2012 järgi).

1.1.2 Ribosoomi 40S subühik

Eukarüoodi ribosoomi väike, 40S subühik koosneb 33 valgust ja 18S rRNAst. Nendest valkudest on universaalselt konserveerunud 15, eukarüoodis ja arhes konserveerunud 12 ning 6 valku on eukarüoodispetsiifilised (Ban *et al.*, 2014). Konserveerunud valkudel on eukarüoodispetsiifilised domeenid ning 18S rRNA sisaldab lisaks konserveerunud järjestustele eukarüoodispetsiifilisi lisasegmente (Rabl *et al.*, 2011). Seetõttu on eukarüoodi ribosoomi 40S subühik prokarüootsest 30S subühikust 500 kDa võrra suurem (Dresios *et al.*, 2006, Clemons *et al.*, 1999).

Eukarüoodi ribosoomi väikese subühiku kuju on määratud 18S rRNA tertsiaarstruktuuri poolt. Olemas on pea, kael, platvorm, keha, nokk, õlg, parem jalg ja vasak jalg (joonis 2) (Schlunzen *et al.*, 2000; Rabl *et al.*, 2011).



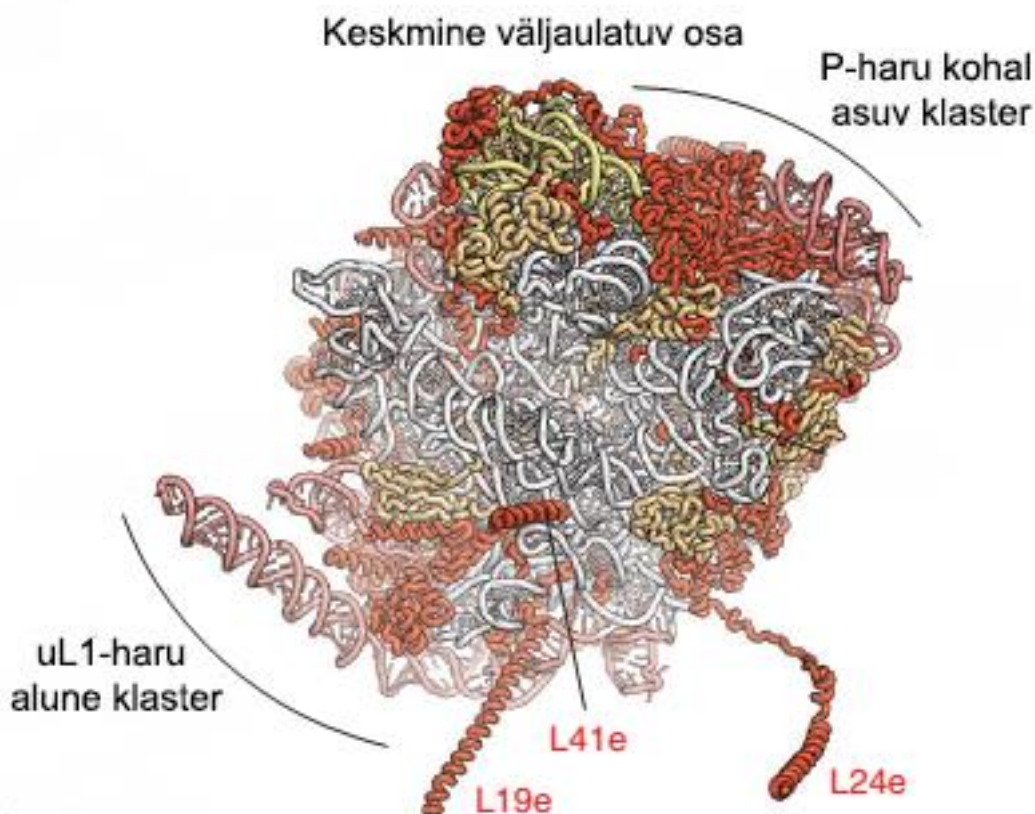
Joonis 2. Eukarüoodi ribosoomi väike, 40S subühik. Konserveerunud põhistruktuuri rRNA on kujutatud valgelt, valgud kollaselt. Eukarüoodispetsiifilised osad on kujutatud punaselt (modifitseeritud Melnikov *et al.* 2012 järgi).

Ribosoomi väikesel subühikul asub mRNA tunnel, mis on vajalik mRNA sekundaarstruktuuride lahtiharutamiseks. Lisaks asub ribosoomi väikesel subühikul dekodeeriv tseenter (Rabl *et al.*, 2011).

1.1.3 Ribosoomi 60S subühik

Eukarüoodi ribosoomi suur, 60S subühik koosneb kolmest rRNA molekulist ning 46st valgust. Neist valkudest 16 on konserveerunud, 20 on olemas arhedes ja eukarüootides ning 6 on eukarüoodispetsiifilised. Lisaks on enamikul valkudest eukarüoodispetsiifilised domeenid (joonis 3. Erinevalt prokarüootsest 50S subühikust on 60S subühikus 3 rRNA molekuli: 5S, 5,8S ja 25S rRNA.

25S ja 5,8S rRNA järjestused on homoloogised prokarüootse 23S rRNA järjestustega sisaldades eukarüoodispetsiifilisi lisasegmente. Eukarüoodi 5S rRNA on homoloogne prokarüootse 5S rRNaga. Tänu valkude eukarüoodispetsiifilistele domeenidele ja rRNA lisasegmentidele on 60S subühik prokarüootsest 50S subühikust 700 kDa võrra suurem (Klinge et al, 2011).



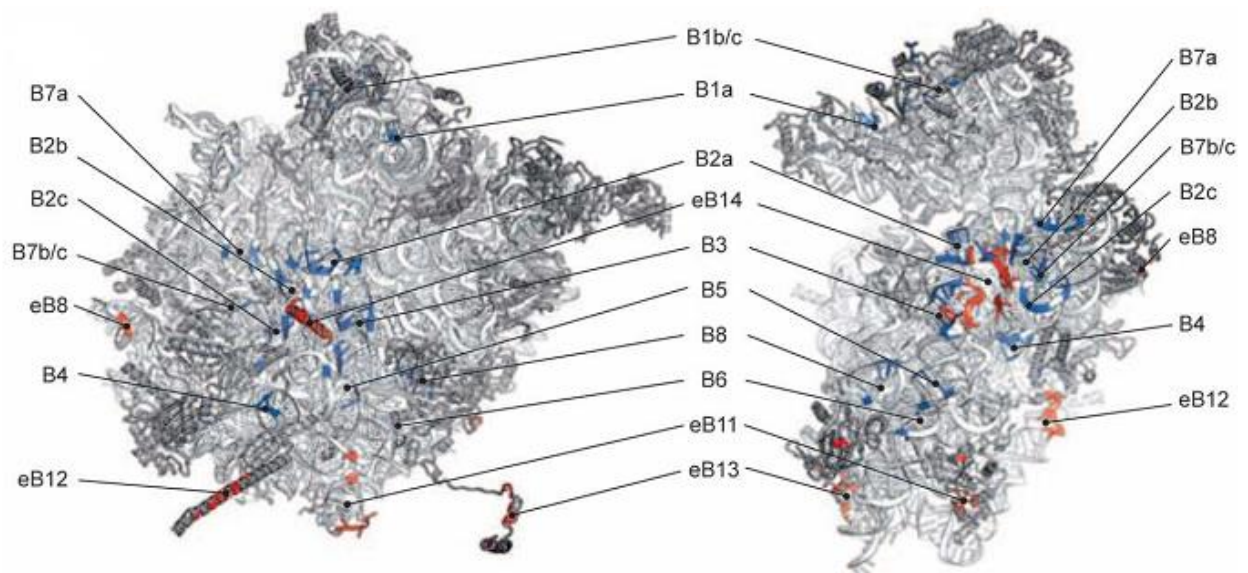
Joonis 3. Eukarüoodi ribosoomi suur, 60S subühik. Konserveerunud põhistruktuuri rRNA on kujutatud valgelt, valgud kollaselt. Eukarüoodispetsiifilised osad on kujutatud punaselt. Valgud eL19, eL24 ning eL41 on joonisel välja toodud, kuna neid käsitletakse edasipidises töös pikemalt (modifitseeritud Melnikov *et al.* 2012 järgi).

Ribosoomi suurel subühikul on konserveerunud kroonikujuline vorm, mis koosneb keskmisest väljaulatuvast osast uL1-harust ja P-harust (joonis 3). 60S subühikus asub

peptidüülitransferraasne keskus, kus katalüüsitakse peptiidside moodustumist: 25S rRNA asuvad tRNA sidumissaidid (A, P ja E). Translatsiooni elongatsiooni käigus liigub kasvav peptiidahel suures subühikus asuvasse peptiidi väljumise tunnelisse (Klinge *et al.*, 2011).

1.2 Ribosoomi subühikutevahelised sillad

Translatsiooni ajal toimub ribosoomi subühikute liikumine teineteise suhtes, mis on vajalik mRNA ja tRNA liigutamiseks (Zhou *et al.*, 2013). Röntgenkristallograafia (ingl. k *X-ray crystallography*) abil on kirjeldatud pagaripärmi ribosoomil 17 subühikutevahelist silda. Neist sildadest 12 on konserveerunud ning 5 on eukarüoodispetsiifilised (joonis 4). Konserveerunud sillad paiknevad ribosoomi konserveerunud põhistruktuuris, eukarüoodispetsiifilised sillad aga ribosoomi pinnal (Ben-Shem *et al.*, 2011).



Joonis 4 Ribosoomi subühikutevahelised sillad. Suur, 60S subühik vasakul, väike, 40S subühik paremal. Sinisega on kujutatud konserveerunud sillad, punaselt eukarüoodispetsiifilised sillad (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Ribosoomi subühikutevahelised sillad jaotatakse interaktsioonitüüpi arvestades kolme rühma: rRNA-rRNA, rRNA-valk ja valk-valk tüüpi sildadeks. Valdavalt on rRNA-rRNA tüüpi sillad konserveerunud. Konserveerunud sillad on olemas kõikides eludomeenides (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Eukarüoodispetsiifilised sillad moodustuvad enamjaolt eukarüoodispetsiifilistest valkudest, valkude eukarüoodispetsiifilistest domeenidest ning eukarüoodispetsiifilistest rRNA lisasegmentidest. Erinevalt bakteritest on eukarüoodis subühikutevaheliste sildade moodustumises põhiroll valkudel (Ben-Shem *et al.*, 2011).

Eukarüoodispetsiifiline sild eB8 paikneb mRNA väljumistunneli läheduses, uL1 all. Sild eB8 põhikontakt moodustub eukarüoodispetsiifilise valgu eS1 ning 25S rRNA ES31 h79 vahel (Spahn *et al.*, 2001). Eukarüoodispetsiifiline valk eS1 on kodeeritud kahe paraloogse geeni *RPS1A* ning *RSP1B* poolt. *RPS1B* deletsioon põhjustab generatsiooniaja pikenemist kolmandiku võrra, *RPS1A* deletsiooni korral on generatsiooniaja tõus väiksem. Mõlema paraloogi deletsioon on letaalne (Steffen *et al.*, 2012).

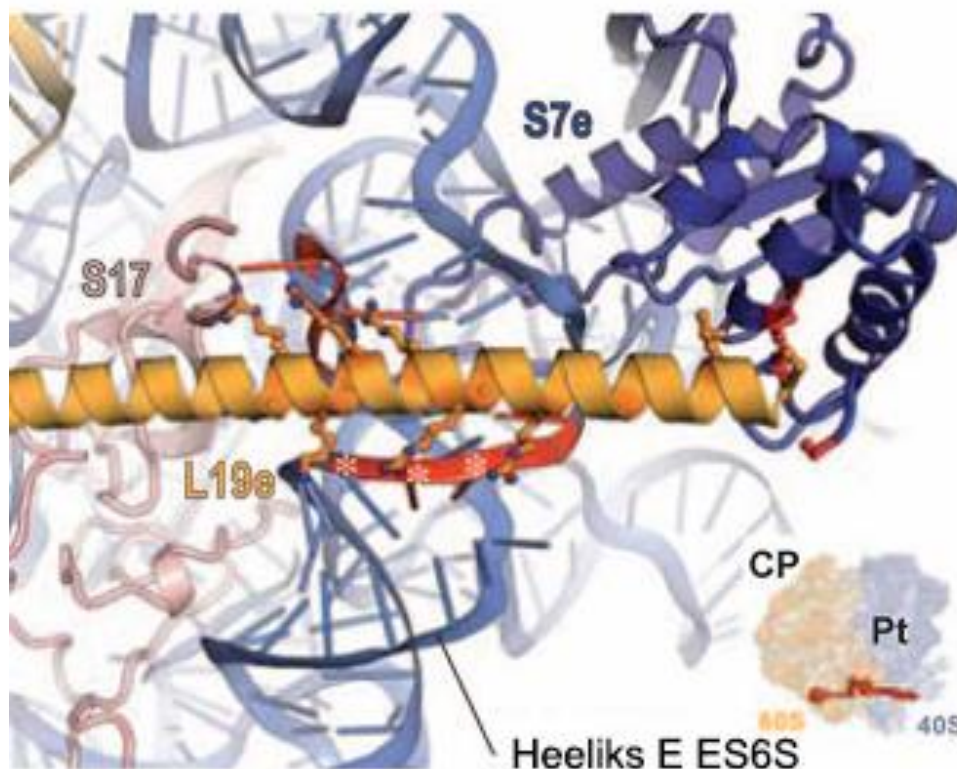
Eukarüoodispetsiifilise silla eB11 põhikontaktid moodustuvad väikese subühiku valgu eS8 ning 18S rRNA ES3S ja 25S rRNA ES41L vahel (Ben-Shem *et al.*, 2011). Valk eS8 on kodeeritud kahe paraloogse geeni *RPS8A* ning *RPS8B* poolt. Ühe paraloogi deletsioon ei põhjusta generatsiooniaja muutust, mõlema paraloogi deletsioon on aga letaalne (Steffen *et al.*, 2012).

Edaspidi käsitletakse pagaripärmi subühikutevahelisi silde eB12, eB13 ja eB14, kuna antud töös on uuritud just nende sildade rolli ribosoomi funktsioneerimisel.

1.2.1 Eukarüoodispetsiifiline sild eB12

Ribosoomi subühikutevahelise silla eB12 põhikontakt moodustub suure subühiku valgu eL19 C-terminaalse heelksi ja eukarüoodispetsiifilise 18S rRNA lisasegmendi 6 (ES6S) vahel (joonis 5). eB12 on dünaamiline sild, mille konformatsioon muutub translatsiooni käigus. Enne translokatsiooni on L19e interakteerunud S17uga, pärast translokatsiooni interakteerub eL19 aga S7ega (Ben-Shem *et al.*, 2010).

Suure subühiku valk L19e on elutähtis valk, mis on kodeeritud kahe paraloogse geeni, *RPL19A* ja *RPL19B* poolt (Song *et al.*, 1996). Ühe paraloogi deletsioon ei ole rakule letaalne (Song *et al.*, 1996; Giaever *et al.*, 2002). Siiski, rakkudel, millel puudub üks paraloogidest, on 1,5 korda aeglasem kasv kui metsiktüüpi rakkudel (Steffen *et al.*, 2012; Kisly *et al.*, 2016). Valk eL19 koosneb kolmest struktuursest domeenist: N-terminaalsest globulaarsest domeenist, keskmisest osast ning pikast C-terminaalsest heeliksist (Klinge *et al.* 2011).

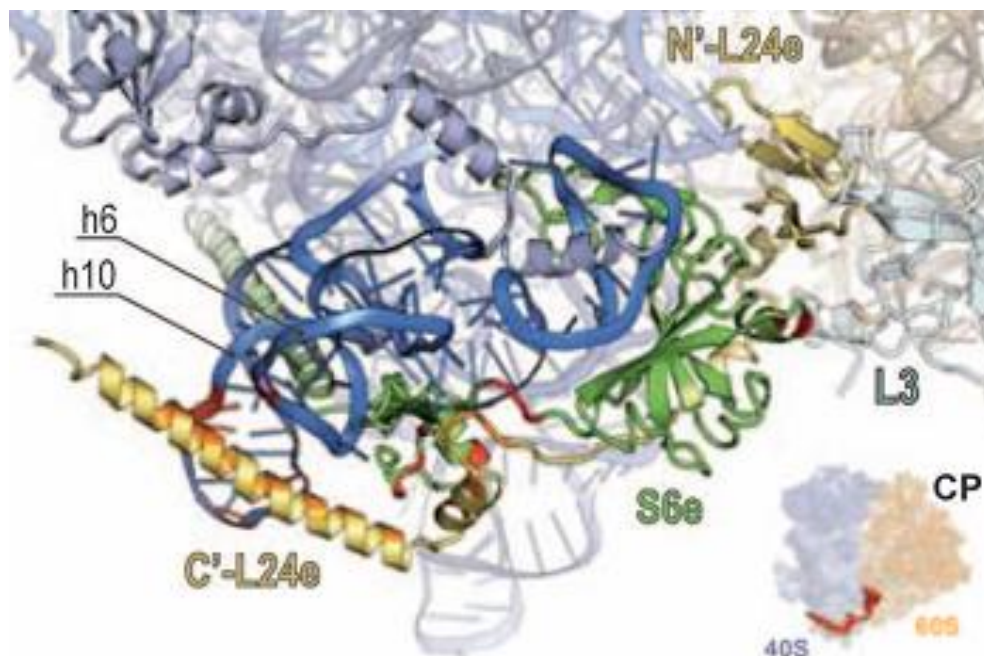


Joonis 5. eB12 silla struktuur. eL19 eukarüoodispetsiifiline C-terminaalne alfaheeliks on kujutatud oranžilt, aminohapped, mis moodustavad kontakte ES6S-ga on kujutatud oranžide pulkadena. Heeliks ES6S on kujutatud siniselt. Lisaks on toodud eL19 interaktsioon eS7-ga. Paremalt nurgas on kujutatud subühikutevaheline sild ribosoomi pinnal (modifitseeritud Ben-Shem *et al.*, 2011 järgi).

Valk eL19 on oluline ribosoomi suure subühiku biogeneesis. On leitud, et eL19 on vajalik 27SB pre-rRNA lõikamiseks 7S pre-rRNAks ja 25,5S pre-rRNAks. Rakkudes, milles puudub eL19 oli 27SB pre-rRNA lõikamine oluliselt aeglasem kui metsiktüüpi rakkudes (Pöll *et al.*, 2009; Kisly *et al.*, 2016). Lisaks on uuritud eB12 silla mõju 80S ribosoomi formeerumisele. Rakkude kasvatamisel, millel puudub eB12, 20° C juures leiti lisaks aeglasele kasvule ka ribosoomi profiilide analüüsimisel 60S subühikute kuhjumine. See viitab ribosoomi funktsionaalsuse vähenemisele. Lisaks 60S subühikute kuhjumisele *in vivo* leiti, et eB12 silla puudumine põhjustab vähenenud 80S ribosoomi moodustumist ka *in vitro*. Kasutades translatsiooni inhibiitoreid neomütsiin ja paromomütsiin leiti, et rakud, millel puudub sild eB12 on neomütsiinile ja paromomütsiinile tundlikud. On spekulieritud, et ribosoomid, millel puudub eB12, teevad translatsiooni käigus rohkem vigu (Kisly *et al.*, 2016).

1.2.2 Eukarüodispetsiifiline sild eB13

Pagaripärmi ribosoomi subühikutevahelise silla eB13 põhikontakt moodustub valgu eL24 C-terminaalse osa ja väikese subühiku valgu eS6 ning 18S rRNA heeliks 10 interaktsioonil (joonis 6) (Ben-Shem *et al.*, 2011).



Joonis 6. Subühikutevaheline sild eB13. eL24 ulatub välja suurest subühikust ning interakteerub eS6ga. 18S rRNA ning valgu aminohappejäägid, mis võtavad osa silla moodustumisest, on kujutatud punaselt. Suure subühiku rRNA ning valgu aminohappejäägid, mis võtavad osa silla moodustumisest on kujutatud oranžilist. All paremal olev joonis kujutab, kus asub sild eB13 (Ben-Shem *et al.*, 2011).

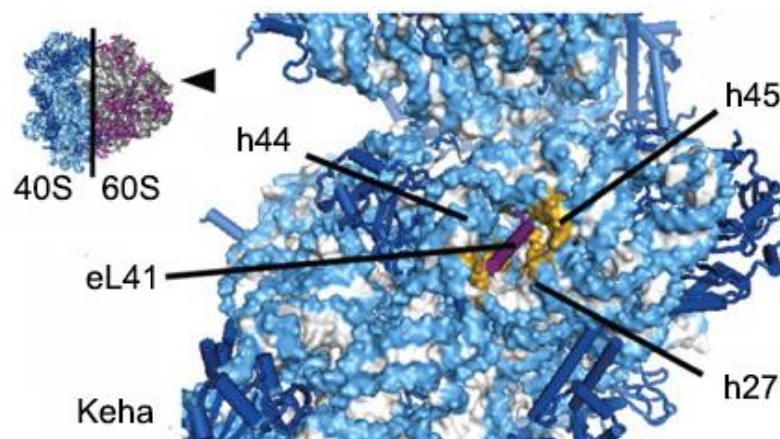
Eukarüodispetsiifiline valk eL24 on kodeeritud kahe paraloogse geeni *RPL24A* ja *RPL24B* poolt. Valk L24e koosneb N-terminaalsest osast, mis asub suurel, 60S subühikul, linkerist, mis asub väikese, 40S subühiku sees ning C-terminaalsest sabast, mis asub 40S subühiku pinnal (Ben-Shem *et al.*, 2011). eL24 ei ole eluks hädavajalik valk, kuid selle puudumine rakus pikendab rakkude generatsiooniaega metsktüübiga võrreldes kümnendiku võrra (Steffen *et al.*, 2012). Samas leidsid Dresios *et al.*, et *RPL24A* ja *RPL24B* puudumine pikendab rakkude generatsiooniaega 30% (Dresios *et al.*, 2000).

Dresios *et al.* leidsid, et eL24 puudumise korral väheneb rakkudes 80S ribosoomide hulk, mis viitab sellele, et eL24 võib omada rolli 40S ja 60S subühikute interaktsioonil (Dresios *et al.*, 2000). *Arabidopsis thaliana*s on uuritud eL24B funktsiooni translatsioonil kasutades $\Delta eL24B$ mutanti. Zhou *et al.*, leidsid et eL24-l on oluline roll translatsiooni reinitiaatsioonil uORFe sisaldavalt mRNA-delt (Zhou *et al.*, 2010). On leitud, et eL24 puudumise korral on hiired

metsiktüübiga võrreldes 20% väiksemat kasvu. Antud fenotüüpi kutsutakse Bst hiirteks (ingl. *k Belly Spot and Tail*) (Barkić *et al.*, 2009). Lisaks on leitud, et eL24 puudumine kaitseb hiiri teatud kasvajate eest inhibeerides 5' 7-metüülguanosiinmütsisõltumatut translatsiooni initsiatsiooni. Inimese rinnavähi koeproovi võrdlemisel tavalise rinna koeprooviga leiti, et kahes kolmandikus vähirakkudest oli eL24 ekspressioon kõrgem (Wilson-Edell *et al.*, 2014).

1.2.3 Eukarüoodispetsiifiline sild eB14

Eukarüoodispetsiifiline sild eB14 on ainuke eukarüoodispetsiifiline sild, mis asub ribosoomi keskosas. Sild eB14 moodustub valgust eL41, mille alfaheeliks on ümbritsetud konserveerunud 18S rRNAga (joonis 7). eL41 on suure subühiku valk, mis ulatub väikeses subühikus asuvasse taskusse. Antud tasku moodustub 18S rRNA h27st, h45st ja h44st. eL41 on palju tugevamini seotud väikese subühikuga kuigi tegu on suure subühiku valguga (Ben-Shem *et al.*, 2011).



Joonis 7. Sild eB14. Lilla värviga on kujutatud valk eL41, kuldselt on kujutatud 18S rRNA h27, h44 ja h45. Sild eB14 moodustub eL41st, mis interakteerub h27, h44 ja h45ga (modifitseeritud Wilson ja Doudna Cate, 2012 järgi).

Suure subühiku valk eL41 on kodeeritud kahe paraloogse geeni *RPL41A* ja *RPL41B* poolt. eL41 on väikseim eukarüoodispetsiifiline valk koosnedes vaid 25 aminohappest, millest 17 on arginiini- ning lüsiinijäägid (Dresios *et al.*, 2002). On näidatud, et eL41 puudumisel on rakkude generatsiooniaeg sarnane metsiktüübile (Steffen *et al.*, 2012). Dresios *et al.* näitasid kasutades nii eL41 mutanti kui eL41, eL39 ja eL24 kolmikmutanti, et eL41 puudumine põhjustab mõõdukat translatsiooni täpsuse tõusu. Kuna eL41 asub peptidüültransferaase keskuse lähedal, mõjutab see ka peptidüültransferaaset aktiivsust (Dresios *et al.*, 2003). Lisaks on näidatud, et eL41-l on roll spontaanse translokatsiooni ärahoidmisel ning eL41 puudumisel suureneb rakkudes ribosomaalne -1 raaminihe (Meskauskas *et al.*, 2003; Dresios *et al.*, 2002).

1.3 Translatsioon *S. cerevisiae*s

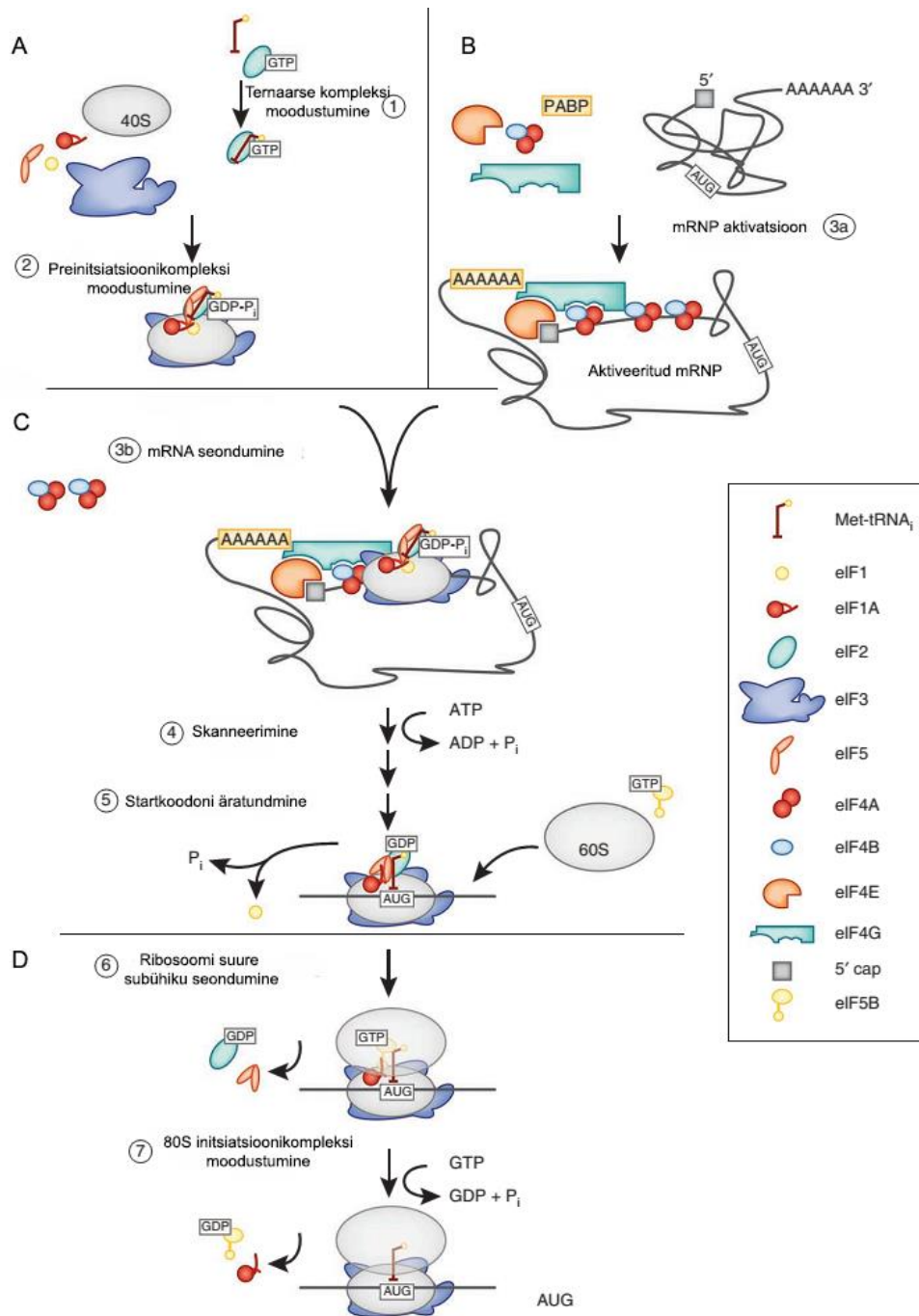
Translatsioon on tsükliline protsess, mille käigus lisatakse aminohapped vastavalt mRNA järjestusele kasvavasse peptiidahelasse (Jackson *et al.*, 2010). Translatsioon jagatakse nelja etappi: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja kofaktorite taaskasutus (Dever ja Green, 2012).

1.3.1 Translatsiooni initsiatsioon *S. cerevisiae*s

Eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni käigus formeerub elongatsioonivalmis 80S ribosoom. Translatsiooni initsiatsiooni lõpuks on initsiaator-tRNA P-saidis paardunud startkoodoniga. Translatsiooni initsiatsiooniks on vaja 9 eukarüootset initsiatsioonifaktorit ning translatsiooni initsiatsioon koosneb neljast etapist: 43S preinitsiatsioonikompleksi (PIC) moodustumine (joonis 8 A), mRNA aktivatsioon (joonis 8, B), 48S PIC moodustumine (joonis 8, C) ja 60S subühiku ühinemine 48S PICile (joonis 8, D) (Pestova *et al.*, 2007).

Eukarüoosis algab translatsiooni initsiatsioon 43S PIC moodustumisega (joonis 8). 43S PIC moodustumiseks on vajalik ternaarse kompleksi moodustumine (ternaarse kompleksi moodustumist käsitletakse pikemalt alapeatükis 1.4.1). 43S PIC koosneb ribosoomi 40S subühikust, sellele seondunud ternaarsest kompleksist ning eIF3 ja eIF5 initsiatsioonifaktoritest (joonis 8) (Pestova *et al.*, 2007).

Samal ajal 43S PIC moodustumisega toimub mRNP moodustumine. mRNP moodustumist nimetatakse ka mRNA aktivatsiooniks. mRNP moodustumise käigus seondub mRNAle eIF4E, moodustunud kompleksile seonduvad seejärel eIF4A, eIF4B, eIF4G ja PABP. Pärast PIC moodustumist seondub 43S PIC varem formeerunud mRNPlle 5' 7-metüülguanosiinmütsile moodustades seeläbi 48S PICi (joonis 8, 3b). 48S PICi moodustumise käigus lahutavad mRNA 5' terminaalse tertsiaarstruktuuri lahti initsiatsioonifaktorid eIF4A, eIF4B ja eIF4F (Hinnebusch ja Lorsch, 2012).



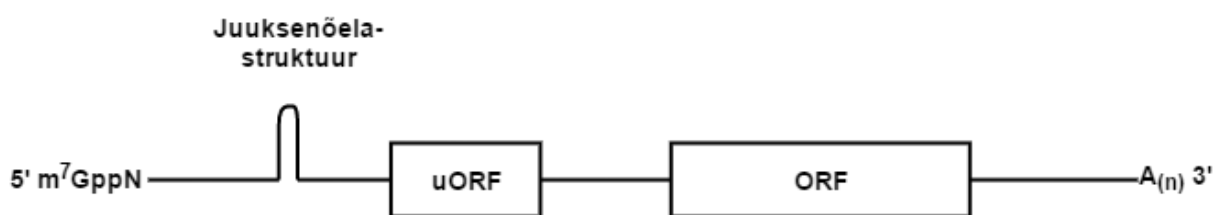
Joonis 8. Translatsiooni initsiatsioon *S. cerevisiae*s. Translatsiooni initsiatsioon koosneb neljast etapist: 43S PIC moodustumine (A), mRNA aktivatsioon (B), 48S PIC moodustumine (C) ja 60S subühiku seondumine 48S PIC-ile (D). Translatsioon algab ternaarse kompleksi moodustumisest (1), ternaarne kompleks seondub 40S subühikule (2) ja samal ajal seonduvad mRNAle eIF4 faktorid ja PABP moodustamaks mRNP (3a), preinitsiatsioonikompleks seondub mRNPlle (3b), seejärel toimub skanneerimine (4) ja startkoodoni äratundmine (5). Pärast startkoodoni äratundmist seondub suur subühik (6) ning moodustub 80S preinitsiatsioonikompleks (7) (modifitseeritud Aitken ja Lorsch, 2012 järgi).

mRNA seondumise järel algab skanneerimine (joonis 8, 4). Skanneerimise käigus liigub 43S PIC mRNA 5' → 3' suunal esimese startkoodonini. Startkoodoni äratundmisel hüdrolüüsib eIF2ga seotud GTP ning vabanevad initsiatsioonifaktorid. Seejärel liitub 48S PIC-iga 60S subühik ning formeerub 80S PIC (joonis 8, 7) (Hinnebusch ja Lorsch, 2012).

1.4 Translatsiooni kontroll pagaripärmis

Geeniekspressiooni kontrollitakse põhiliselt transkriptsiooni regulatsiooni läbi. Lisaks transkriptsioonilisele kontrollile toimub geeniekspressiooni regulatsioon ka post-transkriptsiooniliselt. Näiteks läbi mRNA taseme ja translatsiooni kontrolli (McCarthy, 1998). Translatsiooni kontrollimine erinevatelt mRNA-delt on oluline valkude ekspressioonitaseme reguleerimiseks (McGeachy ja Ingolia, 2016).

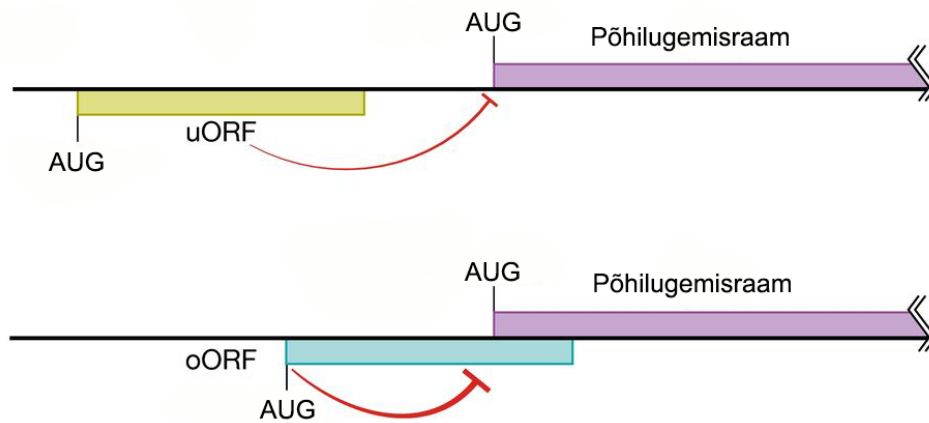
Eukarüoosis skanneerib preinitsiatsioonikompleks translatsiooni initsiatsioonil mRNA 5' otsast kuni startkoodonini. 5' liiderjärjestus ehk TLS võib seetõttu mõjutada translatsiooni mRNA-lt (joonis 9).



Joonis 9. Elemendid mRNA-l, mis mõjutavad ORFi translatsiooni. 7-metüülguanosiinmüts mRNA 5' otsas ja polü(A) saba mRNA 3' otsas aitavad kaasa translatsiooni initsiatsioonile. Sekundaarstruktuurid nagu juuksenõelastruktuur blokeerivad translatsiooni initsiatsiooni. uORFid toimivad põhi-ORFi translatsiooni repressoritena vähendades translatsiooni põhi-ORFilt.

Põhilugemisraami ehk põhi-ORFi (ingl. k *open reading frame*) translatsiooni inhibeerivad erinevad järjestused TLSis. Näiteks juuksenõelastruktuur blokeerib translatsiooni initsiatsiooni, uORFid aga vähendavad skanneerivate PICide jõudmist põhi-ORFi startkoodonini (joonis 9) (Johnstone *et al.*, 2016; Arribere ja Gilbert, 2013).

Avatud lugemisraamid, mis asuvad põhi-ORFi mRNA 5' suunas jagatakse uORFideks ja oORFideks. Avatud lugemisraame, mis algavad põhi-ORFi 5' suunas ning lõppevad enne põhilugemisraami, nimetatakse uORFideks. Avatud lugemisraamid, mis algavad põhi-ORFi 5' suunas, kuid kattuvad osaliselt põhilugemisraamiga, nimetatakse oORFideks (joonis 10) (Johnstone *et al.*, 2016).



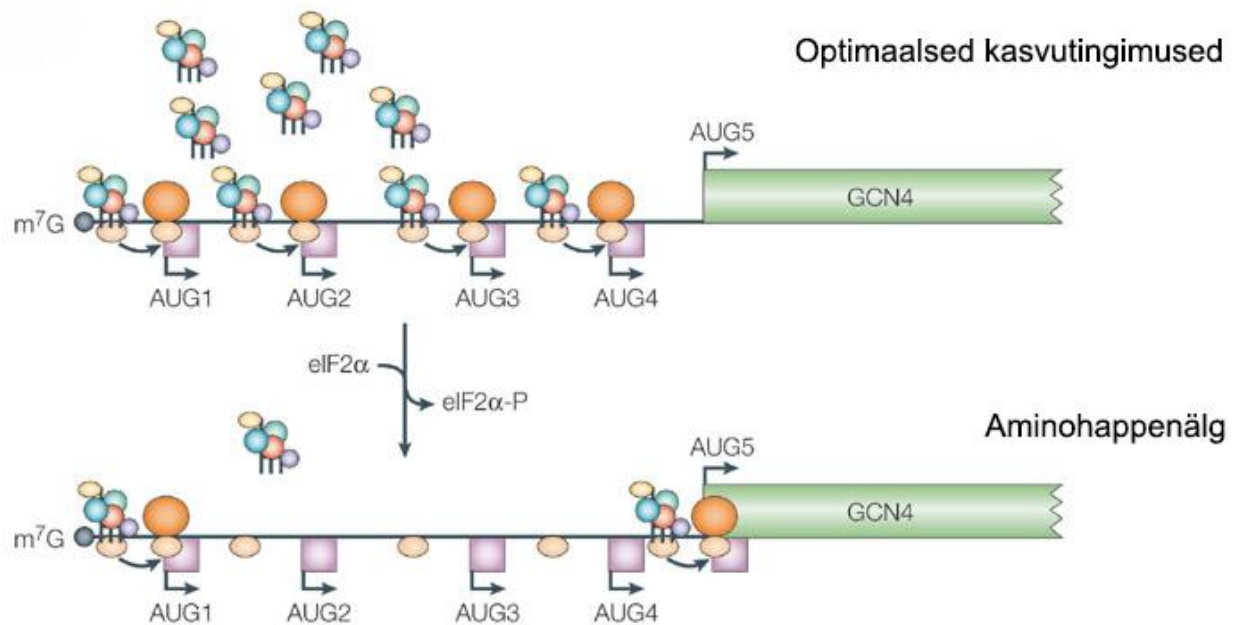
Joonis 10. uORFi ja oORFi skemaatiline joonis. Nii uORF (ülemine) kui oORF (alumine) vähendavad translatsiooni põhilugemisraamilt (modifitseeritud McGeachy ja Ingolia, 2016 järgi).

1.4.1 GCN4 translatsiooni kontroll

Pagaripärmis kodeerib *GCN4* geen transkriptsioonifaktorit, mis reguleerib üle 30 aminohappe biosünteesiraja geeni ekspressiooni. Seetõttu on Gcn4-l oluline roll stressivastuses aminohapete nälja korral (Natarajan *et al.*, 2001). Lisaks on näidatud, et Gcn4-l on roll stressivastuses glükoosinälgale ning oksüdatiivsele stressile (Yang *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2008).

Süsteem, mille abil toimub *GCN4* translatsiooni kontroll pagaripärmis, on universaalne. *GCN4* ortoloogi imetajates, *ATF4* translatsiooni kontroll toimub sarnaselt pagaripärmile (Lu *et al.*, 2004). *GCN4* mRNA translatsioon on reguleeritud pika 5' liiderjärjestuse poolt, mis sisaldab 4 uORFi (joonis 11). Imetajates on *ATF4* translatsioon reguleeritud aga ühe uORFi ning ühe oORFi poolt. Atf4 on rakustressi vastuseks vajalike geenide transkriptsioonifaktor (Vattem ja Wek, 2004).

GCN4 on uuritud nii selle regulatoorse funktsiooni kui 5' mittetransleeritavas alas asuvate uORFide tõttu. *GCN4* translatsiooni on uuritud kasutades *GCN4-lacZ* süsteemi. Sellise konstrukti kasutamisel leiti, et *GCN4* regulatsioon toimub translatsiooni tasemel (Hinnebusch, 1985). *GCN4* translatsiooni reguleerivad neli uORFi mRNA 5' mittetransleeritavas alas. uORFide funktsiooni on selgitatud mutatsioonide viimisel uORFidesse või uORFide deletsioonil. uORFide deletsiooni või mutatsiooni korral tõuseb rakus Gcn4 hulk. Nii näidati, et uORFid inhibeerivad *GCN4* translatsiooni (Hinnebusch, 1984).

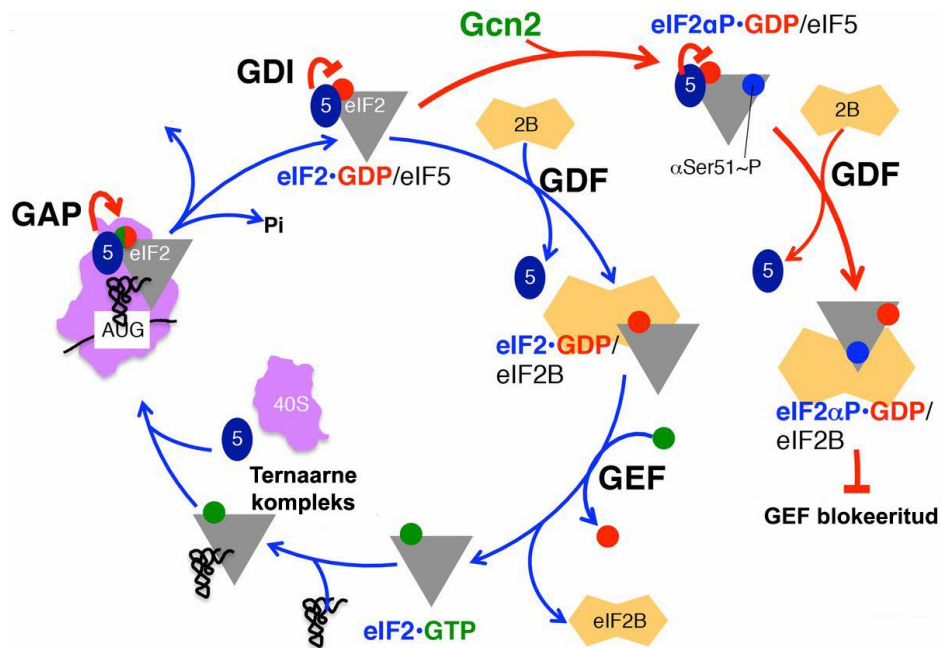


Joonis 11. *GCN4* mRNA translatsiooni regulatsioon. *GCN4* mRNA translatsioon on reguleeritud nelja uORFi poolt. Piisaval kolmikkompleksi kontsentratsioonil toimub initsiatsioon esimeselt uORFilt ning pärast translatsiooni lõppu toimub reinitsiatsioon. Need ribosoomid, mis lõpetavad translatsiooni uORFidelt 2 kuni 4 ei saa aga jätkata translatsiooni vähendades seeläbi ribosoomi võimalust jõuda *GCN4* lugemisraamini, kuna uORF4 järel on ribosoomi dissotseeriv element. Aminohapete nälja korral on ternaarse kompleksi kontsentratsioon ebapiisav ning reinitsiatsiooni 2.-4. uORFilt ei toimu. Seetõttu jõuavad skanneerivad ribosoomid põhi-ORFinii ning toimub initsiatsioon (Holcik ja Sonenberg, 2005).

On näidatud, et 5' otsast lugedes on uORF4 piisav *GCN4* ekspressiooni mahasurumiseks, kuna uORF4 järel on mRNA-l ribosoomi dissotseeriv element. Lisaks on näidatud, et uORF1 on vajalik uORF4 ekspressiooni maha suruva mõju vähendamiseks. Selline uORF1 mõju on vajalik *GCN4* ekspresseerimiseks aminohapete nälja korral (Mueller ja Hinnebusch, 1986). Lisaks on näidatud *GCN4* translatsioonilise kontrolli olemasolu võrreldes ribosoomide *GCN4* mRNA-l: rakkude viimisel rikkast söötimest minimaalsöötmesse kasvab polüsoomide arv mRNA-l (Tzamarias, 1989).

GCN4 mRNA translatsioonil skanneerib 48S PIC mRNA 5' liiderjärjestusel. uORF1 startkoodonile jõudes toimub translatsiooni initsiatsioon. Pärast translatsiooni terminatsiooni jäävad umbes pooled 40S subühikud mRNAle ning jätkavad skanneerimist. Kui keskkonnas on piisavalt aminohappeid, on ternaarse kompleksi kontsentratsioon piisav. Seetõttu inkorporeeritakse ternaarne kompleks 40S subühikule kiiresti. Nii formeerub 48S kompleks, mis on võimeline reinitsiatsiooni läbi viima (joonis 11) (You *et al.*, 2011). Reinitsiatsioon ning translatsioon uORFidelt on aga ebaefektiivne, kuna pärast iga translatsioonitsükli dissotseerub mRNAlt umbes 50% ribosoomidest. Seetõttu toimivad uORFid translatsioonilise barjäärina (Kozak, 1983; Hinnebusch, 2005).

Aminohapete nälja korral fosforüleerib Gcn2 kinaas eIF2 α , mistõttu väheneb rakus GTP-seoselise eIF2 kontsentratsioon (joonis 12) (Hinnebusch, 2005). eIF2-GTP kontsentratsiooni vähenemise tõttu langeb rakus ka ternaarse kompleksi kontsentratsioon. Ternaarse kompleksi väiksema kontsentratsiooni korral ei toimu reinitatsiooni 2.-4. uORFilt ning skanneeriv 48S PIC jõuab põhi-ORFinii ning toimub translatsiooni initsiatsioon GCN4 startkoodonilt (joonis 11) (Grant *et al.*, 1994).



Joonis 12. eIF2 regulatsioon ja eIF2 tsükkel. Lillalt on kujutatud 40S subühik, halli kolmnurgana eIF2, sinise ovaalina on kujutatud eIF2 α seriin 51 fosforülatsioon, punase ringiga on kujutatud GDP, rohelise ringiga on kujutatud GTP, beežilt on kujutatud eIF2B. Translatsiooni initsiatsiooniks on vajalik ternaarne kompleks, mis seondub 40S subühikule. Pärast startkoodoni äratundmist toimub GTP hüdrolyüs ning eIF2 dissotseerub. Seejärel on vajalik eIF2 taaskasutus. Aminohapete nälja korral fosforüleerib Gcn2 eIF2 α , mistõttu eIF2 ei ole võimalik taaskasutada, kuna fosforüleeritud eIF2 α seondub eIF2B-le nii, et see ei saa enam toimida nukleotiidi vahetusfaktorina (modifitseeritud Dever *et al.*, 2016 järgi).

eIF2-GTP kontsentratsiooni vähenemise tõttu langeb rakus ka ternaarse kompleksi kontsentratsioon. Ternaarse kompleksi väiksema kontsentratsiooni korral ei toimu reinitatsiooni 2.-4. uORFilt ning skanneeriv 48S PIC jõuab põhi-ORFinii ning toimub translatsiooni initsiatsioon GCN4 startkoodonilt (joonis 11) (Grant *et al.*, 1994).

Sellist stressivastust aminohapete näljale nimetatakse pagaripärmis üldiseks aminohapete kontrolliks. Aminohapete nälga on võimalik indutseerida inhibeerides aminohapete biosünteesi. Aminohapete biosünteesi on rakus võimalik inhibeerida antimetaboliitide või biosünteesi raja ensüümi mutatsiooniga (Niederberger *et al.*, 1981). Lisaks on näidatud, et üldise aminohapete kontrolli vastust on võimalik initseerida ka rakkude viimisel rikkast söötmest minimaalsöötmele (Driscoll-Penn *et al.*, 1984).

Ülegenoomsed uuringud on näidanud, et Gcn4p indutseerib lisaks aminohapete biosünteesiraja geenidele ka vitamiinide prekursorite, peroksüsoomi komponentide, mitokondriaalsete kandjavalgude, aminohapete transpordivalgude ning autofaagia valgude biosünteesi. Sellist indutseerimist võib seletada nende molekulide potentsiaalse funktsiooniga tõsta rakus aminohapete konsentratsiooni (Natarajan *et al.*, 2001).

EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev magistritöö on osaks suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 rolli ribosoomi funktsioneerimisel ning selgitada subühikutevaheliste sildade kooperatiivsust. Ribosoomi subühikutevahelised sillad eB12, eB13 ja eB14 on eukarüoodispetsiifilised sillad. Sillad eB12 ning eB13 asuvad ribosoomi solvendipoolisel pinnal, sild eB14 on aga ainuke eukarüoodispetsiifiline subühikutevaheline sild, mis asub ribosoomi keskosas.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Selgitada, kuidas mõjutab pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ning eB14 puudumine rakkude kohanemist aminohapete näljaga
2. Uurida, kuidas ribosoomi subühikutevahelised sillad eB12, eB13 ja eB14 mõjutavad ribosoomide reinitsiatsioonivõimet uORFe sisaldavalt mRNAlt
3. Analüüsida ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 kooperatiivsust reinitsiatsioonil

2.2 Materjal ja metoodika

Kasutatud pagaripärmi tüved on toodud tabelis 1. Kasutatud söötmed on toodud lisas 1. Töös kasutatud praimerid on toodud lisas 2. Kasutatud plasmiidid on toodud lisas 3.

Tabel 1. Töös kasutatud pagaripärmi tüved.

Tüve nimi kollekttsioonis	Genotüüp	Päritolu
3642	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 Δgcn2</i>	EUROSCARF
TYSC92	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1</i>	Labori kollekttsioon
TYSC309	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1</i>	Labori kollekttsioon
TYSC360	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 [pRS315-rpl19₁₋₁₄₆]</i>	Labori kollekttsioon
TYSC488	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6</i>	Labori kollekttsioon

TYSC514	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δgcn2::natMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC531	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC532	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6</i>	Labori kolleksioon
TYSC538	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1</i>	Selles töös valmistatud
TYSC559	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC561	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6</i>	Labori kolleksioon
TYSC567	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6 Δrpl24A::hphMX6 Δrpl24B::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC572	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6 [pRS315-rpl19₁₋₁₄₆]</i>	Labori kolleksioon
TYSC577	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δgcn2::natMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC596	<i>MATa ura3-52 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1 Δrpl19A::kanMX6 Δrpl19B::kanMX6 Δrpl41A::natMX6 Δrpl41B::natMX6 [pRS315-rpl19₁₋₁₄₆]</i>	Selles töös valmistatud

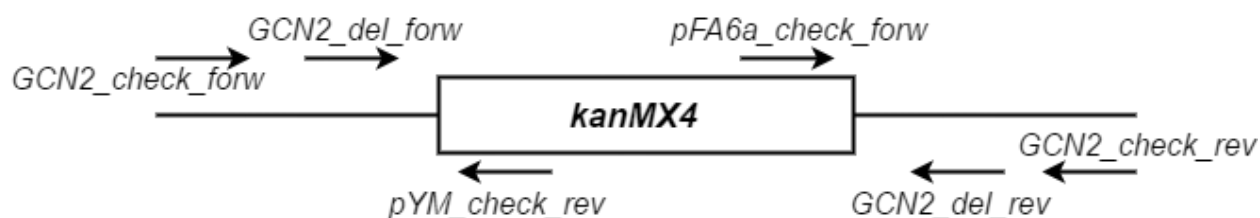
2.2.1 *Δgcn2* tüve konstrueerimine

Δgcn deletsioonikasseti amplifitseerimiseks viidi läbi kaheetapiline PCR reaktsioon. *Δgcn2* deletsioonikasseti amplifitseerimiseks vajalike DNA fragmentide sünteesimiseks kasutati koos praimereid *GCN2_DEL_forw* ja *pYM_check_rev* või *pFA6a_check_forw* ja *GCN2_DEL_rev* (joonis 13; lisa 2). PCR viidi läbi kasutades Pfu polümeraasi ning umbes 100 ng *Δgcn2* tüve (3642) genoomset DNAd. *GCN2_DEL_forw* ja *pYM_check_rev* praimerite abil amplifitseeriti fragment pikkusega 401 nukleotiidi, *pFA6a_check_forw* ja *GCN2_del_rev* praimerite abil amplifitseeriti fragment pikkusega 282 nukleotiidi (joonis 13). Reaktsioonisegu analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil (Bio-Rad Laboratories PowerPac basic ja Biometra Compact XS/X horisontaalne geelelektroforeesi süsteem). Saadud fragmendid puhastati geelist Favorgen FavorPrep GEL/PCR kitiga. Saadud produktid nimetati *GCN2* 5-UTR ja *GCN2* 3-UTR.

Δgcn deletsioonikasseti amplifitseerimiseks viidi läbi *overlap*-PCR. Amplifitseerimiseks kasutati koos praimereid *GCN2_DEL_forw*, *GCN2_DEL_rev* ning *GCN2* 5-UTR ja *GCN2* 3-UTR fragmente (joonis 13). *Overlap*-PCR viidi läbi 50μl reaktsioonisegus kasutades 2,5U Pfu polümeraasi, umbes 100 ng *pFA6a-natMX6* plasmiidset DNAd. Reaktsioonisegusse lisati DMSOd lõppkonsentratsiooniga 5%. *Overlap*-PCR abil saadi fragment pikkusega 1627 nukleotiidi. Reaktsioonisegu analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil (Bio-Rad Laboratories PowerPac basic ja Biometra Compact XS/X horisontaalne geelelektroforeesi süsteem). Saadud fragment puhastati geelist Favorgen FavorPrep GEL/PCR kitiga ning transformeeriti pagaripärmi tüvesse TYSC309 LiOAc meetodil (Knop *et al.*, 1999).

Transformantide kontrolli jaoks eraldati rakkudest genoomne DNA LiOAc-SDS meetodil (Lõoke *et al.*, 2011). Kontroll-PCRil kasutati *pFA6a_check_forw* ja *GCN2_check_rev* praimereid või *GCN2_check_forw* ja *pYM_check_rev* praimereid (joonis 13; lisa 2).

Saadud fragment oli *pFA6a_check_forw* ja *GCN2_check_rev* praimereid kasutades 482 nukleotiidi pikk ning *GCN2_check_forw* ja *pYM_check_rev* praimereid kasutades 863 nukleotiidi pikk. Uus tüvi nimetati TYSC514.



Joonis 13. Kaheetapilise PCR reaktsioonil kasutatud praimerite seondumiskohad *Δgcn2* mutandi *kanMX4* markergeeni sisaldavas lookuses.

2.2.2 Funktsionaalse *HIS3* lookuse taastamine

HIS3 lookuse taastamiseks eraldati tüvest TYSC92 genoomne DNA LiOAc-SDS meetodil ning *HIS3* lookus amplifitseeriti kasutades *HIS3_forw* ja *HIS3_rev* praimereid (lisa 2). PCR-i segu analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil ning saadud fragment oli pikkusega 1439 nukleotiidi, mis puhastati geelist Favorgen FavorPrep GEL/PCR kitiga. Eraldatud fragment transformeeriti pagaripärmi tüvedesse kasutades LiOAc meetodit (tabel 2). Transformandid selekteeriti SC-HIS söötmel, integratsiooni kontrolliks eraldati transformantidest genoomne DNA kasutades LiOAc-SDS meetodit ning viidi läbi PCR kasutades *HIS3_check_forw* ja *HIS3_check_rev* praimereid (lisa 2).

Reaktsioonisegu analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil. Funktsionaalse *HIS3* geeni taastamisel oli amplifitseeritud fragment pikkusega 892 nukleotiidi. Uued tüved on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Funktsionaalse *HIS3* taastamine

<i>his3Δ200</i> tüvi	<i>HIS3</i> tüvi
TYSC309	TYSC538
TYSC514	TYSC577
TYSC360	TYSC516
TYSC488	TYSC531
TYSC532	TYSC599
TYSC561	TYSC567
TYSC572	TYSC596

2.2.3 Tilk-külv

Tilk-külv meetodi puhul külvati söötmele täpne arv eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid rakke. Selleks inokuleeriti pagaripärmi üksikkoloonia SC-HIS vedelsöötmesse ja kasvatati 30°C juures üleöö. Seejärel mõõdeti rakukultuuri tihedus OD_{600nm} juures. Kultuure lahjendati nii, et 5 µl kultuuris oli 5000 rakku. Järgnevalt tehti neli lahjendust kus 5 µl sisaldus 2500 rakku, 500 rakku, 50 rakku ja 10 rakku. Igast lahjendusest külvati 5 µl tilgana SC-HIS, SC-TRP või SC-HIS+30mM 3AT söötmetele. Rakke kasvatati 30°C juures SC-HIS ja SC-TRP söötmetel 2 ööpäeva, SC-HIS+30mM 3AT söötmel 3 ööpäeva. Tassid pildistati kasutades digitaalkaamerat (Seiko Epson Photo PC 3100Z, 3,3 Mpix) ja pilte töödeldi programmiga Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated). Katset korraldati vähemalt 2 korda.

2.2.4 Lutsiferaasidel põhinev reportersüsteem

Lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi katse läbiviimiseks transformeeriti funktsionaalse *HIS3* lookusega pagaripärmi tüvedesse plasmiid *pVW31* (Steffen *et al.* 2008). Kahe lutsiferaasi testi jaoks inokuleeriti üksikkoloonia SC-URA-HIS selektiivsöötmesse, mis sisaldas 40mM leutsiini ning kasvatati üleöö 30°C juures. Üleöö kasvanud rakukultuuri lahjendati ning kasvatati eksponentsiaalse kasvufaasini. Rakulüsaadi valmistamiseks kasutati 4 ml rakukultuuri, rakud koguti tsentrifuugimise teel Rotina 420R tsentrifuugis (3 min 3200rpm 4°C) (Swingout rotor Cat. No. 4723). 5ml rakukultuurile lisati 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 40mM ning kasvatati 30°C juures 5 tundi, misjärel rakulüsaadi valmistamiseks eraldati 4 ml rakukultuuri. Rakud koguti tsentrifuugimise teel (3 min 3200rpm 4°C) Rotina 420R tsentrifuugis. Rakke pesti 900µl 1x PBS(14mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄) millele oli lisatud fenüülmetüülsulfonüülfluoriidi (PMSF) lõppkonsentratsiooniga 1mM (PBS+PMSF). Rakkudele lisati 300µl PBS+PMSF ja klaaskuule (dm 0,2mm) ning lüüsi Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisaatoriga, kasutatades pärmirakkude lüüsimise programmi (6000rpm 3x60 sekundit 60 sekundiliste vahedega). Rakulüsaati tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (5 min 5000rpm 4°C). Supernatant viidi uude 1,5ml tuubi ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (5 min 5000rpm 4°C). Supernatanti kasutati lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmisteks. *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmiseks kasutati Dual Luciferase Assay System (Promega). *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks lisati 5µl rakulüsaadile 50µl LARII reagenti ning lutsiferaasi aktiivsus mõõdeti kasutades Tecan Infinite M200 Pro luminomeetrit. *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks lisati rakulüsaadi ja LARII segule 50µl Stop&Glo reagenti ning lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti kasutades luminomeetrit.

Saadud andmete analüüsimiseks kasutati Microsoft Excel programmi. Tulemused esitati kujul FLuc/RLuc ehk RLA-na. Katset korraldati vähemalt 3 korda.

2.2.5 Miniprep RNA eraldamine pagaripärmi rakkudest

5ml SC-URA-HIS+40mM LEU vedelsöötmesse inokuleeriti pagaripärmi üksikkoloonia ning kasvatati üleöö 30°C juures. Üleöö kasvanud rakukultuurid lahjendati 50ml SC-URA-HIS+40mM LEU söötmesse OD_{600nm}=0,35ni ning kasvatati 30°C juures eksponentsiaalse kasvufaasini. Eksponentsiaalse faasi rakkudele lisati 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 40mM. RNA eraldamiseks kasutati 14ml eksponentsiaalse faasi rakukultuuri ning 3AT juuresolekul kasvatatud rakukultuuri. Rakud eraldati tsentrifuugimisel (3 min 3200rpm 4°C) Rotina 420R tsentrifuugis. Rakke pesti RNA puhvriga (50mM Tris(HCl) pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM EDTA) ning rakud külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -85°C juures.

RNA eraldamiseks sulatati rakud jääl ning rakkudele lisati 120µl RNA puhvrit ja klaaskuule (dm 0,2mm) ning rakud lüüsi füüsikalisel meetodil kasutades Vortex Genie Disruptor täispööretel 3 minutit. Seejärel lisati 450µl RNA puhvrit, mis sisaldas 1,3%SDSi ning 450µl fenooli pH5,0. Rakke lüüsi kasutades Vortex Genie Disruptor täispööretel 3 minutit. Lüsandid klaariti tsentrifuugimisel (10 min 13 000rpm 4°C) lauatsentrifuugis. RNA eraldamiseks viidi läbi fenool-kloroformi töötlus. RNA sadestamiseks lisati 0,1 mahtu 5M NaCl lahust ja 2,5 mahtu 96% etanooli. RNA sadestati -85°C juures üleöö.

RNA tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (10 min 13 000 rpm 4°C). Supernatant eraldati ning sadet pesti 70% etanooliga. Sadet kuivatati 30°C juures 4 minutit. Sade resuspendeeriti 50µl H₂O-s. RNA kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop2000-ga (Thermo Scientific).

2.2.6 DNAas I töötlus

DNaas I töötluste jaoks lahjendati RNA lahused 1µg/µl-ni. DNAasi töötlus viidi läbi reaktsioonisegus lõppmahuga 40µl, mis sisaldas 5µg RNAd, 1x DNAasi reaktsiooni puhvrit, millele oli lisatud MgCl₂ (Thermo Fisher), 4U RNAasivaba DNAas I (Thermo Fisher) ning 0,8U Ribolocki (Thermo Fischer). Reaktsioonisegu inkubeeriti 37°C juures 30 minutit, seejärel lisati reaktsiooni peatamiseks 4µl 25mM EDTA-d ning inkubeeriti 65°C juures 10 minutit. Reaktsioonisegu viidi jääle ning lisati 110µl H₂O-d ja 15µl 3M NaOAc. RNA puhastamiseks lisati 1 maht fenoolkloroformi, segati vortexil ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis (5 min 13 000 rpm 4°C). Veefaas viidi uude tuubi ning lisati 2,5 mahtu 96% etanooli. RNA sadestati -85°C juures üleöö. Pärast sadestamist tsentrifuugiti segu lauatsentrifuugis (15 min 13 000 rpm 4°C). Sadet pesti 70% etanooliga ning kuivatati 30°C juures 10 minutit. RNA lahustati 5,25µl H₂O-s.

2.2.7 cDNA süntees ja kvantitatiivne reaalaaja PCR

cDNA sünteesimise jaoks kasutati praimerite segu, kus igat praimerit oli 20pmol. Seejärel segati kokku 1,5µg DNAas I-ga töödeldud RNA-d, praimerite segu ning H₂O lõppmahuga 8µl. RNA denatureerimiseks inkubeeriti RNAd 65°C juures 5 minutit, mis seejärel jahutati jääl. Reaktsioonisegu segati kokku lõppmahus 20µl, mis sisaldas 1x puhvrit, 1mM dNTPd, 160U revertaasi ning 5,2µl H₂O-d, primereid ning denatureeritud RNAd. Reaktsioonisegu inkubeeriti 42°C juures 60 minutit. Reaktsioon seisis inkubeerides reaktsioonisegu 70°C juures 10 minutit, misjärel reaktsioonisegu viidi jääle.

Kvantitatiivse pöördtranskriptaasi PCR (qRT-PCR) viidi läbi cDNA-dega, mida lahjendati 80 korda H₂O-s. Reaktsioon viidi läbi lõppmahus 10µl, mis sisaldas 4µl cDNA-d, 1x qPCRi *master mix*-i (Thermo Scientific) ning *UBC6*, *ARP6*, *FLuc* või *GCN4* spetsiifilisi *reverse* ja

forward praimereid lõppkonsentratsiooniga 1pmol/μl (lisa 2). cDNA, DNAasi töötluste kontrollid ning H₂O pipeteeriti 384 kaevuga plaadile (384 well plate, ABI compatible type, Bioplastics BV). Kõiki proove analüüsiti kolme paralleelina. PCR viidi läbi kasutades ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati järgnevat programmi: 95°C 15 min, seejärel 40 tsüklit: 95°C 15 sek ja 60°C 1 min.

Tulemuste analüüsiks kasutati võrdleva C_T meetodit (Schmittgen ja Livak, 2008) ning *GCN4* ja *FLuc* ekspressioonitase normaliseeriti *UBC6* ja *ARP6* ekspressioonitasemete suhtes. Saadud andmete analüüsimiseks kasutati Microsoft Excel programmi.

Katset viidi läbi 1 kord kasutades iga tüve 3 paralleelse rakukultuuri cDNAid.

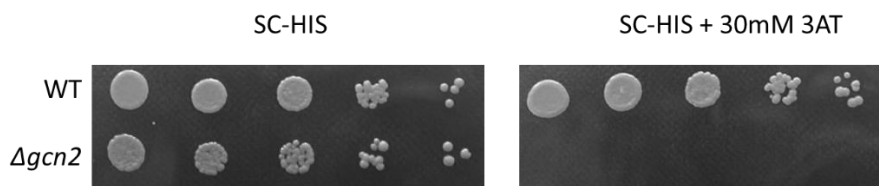
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *Δgcn2* mutandi histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Üldise aminohapete stressi vastusel on oluline roll transkriptsioonifaktor *Gcn4-l*. *GCN4* translatsiooni reguleerivad neli 5' liiderjärjestuses asuvat uORFi. Aminohapete nälja korral aktiveeritakse pagaripärmis kinaas *Gcn2*. *Gcn2* aktivatsiooniks on vajalik laadimata tRNAde kuhjumine rakus (Ramirez *et al.* 1992). *Gcn2* aktivatsioonil fosforüleeritakse *eIF2α*. Seetõttu ei moodustu rakus piisavalt ternaarset kompleksi. Ternaarse kompleksi vähenenud kontsentratsiooni korral transleeritakse *GCN4* mRNA (Grant *et al.*, 1994).

Varasemalt on teada, et *Δgcn2* tüvi on tundlik aminohapete näljale, kuna *eIF2α-t* ei fosforüleerita ning seetõttu ei ekspresseeru aminohapete näljaga toimetulekuks vajalik valk *Gcn4* (Hinnebusch ja Natarajan, 2002). Seepärast kontrolliti konstrueeritud *Δgcn2* tüve 3-aminotriasooli (3AT) tundlikkust. 3AT-d kasutatakse histidiininalja tekitamiseks: 3AT inhibeerib rakus histidiini sünteesi (Natarajan *et al.* 2001). 3AT tundlikkuse uurimiseks on vajalikud pagaripärmi tüved, mis on histidiini prototroofid, kuna histidiininalg indutseeritakse histidiini biosünteesi inhibeerimisega. Seepärast taastati kõikides uuritavates tüvedes funktsionaalne *HIS3* (tabel 2).

3AT tundlikkust kontrolliti tilk-külvi meetodil. Selleks kasvatati rakke üleöö 30°C SC-HIS selektiivsöötmes. Vastavatest rakukultuuridest tehti lahjendused ning igast lahjendusest külvati 5µl selektiivsöötmele SC-HIS või SC-HIS, millele oli lisatud 3AT lõppkonsentratsiooniga 30mM. Rakke kasvatati SC-HIS selektiivsöötmel vähemalt 2 ööpäeva 30°C juures, 3AT-d sisaldaval selektiivsöötmel kasvatati rakke 3 ööpäeva 30°C juures (joonis 14).



Joonis 14. Metsiktüübi (TYSC531) ja *Δgcn2* deletsioonmutandi (TYSC577) 3AT tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 ööpäeva selektiivsöötmetel SC-HIS või SC-HIS, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM.

Tilk-külv analüüsi tulemusel selgus, et nii metsiktüüpi kui *Δgcn2* tüved kasvavad SC-HIS selektiivsöötmel. Lisaks leiti, et histidiini nälja korral moodustuvad metsiktüübil kolooniad sarnaselt SC-HIS söötmel kasvavatele rakkudele. *Δgcn2* rakud ei moodusta SC-HIS+30mM 3AT selektiivsöötmel kolooniaid, kuna *Δgcn2* tüves ei toimu *GCN4* translatsioon

histidiininalja korral (joonis 14). Sellest järeldati, et konstrueeritud *Δgcn2* tüve fenotüüp vastab varem kirjeldatud fenotüübile (Hinnebusch ja Natarajan, 2002).

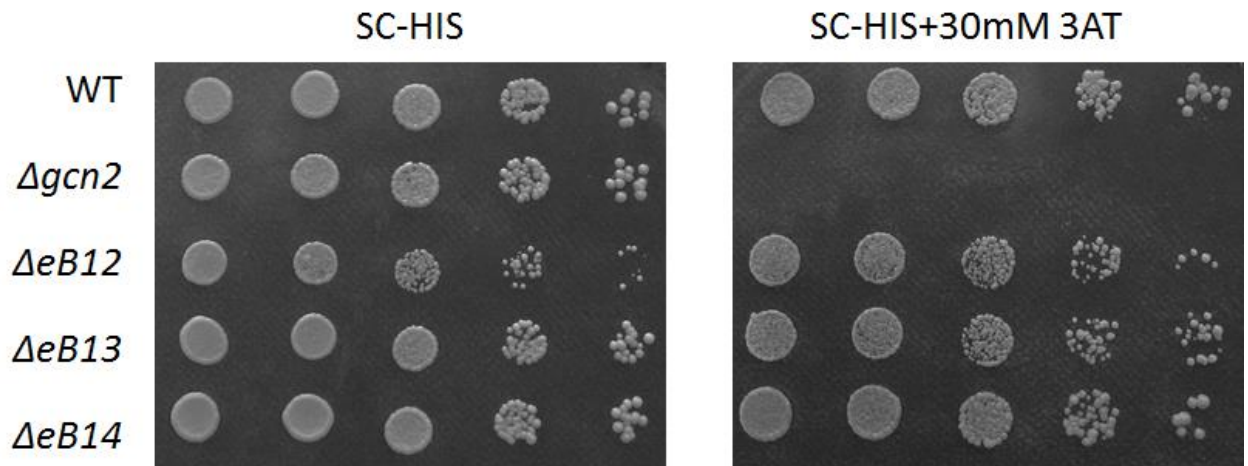
2.3.2 Ribosoomi subühikutevahelise silla eB12, eB13 või eB14 mutantide histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Antud töö üheks eesmärgiks on leida, kuidas mõjutavad pagaripärmi ribosoomi subühikutevahelised sillad eB12, eB13 ja eB14 rakkude võimet tulla toime aminohapete näljaga. Aminohapete näljaga toimetulekut uuriti tilk-külvi meetodil. Tilk-külvi läbiviimiseks kasutati tüvesid, mille ribosoomidel oli puudu vastavalt eB12, eB13 või eB14 sild. Kontrolliks kasutati metsiktüüpi ja *Δgcn2* tüve.

Ribosoomi subühikutevahelise silla eB13 moodustumises osaleb valk eL24, mis ei ole eluks hädavajalik. Seetõttu on võimalik mõlema eL24 kodeeriva geeni *RPL24A* ning *RPL24B* deletsioon. Käesolevas töös on kasutatud *ΔeL24* tüve, millesse transformeeriti *pRS314*, *pRS314-eL24₍₁₋₆₅₎* või *pRS314-eL24* plasmiidid. Saadud transformante nimetati vastavalt *ΔeL24*, *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24*. Plasmidi *pRS314* seleksiooniks kasutati *TRP1* seleksioonimarkerit. Tüves *ΔeB13* ekspresseeritakse eL24 aminohapped 1-65 plasmiidilt *pRS314-eL24₍₁₋₆₅₎* ning tüves *ΔeL24+eL24* ekspresseerub plasmiidilt *pRS314-eL24* metsiktüüpi valk eL24. Kuna SC-HIS söötmel plasmidi seleksioon puudub, külvati rakud ka SC-TRP selektiivsöötmele (lisa 4). SC-TRP selektiivsöötmele kasvab *Δgcn2* tüvi metsiktüübist oluliselt aeglasemalt (Zaborske *et al.*, 2010), seetõttu viidi edasised katsed läbi SC-HIS söötmeid kasutades.

Tilk-külv analüüsi läbiviimiseks külvati 5µl üleöö kasvanud lahjendatud rakke SC-HIS, SC-TRP või SC-HIS selektiivsöötmele, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM,. Rakke inkubeeriti 30°C juures SC-HIS ja SC-TRP selektiivsöötmetel 2 ööpäeva ning SC-HIS söötmel, kuhu oli lisatud 3AT-d, 3 ööpäeva (joonis 15).

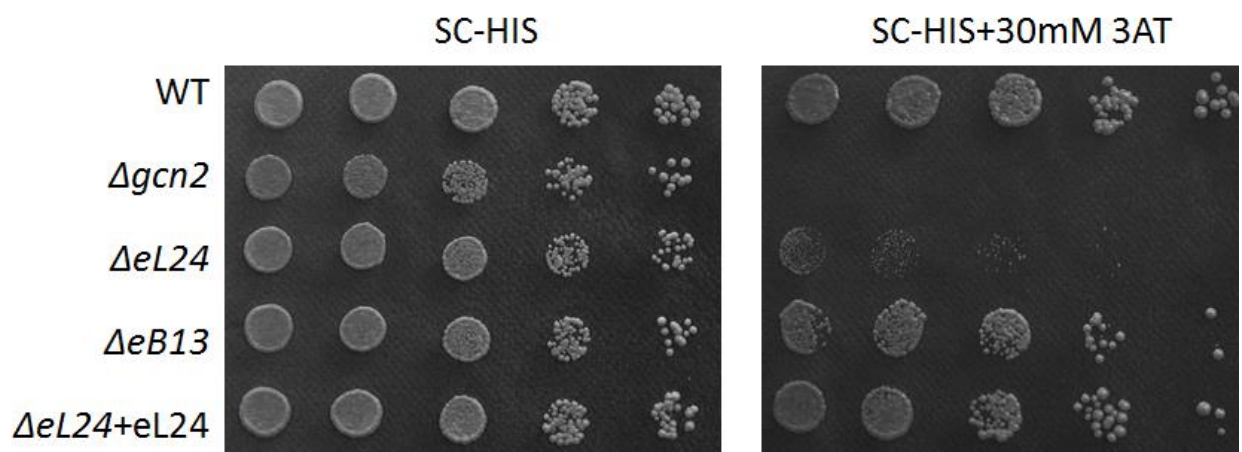
Tüved, millel puudub eB12, eB13 või eB14 subühikutevaheline sild, ei ole histidiininaljale tundlikud, kuna rakud kasvavad 3AT-d sisaldaval söötmel sarnaselt metsiktüüpi rakkudega (joonis 15). Antud tulemustest võib järeldada, et silla eB12, eB13 või eB14 puudumine ei mõjuta *GCN4* translatsiooni aminohapete nälja korral.



Joonis 15. Ribosoomi subühikutevaheliste sildade mutantide *ΔeB12*(TYSC516), *ΔeB13*(TYSC531) või *ΔeB14*(TYSC599) histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 ööpäeva selektiivsöötmetel SC-HIS või SC-HIS, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM.

2.3.3 Valgu eL24 mutantide histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Tilk-külv analüüsi tulemused näitasid, et tüvi, milles puudub sild eB13, ei ole histidiininaljale tundlik. Antud tüves oli aga plasmiidilt ekspresseeritud eL24 N-terminaalne globullaarne domeen. Uurimaks eL24 mõju aminohapete näljaga toimetulekuks viidi läbi tilk-külv analüüs kolme erineva tüvega: *ΔeL24*, *ΔeB13* ning *ΔeL24+eL24*. Kontrollina kasutati metsiktüüpi ning *Δgcn2* tüve. Tilk-külv analüüsi läbiviimiseks külvati rakud SC-HIS, SC-TRP või SC-HIS+30mM 3AT selektiivsöötmetele (joonis 16). Rakkude kasv SC-TRP söötmel on toodud lisas 4.

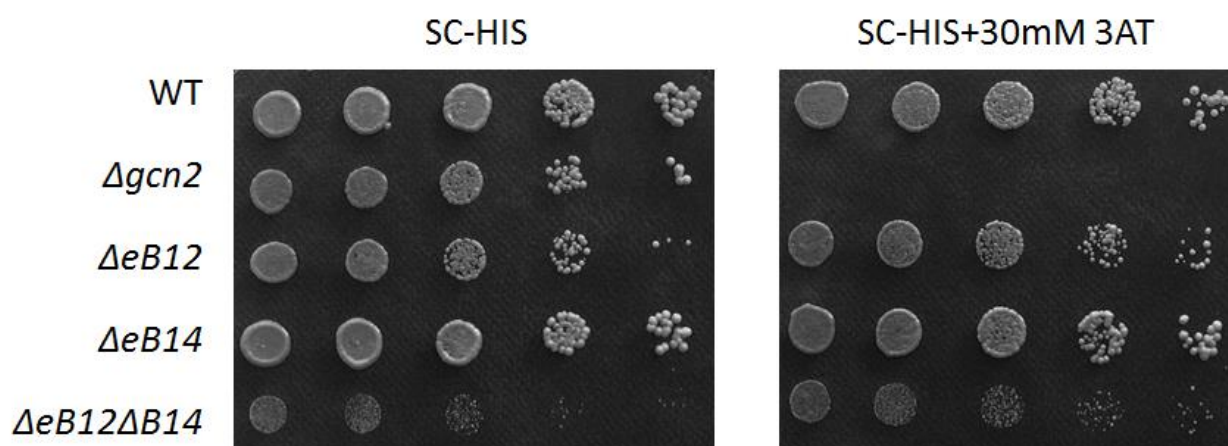


Joonis 16. Valgu eL24 mutantide *ΔeL24*(TYSC531+*pRS314*), *ΔeB13*(TYSC531+*pRS314+eL24*₍₁₋₆₅₎) ning *ΔeL24+eL24*(TYSC531+*pRS314+eL24*) histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 ööpäeva selektiivsöötmetel SC-HIS või SC-HIS, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM.

Tüvi *ΔeL24* on tundlik histidiininaljale, kuna SC-HIS+30mM 3AT selektiivsöötmel on rakkude kasv oluliselt aeglasem võrreldes rakkude kasvuga SC-HIS söötmel (joonis 16). Seepärast võib oletada, et eL24 N-globullaarne domeen on oluline *GCN4* ekspressiooniks aminohapete nälja korral.

2.3.4 Ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12 ja eB14 mutandi histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Tilk-külv analüüsi tulemustel leiti, et eB12, eB13 või eB14 silla puudumine ei mõjuta rakkude 3AT tundlikkust. Seepärast uuriti, kuidas mõjutab kahe silla puudumine rakkude histidiininalja tundlikkust. Histidiininalja tundlikkust uuriti tilk-külvi meetodi abil. Tilk-külv analüüsi läbiviimiseks kasutati *ΔeB12*, *ΔeB14*, *ΔeB12ΔeB14*, metsiktüübi ning *Δgcn2* rakke. Rakud külvati SC-HIS või SC-HIS+30mM 3AT selektiivsöötmetele (joonis 17).

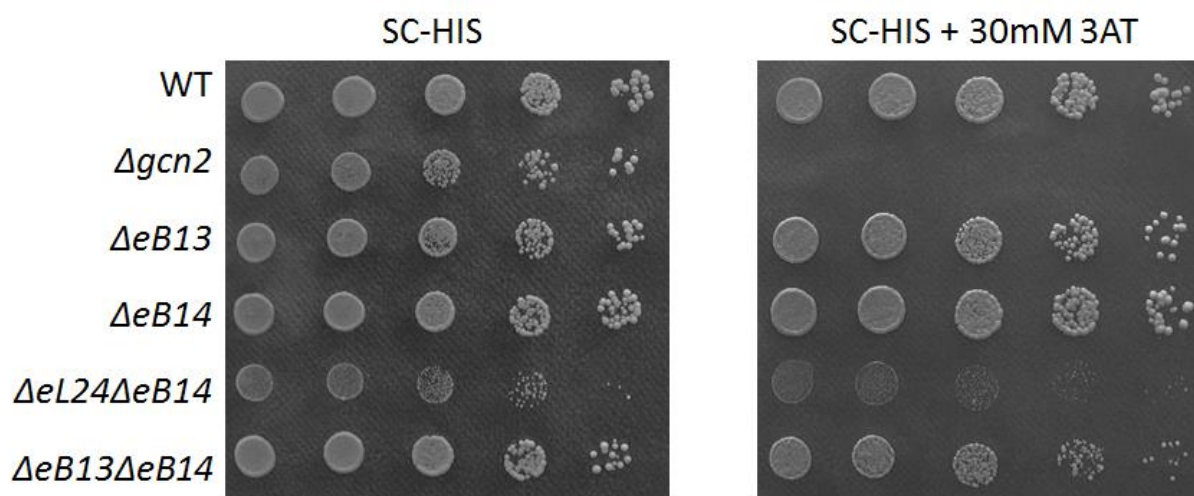


Joonis 17. Ribosoomi subühikutevaheliste sildade mutandi *ΔeB12ΔeB14* (TYSC572) histidiininalja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 ööpäeva selektiivsöötmetel SC-HIS või SC-HIS, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM.

Ribosoomi sillamutant *ΔeB12ΔeB14* moodustab SC-HIS+30mM 3AT söötmel kolooniaid sarnaselt SC-HIS söötmele (joonis 17). Seega ei ole tüvi *ΔeB12ΔeB14* histidiininaljale tundlik. Antud tüvi on aeglase kasvu fenotüübiga, kuid see ei ole põhjustatud histidiini näljast. Antud tulemustest võib järeldada, et rakkudes, milles puuduvad sillad eB12 ja eB14 ekspresseerub aminohapete nälja korral *GCN4* sarnaselt metsiktüübile.

2.3.5 Valgu eL24 ja ribosoomi subühikutevahelise silla eB14 mutandi histidiinälja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil

Antud töös leiti, et silla eB12, eB13 või eB14 puudumine ei mõjuta rakkude histidiinälja tundlikkust. Samas, $\Delta eL24$ tüvi on tundlik histidiinäljale. Seetõttu uuriti, kas tüvi, millel puuduvad eL24 ning eB14 või sillad eB13 ja eB14 on histidiinäljale tundlikumad kui mutandid, millel puudub eB12, eB13 või eB14 sild. Tilk-külv analüüsi läbiviimiseks kasutati tüvesid $\Delta eB13$, $\Delta eB14$, $\Delta eL24\Delta eB14$, $\Delta eB13\Delta eB14$. Kontrollina kasutati metsiktüüpi ning $\Delta gcn2$ tüve. Rakud külvati SC-HIS või SC-HIS+30mM 3AT selektiivsöötmetele (joonis 18). Kasv SC-TRP söötmel on toodud lisas 4.



Joonis 18. Valgu eL24 ja ribosoomisilla eB14 mutantide $\Delta eL24\Delta eB14$ (TYSC567+*pRS314*) ja $\Delta eB13\Delta eB14$ (TYSC567+*pRS314*+*eL24*₍₁₋₆₅₎) histidiinälja tundlikkuse analüüs tilk-külv meetodil. Rakke kasvatati 2-3 ööpäeva selektiivsöötmetel SC-HIS ja SC-HIS, millele oli lisatud 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 30mM.

Tilk-külv analüüsi tulemusena leiti, et rakud, millel puudub valk eL24 on histidiinäljale tundlikud (joonis 18, $\Delta eL24\Delta eB14$). Samas ei ole histidiinäljale tundlik tüvi, millel on puudu ribosoomi subühikutevahelised sillad eB13 ja eB14 (joonis 18, $\Delta eB13\Delta eB14$). Antud tulemustest võib järeldada, et *GCN4* ekspressiooniks aminohapete nälja korral on oluline eL24 N-terminaalne globullaarne domeen. Seetõttu kasutati edaspidiste eksperimentide läbiviimisel tüvesid $\Delta eL24$, $\Delta eB13$, $\Delta eL24$ +eL24, $\Delta eB14$, $\Delta eL24\Delta eB14$, $\Delta eB13\Delta eB14$, WT ning $\Delta gcn2$.

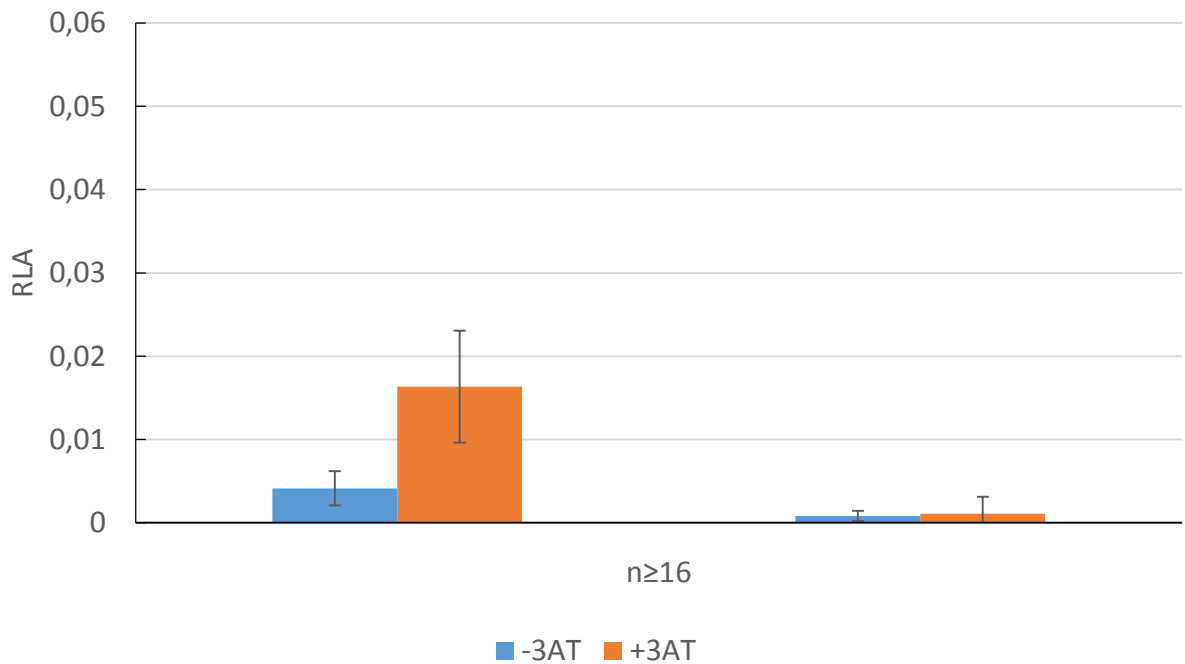
2.3.6 Renilla ja Firefly lutsiferaaside reportersüsteem

Tilk-külv analüüsi tulemuste kinnitamiseks on võimalik kasutada kahe lutsiferaasi reportersüsteemi. Antud reportersüsteem *pVW31* koosneb konstitutiivselt ekspresseeritavast *Renilla* lutsiferaasist ning *Firefly* lutsiferaasist, mille ette on viidud *GCN4* promootor ning 5'

liiderjärjestus (lisa 5) (Steffen *et al.* 2008). Käesoleva reportersüsteemi abil on võimalik mõõta *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaaside aktiivsuseid. Kuna *Firefly* lutsiferaasi ekspressioon on reguleeritud *GCN4* promootori ning 5' liiderjärjestuse poolt, ekspresseerub *Firefly* lutsiferaas sarnaselt *GCN4*-le. Antud reportersüsteemi abil on lihtne uurida, kas histidiininälgale tundliku tüve fenotüüp on põhjustatud vähenenud Gcn4 ekspressioonitasemest. Tilk-külvi tulemusel leiti, et tüvi *Δgcn2* 3AT-d sisaldaval söötmel kolooniaid ei moodustanud: *Δgcn2* tüvi on tundlik 3AT-le kuna antud tüves ei toimu eIF2α fosforülatsiooni. Seepärast ei ekspresseerita stressitingimustes *GCN4* ning rakud ei suuda aminohapete stressiga kohaneda.

Kahe lutsiferaasi reportersüsteemi katse jaoks kasvatati tüved WT ning *Δgcn2*, millesse oli varem transformatsiooni käigus viidud *pVW31* plasmiid, üleöö 30°C juures SC-URA-HIS söötmes, millesse oli lisatud leutsiini lõppkonsentratsiooniga 40mM. Leutsiini liig söötmes surub maha üldist aminohapete stressivastust ning seeläbi muudab rakud 3AT-le tundlikumaks (Lee *et al.*, 2007). Rakulüsaatide valmistamiseks kasutati 4ml eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid rakke. Histisiininälgja indutseerimiseks lisati rakkudele 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 40mM ning rakke kasvatati 30°C juures 5 tundi. Pärast histidiininälgja indutseerimist eraldati 4 ml rakukultuuri rakulüsaadi valmistamiseks. Rakulüsaatidest mõõdeti *Firefly* (FLuc) ja *Renilla* (RLuc) aktiivsused. Tulemused esitati kujul FLuc/RLuc ehk RLA-na (ingl. k *relative luciferase activities*) (joonis 18).

Enne 3AT lisamist rakukultuurile on RLA väärtus WT puhul on keskmiselt $4,3 \pm 2,059 \times 10^{-3}$. Pärast 3AT lisamist on RLA keskmiselt $15,5 \pm 6,74 \times 10^{-3}$. Seega tõuseb 3AT lisamisel reporteri aktiivsus rakkudes umbes 3 korda. Samas, *Δgcn2* tüves sellist muutust ei toimu: nii enne 3AT lisamist kui pärast 3AT lisamist on reporteri ekspressioon võrreldes WT ekspressiooniga väga madal. Antud tulemus on korrellatsioonis varem avaldatud tulemustega, kus näidati, et *Δgcn2* tüves ei ekspresseerita aminohapete nälgja korral *GCN4* (Hinnebusch ja Natarajan, 2002).



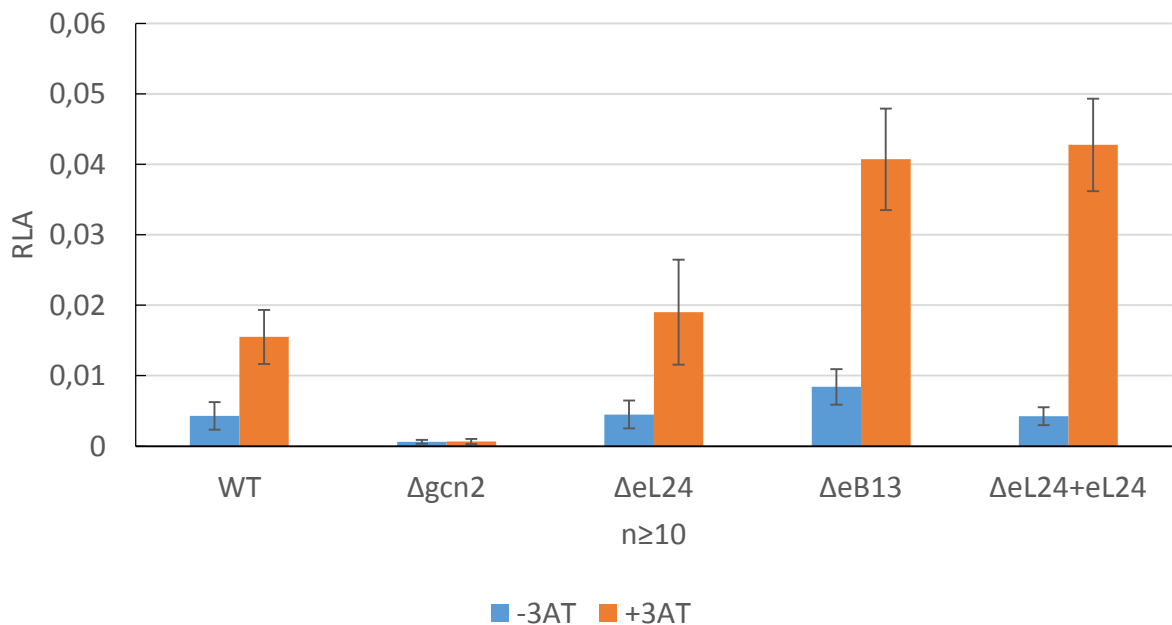
Joonis 19. Lutsiferaasidel põhineva reporteri analüüs metsiktüübi ja $\Delta gcn2$ rakkudes. Sinised tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi enne 3AT lisamist, oranžid tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi pärast inkubeerimist 40mM 3AT-ga. Rakke kasvatati SC-URA-HIS söötmes, millele oli lisatud leutsiini lõppkonsentratsiooniga 40mM. Tulemused on toodud RLAna, n tähistab väikseimat analüüsitud rakukultuuride arvu.

Saadud tulemustest võib järeldada, et FLuc ja RLuc lutsiferaasidel põhinev reportersüsteem töötab ning seda saab kasutada järgnevates katsetes, et uurida, kas $\Delta eL24$ tüve tundlikkus aminohapete näljale on põhjustatud vähenenud *GCN4* translatsioonitasemest.

2.3.7 Lutsiferaaside reporteri aktiivsuse analüüs eL24 mutantides

Tilk-külv analüüsi tulemused näitasid, et tüvi, milles puudub valk eL24, on tundlik histidiininäljale. Tüvi $\Delta eL24$ oli võrreldes metsiktüübiga SC-HIS+30mM 3AT söötmel oluliselt aeglasema kasvuga. Seetõttu püstitati hüpotees, et antud fenotüüp on seotud *GCN4* translatsiooni regulatsiooniga. Antud hüpoteesi kinnitamiseks viidi läbi katse lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemiga.

Lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi katse jaoks kasutati reporterplasmidi sisaldavaid tüvesid WT, $\Delta gcn2$, $\Delta eL24$, $\Delta eB13$ ning $\Delta eL24+eL24$. Rakulüsaat valmistati nagu eelnevalt kirjeldatud. Rakulüsaatidest mõõdeti FLuc ja RLuc aktiivsused. Tulemused esitati RLA-na (joonis 20).



Joonis 20. Lutsiferaaside reporteri analüüs eL24 mutantides. Sinised tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi enne 3AT lisamist, oranžid tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi pärast inkubeerimist 40mM 3AT-ga. Rakke kasvatati SC-URA-HIS söötmes, millesse oli lisatud leutsiini lõppkonsentratsiooniga 40mM. Tulemused on toodud RLAna, n tähistab väikseimat analüüsitud rakukultuuride arvu.

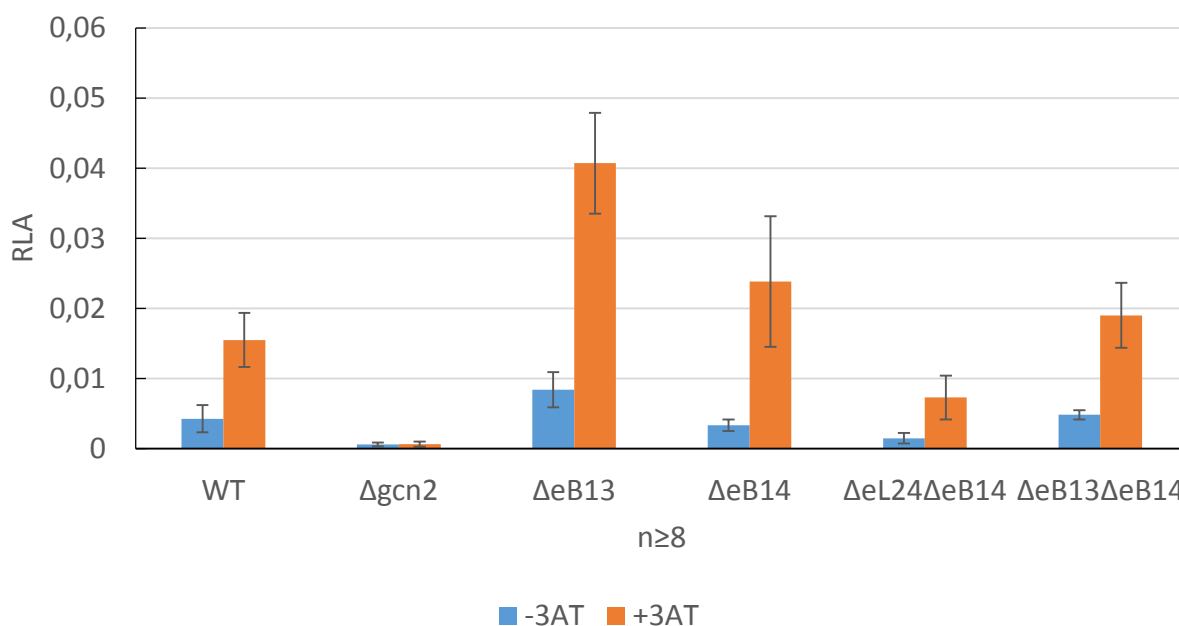
Ekspponentsiaalse kasvufaasi rakukultuuride *ΔeL24*, *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24* RLA väärtused on sarnased metsiktüübile (joonis 20). Pärast 3AT lisamist on *ΔeL24* tüve RLA sarnane 3AT juuresolekul kasvatatud metsiktüübile (joonis 20). Sellest võib järeldada, et *ΔeL24* tüves toimub *GCN4* ekspressioon sarnaselt metsiktüübile ning tundlikkus 3AT-le ei ole põhjustatud vähenenud *GCN4* ekspressioonist.

Tüvedes *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24* on enne 3AT lisamist RLA väärtus sarnane metsiktüübi RLA väärtusega. Pärast histidiinilja indutseerimist on tüvede *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24* RLA võrreldes indutseerimata rakkudega tõusnud. *ΔeB13* tüves on induktsioon keskmiselt 5-kordne ning *ΔeL24+eL24* tüves on induktsioon keskmiselt 10-kordne (joonis 20). Võrreldes metsiktüübi RLA-ga on *ΔeB13* tüves RLA väärtus 3AT lisamise järel 2,5 korda kõrgem ning *ΔeL24+eL24* tüves 2,6 korda kõrgem. Kuna antud reportersüsteemis ekspresseerub FLuc sarnaselt *GCN4*-le võib käesolevatest tulemustest järeldada, et *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24* tüvedes *GCN4* ekspressioonitase kõrgem kui metsiktüüpi rakkudes.

2.3.8 Lutsiferaaside reporteri aktiivsuse analüüs valgu eL24 mutandi ja ribosoomi eB14 sillamutandis

Tilk-külvi katsete tulemused näitasid, et tüvi, milles puudub eL24 valk ning ribosomaalne sild eB14, on tundlik histidiininaljale (joonis 18). Seetõttu püstitati hüpotees, et eL24 on oluline *GCN4* ekspressioonil ning rakkudes, milles puudub eL24 on *GCN4* ekspressioonitase madalam kui metsiktüüpi rakkudes. Lutsiferaasidel põhinevat reportersüsteemi kasutades leiti, et $\Delta eL24$ tüves on aminohapete nälja korral *GCN4* ekspressioon sarnane metsiktüüpi rakkudega. Seepärast uuriti, kas *GCN4* ekspressioon on metsiktüübile sarnane ka tüves, kus puuduvad nii eL24 kui eB14.

Lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi katse jaoks kasutati reporterplasmidi sisaldavad tüvesid WT, $\Delta gcn2$, $\Delta eB13$, $\Delta eB14$, $\Delta eL24\Delta eB14$ ning $\Delta eB13\Delta eB14$. Rakulüsaadid valmistati nagu eelnevalt kirjeldatud. Rakulüsaatidest mõõdeti FLuc ja RLuc aktiivsused. Tulemused esitati RLA-na (joonis 21).



Joonis 21. Lutsiferaaside reporteri analüüs valgu eL24 ja ribosoomisilla eB14 mutandis. Sinised tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes, oranžid tulbad tähistavad FLuc/RLuc väärtusi pärast inkubeerimist 40mM 3AT-ga. Rakke kasvatati SC-URA-HIS söötmes, kuhu oli lisatud leutsiini lõppkonsentratsiooniga 40mM. Tulemused on toodud RLAna, n tähistab väikseimat analüüsitud rakukultuuride arvu.

Enne 3AT lisamist olid tüvede $\Delta eB13$, $\Delta eB14$ ning $\Delta eB13\Delta eB14$ RLA väärtused sarnased metsiktüübi RLAlle (joonis 21). $\Delta eL24\Delta eB14$ rakulüsaadi RLA oli aga metsiktüübi RLA väärtusest madalam 2,8 korda (joonis 21). $\Delta eL24\Delta eB14$ rakulüsaadi RLA oli võrreldes $\Delta gcn2$ RLA väärtusega 1,8 korda kõrgem (joonis 21). Kuigi $\Delta eL24\Delta eB14$ on aelgase kasvu

fenotüübiga, siis antud RLA väärtus ei saa olla põhjustatud kasvufenotüübi poolt, kuna kõik rakukultuurid kasvatati eksponentsiaalse kasvufaasini.

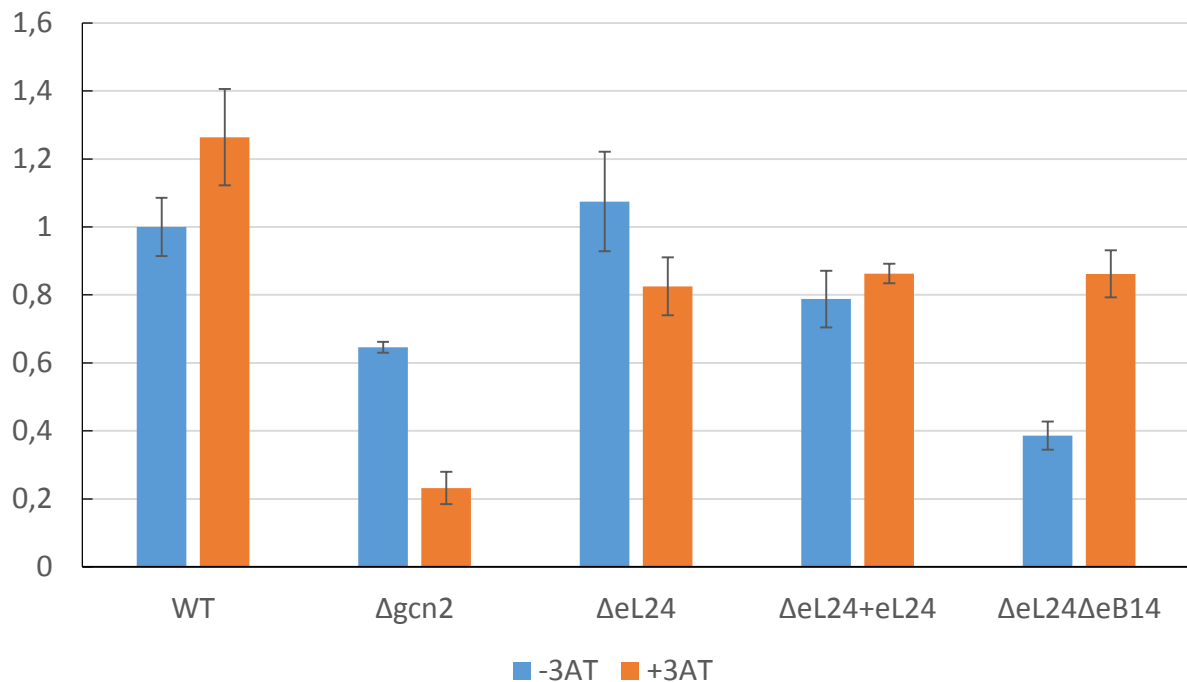
Pärast 3AT lisamist oli tüve *ΔeB13* RLA väärtus metsiktüübi RLA väärtusest kõrgem 2,5 korda (joonis 21). Antud tulemusest võib järeldada, et *GCN4* ekspressioonitase on histidiininalja korral *ΔeB13* tüves kõrgem kui metsiktüübis. Histidiininalja indutseerimise järel on RLA väärtused tüvedes *ΔeB14* ning *ΔeB13ΔeB14* sarnased metsiktüübi RLA-le, millest võib järeldada, et antud tüvedes on *GCN4* ekspressioonitase histidiininalja korral sarnane *GCN4* ekspressioonitasemele metsiktüübis.

Tüve *ΔeL24ΔeB14* RLA väärtus on pärast histidiininalja indutseerimist madalam kui metsiktüübis. RLA väärtus *ΔeL24ΔeB14* tüves pärast 3AT lisamist on 2,2 korda madalam kui metsiktüübi keskmine RLA (joonis 21). Seega on *GCN4* ekspressioon tüves *ΔeL24ΔeB14* 2 korda madalam kui metsiktüübis. Antud tulemus korreleerub ka tilk-külvi analüüsil saadud tulemusega: tüvi *ΔeL24ΔeB14* on tundlik histidiininaljale. Antud tundlikkus võib olla põhjustatud vähenenud *GCN4* ekspressioonist, mille tõttu ei toimu rakkudes stressivastuseks vajalike geenide ekspressiooni.

2.3.9 mRNA taseme kontroll qRT-PCR meetodil

Lutsiferaasidel põhinevat reportersüsteemi kasutades leiti, et *ΔeL24ΔeB14* tüves on reporteri aktiivsus 2 korda madalam kui metsiktüübis. Analüüsima, kas reporteri aktiivsuse erinevus metsiktüübist on tingitud madalamast transkriptsioonitasemest või madalamast mRNA translatsioonitasemest, viidi läbi qRT-PCR, mille abil on võimalik mõõta mRNA taset.

qRT-PCRi läbiviimiseks kasvatati tüved *ΔeL24*, *ΔeL24+eL24*, *ΔeL24ΔeB14*, WT ning *Δgcn2* eksponentsiaalse kasvufaasini. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudele lisati 3AT-d lõppkonsentratsiooniga 40mM ning kasvatati 30°C juures 5 tundi. RNA eraldati eksponentsiaalses kasvufaasis olevatest ning 3AT juuresolekul kasvanud rakkudest. RNAle viidi läbi DNase I töötlus ning sünteesiti cDNA. qRT-PCRi kontrollidena kasutati koduhoidjageene *UBC6* ning *ARP6*. Reporter mRNA taseme mõõtmiseks kasutati *FLuc* spetsiifilisi praimereid ning tsütoplasmas oleva *GCN4* mRNA taseme mõõtmiseks kasutati *GCN4* spetsiifilisi praimereid. *FLuc* spetsiifiliste praimerite abil on võimalik mõõta reporteri *FLuc* mRNA taset ning *GCN4* spetsiifiliste praimerite abil genoomist transkribeeritavat *GCN4* mRNA taset. Tulemused esitati normaliseerituna metsiktüübi suhtes (joonis 22).



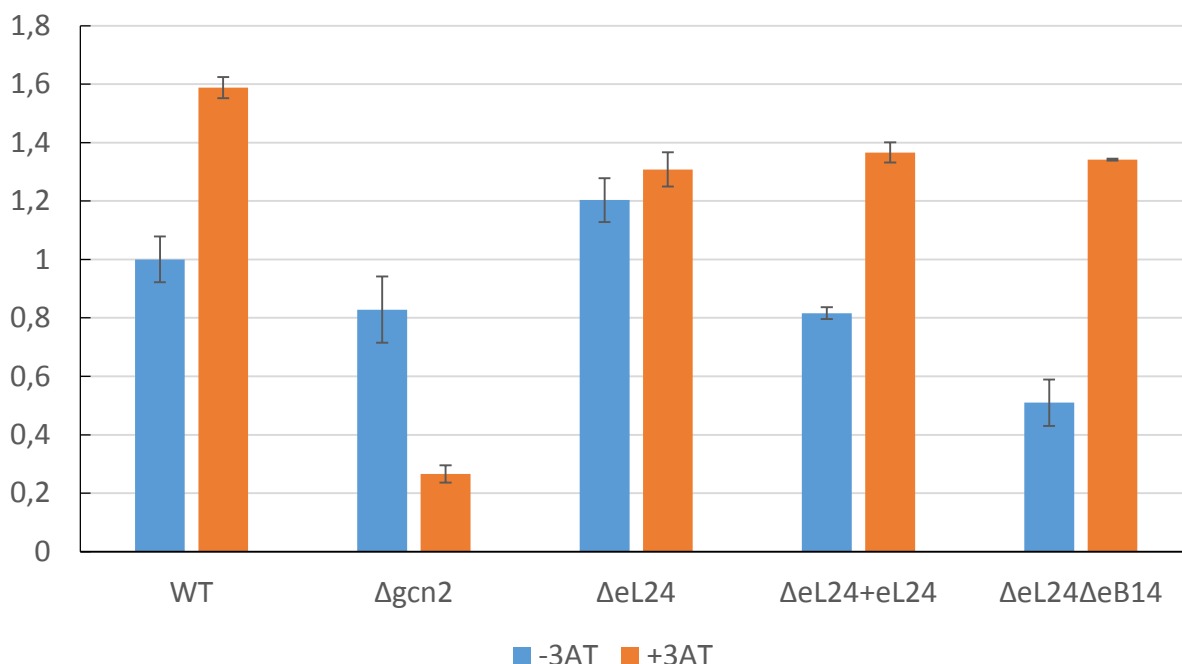
Joonis 22. *FLuc* mRNA taseme analüüs qRT-PCR meetodil. Tulemused on normaliseeritud metsiktüübi suhtes. Sinised tulbad tähistavad mRNA tasemeid enne aminohapetenälja indutseerimist 3AT lisamisega, oranžid tulbad tähistavad mRNA tasemeid pärast aminohapetenälja indutseerimist 3AT lisamisega.

qRT-PCR analüüsi tulemusel leiti, et metsiktüübis tõuseb mRNA tase histidiini nälja indutseerimisel 3AT lisamisega 1,2 korda (joonis 22). Lisaks leiti, et tüves *Δgcn2* on *FLuc* mRNA tase eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes 35% madalam kui metsiktüübis ning pärast histidiininälja indutseerimist 80% madalam kui metsiktüübis (joonis 22). Tüves *ΔeL24* on *FLuc* mRNA tase enne aminohapete nälja indutseerimist sarnane metsiktüübile kuid pärast 3AT lisamist on tüves *ΔeL24* *FLuc* mRNA tase 20% madalam (joonis 22). Tüves *ΔeL24+eL24* *FLuc* mRNA tase enne ning pärast histidiininälja indutseerimist 3AT lisamisega ei muutu (joonis 22).

Tüves *ΔeL24ΔeB14* on *FLuc* mRNA tase eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes 60% madalam kui metsiktüübis. Pärast 3AT lisamist tõuseb *FLuc* mRNA tase tüves *ΔeL24ΔeB14*, kuid jääb madalamale kui metsiktüübi tase (joonis 22). Antud tulemustest võib järeldada, et reporteri madal aktiivsus histidiininälja korral ei ole põhjustatud madalast mRNA tasemest.

Kahe lutsiferaasi reportersüsteem ekspresseerub sarnaselt *GCN4*-le, kuna *Firefly* lutsiferaasi ekspressioon on reguleeritud *GCN4* 5' liiderjärjestuse ning promootori poolt. Kontrollimaks, kas tüvedes *ΔeL24*, *ΔeL24+eL24*, *ΔeL24ΔeB14*, ning *Δgcn2* on *GCN4* mRNA tasemed sarnased metsiktüübi mRNA tasemega, viidi läbi qRT-PCR analüüs nagu eelnevalt

kirjeldatud. *GCN4* mRNA taseme mõõtmiseks kasutati praimereid *GCN4_forw* ning *GCN4_rev*. Tulemused esitati normaliseerituna metsiktüübi suhtes (joonis 23).



Joonis 23. *GCN4* mRNA taseme analüüs qRT-PCR meetodil. Tulemused on normaliseeritud metsiktüübi suhtes. Sinised tulbad tähistavad mRNA tasemeid enne aminohapetenälja indutseerimist 3AT lisamisega, oranžid tulbad tähistavad mRNA tasemeid pärast aminohapetenälja indutseerimist 3AT lisamisega.

qRT-PCR analüüsi tulemusel leiti, et metsiktüübis tõuseb *GCN4* mRNA tase histidiinälja indutseerimisel 1,6 korda (joonis 23). Lisaks leiti, et tüves *Δgcn2* on *GCN4* mRNA tase eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes sarnane metsiktüübiga (joonis 23). Histidiinälja indutseerimisel langeb *GCN4* mRNA tase tüves *Δgcn2* 4 korda (joonis 23).

Tüves *ΔeL24* on *GCN4* mRNA tase eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes kõrgem kui metsiktüübis. Aminohapete nälja indutseerimise korral *GCN4* mRNA tase erinevalt metsiktüübist märgatavalt *ΔeL24* tüves ei tõuse. Tüves *ΔeL24+eL24* on *GCN4* mRNA tase enne ning pärast 3AT lisamist võrreldes metsiktüübiga 15% madalam (joonis 23). Antud tulemusest võib järeldada, et tüves *ΔeL24+eL24* toimub *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon sarnaselt metsiktüübiga.

Tüves *ΔeL24ΔeB14* tõuseb on *GCN4* transkriptsioonitase histidiinälja indutseerimisel tase 2,7 korda (joonis 23). Antud tulemustest võib järeldada, et tüve *ΔeL24ΔeB14* 3AT-tundlikkus ei ole põhjustatud madalast *GCN4* mRNA tasemest histidiinälja korral.

Reporteri FLuc ning *GCN4* transkriptsioonitaseme võrdlemisel võib järeldada, et FLuc ning *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon histidiininälja korral on sarnane metsiktüübis, *Δgcn2*, *ΔeL24* ning *ΔeL24ΔeB14* tüvedes. Tüves *ΔeL24+eL24* on FLuc ja *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon histidiininälja korral erinev: *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon on sarnane metsiktüübile, reporteri regulatsioon *ΔeL24*-le (joonis 22; joonis 23).

2.4 Arutelu

Antud töö on üheks osaks suuremast projektist, mille eesmärgiks on selgitada ribosoomi eukarüoosdispetsiifiliste subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ning eB14 tähtsust ribosoomi funktsioneerimisel ning ribosoomi sildade kooperatiivsust. Käesoleva töö käigus uuriti subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ning eB14 olulisust aminohapete näljaga toimetulekul ning funktsiooni reinitsiatsioonil uORFe sisaldaval mRNA-l.

Reinitsiatsiooni uurimiseks uORFe sisaldavalt mRNA-lt on kasutusel kaks erinevat reportersüsteemi: *GCN4-lacZ* ning *GCN4-FLuc*. *GCN4-lacZ* reporter koosneb *GAL1,10* promootorist, *GCN4* 5' liiderjärjestusest ning *LacZ* geenist. Erinevalt *GCN4-FLuc* reportersüsteemist ei sõltu *GCN4-lacZ* reportersüsteemi transkriptsioonitase rakkudes aminohapete näljast, kuna *GCN4-lacZ* transkriptsioon sõltub galaktoosi olemasolust. Seetõttu on *GCN4-lacZ* reporteri mRNA tase rakkudes pidevalt kõrge. *GCN4-lacZ* reportersüsteemi normaliseerimiseks kasutatakse totaalse valgu mõõtmist rakulüsaadist. Seetõttu on antud meetod ajakulukam. Lisaks on β -galaktosidaasi pooleluiga kõrgem kui lutsiferaasi pooleluiga, mistõttu on raskem uurida induktsioonist põhjustatud reporteri aktiivsuse tõusu (McNabb *et al.*, 2005).

Antud töös kasutatud *GCN4-FLuc* reporter koosneb konstitutiivselt ekspresseeritavast *Renilla* lutsiferaasist ning *GCN4* promootori ning 5' liiderjärjestuse järel asuvast *Firefly* lutsiferaasist. *GCN4-FLuc* reportersüsteemi FLuc mRNA taseme kontroll toimib sarnaselt genoomis oleva *GCN4* transkriptsiooniga, kuna FLuc transkriptsioon on reguleeritud *GCN4* promootori poolt. Lutsiferaasidel põhinev reportersüsteemi analüüs kiirem, kuna koheselt on võimalik mõõta mõlema lutsiferaasi aktiivsusi. Lisaks on *GCN4-FLuc* reportersüsteemi abil võimalik täpsemalt uurida induktsioonist põhjustatud geeniregulatsiooni (McNabb *et al.*, 2005). Lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi abil on võimalik uurida *GCN4* ekspressioonitaset, kuna FLuc ekspresseerub sarnaselt *GCN4*-le.

Uurimistöö esimeses etapis konstrueeriti *Agcn2* tüvi. Varasemalt on teada, et *Agcn2* tüvi on tundlik aminohapete näljale, kuna antud tüves ei ekspresseerita *GCN4* (Hinnebusch ja Natarajan, 2002). Konstrueeritud *Agcn2* tüve histidiininälja tundlikkuse analüüsimiseks indutseeriti histidiininälg 3AT-ga, mis on imidasoolglütseroolfosfaadi dehüdrataasi (His3) antimetaboliit. Aminohapete nälja tundlikkuse analüüsimisel leiti, et *Agcn2* on tundlik histidiininäljale. Metsiktüüpi rakud ei olnud histidiininäljale tundlikud kuna moodustasid 3AT-d sisaldaval söötmel kolooniaid sarnaselt SC-HIS söötmele (joonis 14). Seega

korreleerusid histidiininalja tundlikkuse analüüsil saadud tulemused varem kirjeldatud metsiktüübi ja *ΔgcN2* fenotüübiga (Hinnebusch ja Natarajan, 2002).

Tilk-külv analüüsi tulemuste kinnitamiseks kasutati antud töös lutsiferaasidel põhinevat reportersüsteemi. Lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi abil leiti, et histidiininalja indutseerimisel 3AT lisamisega ei tõuse *ΔgcN2* tüves reporteri ekspressioon (joonis 19). Antud tulemus korreleerub histidiininalja tundlikkuse analüüsi ning kirjanduses toodud tulemustega (Yang *et al.*, 2000; Rolfes ja Hinnebusch, 1993). Selgitamaks, kas tüve *ΔgcN2* reporteri madal ekspressioon on põhjustatud madalast mRNA tasemest, viidi läbi qRT-PCR analüüs. qRT-PCRi tulemusel leiti, et nii reporteri kui genoomse *GCN4* mRNA tase tüves *ΔgcN2* on madalam kui metsiktüübis. Varasemalt on näidatud, et histidiininalja indutseerimisel tõuseb tüves *ΔgcN2* *GNC4* transkriptsioonitase (Hinnebusch, 1985). *Candida albicansis* näidati, et histidiininalja indutseerimisel tõuseb *GCN4* transkriptsioonitase tüves *ΔgcN2* kuni 15 korda. Samas on näidatud, et *C. albicansis* on *GCN4* ekspressiooni regulatsioonil oluliselt suurem roll mRNA taseme regulatsioonil (Sundaram ja Grant, 2014). Seega on antud töö tulemused vastuolus varem avaldatud tulemustega.

Metsiktüübi rakkudes tõusis reporteri aktiivsus histidiininalja indutseerimisel keskmiselt 3 korda. Varasemates töödes on *GCN4* ekspressioonitaseme määramiseks kasutatud *GCN4-lacZ* reporterit. *GCN4-lacZ* reporterit kasutades on 3AT lisamiselt reporteri aktiivsus tõusnud 14 korda (Rolfes ja Hinnebusch, 1993). Kuigi kahe lutsiferaasi reportersüsteem on *GCN4-lacZ* reportersüsteemist tundlikum, on antud töös reporteri aktiivsus metsiktüübis 4,7 korda madalam kui *GCN4-lacZ* reporteri aktiivsus. Antud erinevus võib tuleneda promootorite erinevusest: *GCN4-lacZ* reportersüsteemi mRNA transkriptsioon on reguleeritud *GAL1,10* promootori poolt, lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemi mRNA transkriptsioon on reguleeritud *GCN4* promootori poolt (Mueller ja Hinnebusch, 1986; Steffen *et al.*, 2008).

Selgitamaks, kas metsiktüübi rakkude reporteri madal aktiivsus võrreldes varasemate tulemustega on põhjustatud madalamast mRNA tasemest, viidi läbi qRT-PCRi analüüs. qRT-PCRi tulemusel leiti, et reportersüsteemi mRNA tase tõuseb metsiktüübis histidiininalja korral 1,2 korda ning *GCN4* mRNA tase 1,6 korda. Histidiininalja indutseerimisel ei tõuse reporteri transkriptsioon sarnaselt *GCN4* transkriptsioonile, kuna reporterplasmiid on kõrge koopiaarvuga plasmiid. Albrecht *et al.* leidsid, et plasmiidilt ekspresseeruva *GCN4* mRNA tase tõuseb metsiktüübis histidiini nälja indutseerimisel 6 tunni jooksul 2 korda. Lisaks leiti, et *GCN4-lacZ* mRNA tase tõusis histidiininalja korral 6 tunni jooksul 10 korda (Albrecht *et*

al., 1998). Natarajan *et al.* näitasid, et histidiininalja indutseerimisel 1 tunni jooksul *GCN4* transkriptsioonitase ei tõuse, histidiininalja indutseerimisel 2 tunni jooksul tõuseb aga *GCN4* mRNA tase 2 korda. Seega korreleeruvad antud töö tulemused osaliselt varem avaldatud tulemustega, kuna *GCN4* ja reporteri transkriptsiooni taseme tõus histidiininalja korral on võrreldes varem avaldatud tulemustega madalam.

Valk eL24, mis osaleb eB13 ning B6 sildade moodustumises, et ole eluks hädavajalik valk (Ben-Shem *et al.*, 2011; Steffen *et al.*, 2012). Seetõttu on võimalik uurida *ΔeL24* mutandi 3AT-tundlikkust. 3AT-tundlikkuse analüüsimisel leiti, et tüvi *ΔeL24* on aminohapete näljale tundlik (joonis 16). Lisaks on nälja indutseerimisel 3AT-ga *ΔeL24* reporteri aktiivsus sarnane metsiktüübiga (joonis 20). Valgu eL24 N-terminaalne domeen moodustab kaks kontakti ka konserveerunud subühikutevahelises sillas B6 (Ben-Shem *et al.*, 2011). Seega võib *ΔeL24* histidiininalja tundlikkus olla põhjustatud ka silla B6 puudumisest. Antud tulemuste põhjal võib järeldada, et histidiini näljaga toimetulekuks on vajalik eL24 N-terminaalne domeen ning tüve *ΔeL24* histidiininalja tundlikkus ei ole põhjustatud vähenenud *GCN4* ekspressioonist. mRNA tasemete põhjal võib järeldada, et tüves *ΔeL24* toimub *GCN4* ekspressiooni regulatsioon translatsiooni tasemel: reporteri aktiivsus histidiininalja korral oli sarnane metsiktüübile kuigi mRNA tase tüves *ΔeL24* on madalam kui metsiktüübis.

Histidiininalja tundlikkuse analüüsil leiti, et tüvi *ΔeL24*+eL24 moodustab 3AT-d sisaldaval söötmel kolooniaid sarnaselt metsiktüübiga (joonis 15). Reporteri aktiivsuse analüüsimisel leiti, et histidiininalja korral on reporteri aktiivsus *ΔeL24*+eL24 tüves kõrgem kui metsiktüübis (joonis 20). mRNA tasemete uurimisel leiti, et tüves *ΔeL24*+eL24 toimub *GCN4* mRNA taseme regulatsioon sarnaselt metsiktüübile (joonis 23), kuid reporteri mRNA tase histidiininalja korral ei tõuse (joonis 22). Käesolevate tulemuste põhjal võib järeldada, et tüves *ΔeL24*+eL24 on *GCN4* ekspressioon kõrgem kui metsiktüüpi rakkudes. Lisaks toimub histidiininalja korral *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon sarnaselt metsiktüübiga, kuid *GCN4* ja *FLuc* transkriptsiooni regulatsioon on erinev.

Ribosoomi suure subühiku valgu eL24 funktsiooni on uuritud ka harilikus müürloogas: eL24 ning eIF3h mutantide uurimisel leiti, et eL24 on oluline reinitiatsioonil uORFe sisaldavatel mRNAdel. Valgu eL24 mutandis on valguekspressioon uORFe sisaldavalt mRNAlt oluliselt madalam kui funktsionaalse eL24-ga rakkudes (Zhou *et al.* 2010). Lisaks on leitud, et eL24 mutantides on repressseeritud auksiini signalisatsioon (Nishimura *et al.*, 2005). Auksiini

signalisatsioon on eL24 mutandis repressseeritud, kuna paljude auksiini signalisatsiooniga seotud geenide ekspressioon on reguleeritud uORFide poolt (Zhou *et al.*, 2010).

Seetõttu püstitati hüpotees, et eL24 on ka pagaripärmis vajalik reinitsiatsioonil. Valgu eL24 mutantides *ΔeB13* ja *ΔeL24+eL24* on eL24 N-terminaalne domeen või metsiktüüpi eL24 valk ekspresseeritud madala koopiaarvuga plasmiidilt. Kuna tüvedes *ΔeB13* ning *ΔeL24+eL24* on reporteri ekspressioon pärast 3AT lisamist kõrgem kui metsiktüübis, võib oletada, et eL24 N-terminaalse domeeni nõrk üleekspressioon põhjustab paranenud reinitsiatsioonivõimet, mille tõttu tõuseb reporteri aktiivsus. Antud hüpoteesi kinnitab ka mRNA tasemete analüüs: tüves *ΔeL24+eL24* on reporteri mRNA tase histidiininalja korral madalam kui metsiktüübis (joonis 22), kuid reporteri aktiivsus on võrreldes metsiktüübiga oluliselt kõrgem (joonis 20). Seega reguleeritakse reporteri ekspressiooni translatsiooni tasemel.

Antud töö eesmärgiks oli uurida ribosoomi subühikutevaheliste sildade kooperatiivsust. Histidiininalja tundlikkuse analüüsil leiti, et tüvi *ΔeL24ΔeB14* on histidiininaljale tundlik (joonis 18). Antud tulemus on korrellatsioonis *ΔeL24* kasvufenotüübiga (joonis 16). Reporteri aktiivsus tüves *ΔeL24ΔeB14* on nii enne kui pärast histidiininalja indutseerimist madalam kui metsiktüübis (joonis 21). Kuna reporteri aktiivsus oli võrreldes metsiktüübiga madalam, uuriti, kas madal reporteri aktiivsus on tingitud madalast *FLuc* transkriptsioonitasemest. mRNAde taseme analüüsil leiti, et tüves *ΔeL24ΔeB14* toimub *FLuc* transkriptsiooni regulatsioon sarnaselt metsiktüübile (joonis 22). Saadud tulemuse põhjal võib järeldada, et histidiininaljaga toimetulekuks on vajalik eL24 N-terminaalne domeen ning reporteri madal ekspressioon histidiininalja korral ei ole põhjustatud madalast *FLuc* mRNA tasemest. Histidiininalja tundlikkus tüves *ΔeL24ΔeB14* võib olla põhjustatud ka 3 ribosoomi subühikutevahelise silla puudumisest: tüves *ΔeL24ΔeB14* puuduvad ribosoomi subühikutevahelised sillad eB13, eB14 ning B6.

Reporteri aktiivsus tüvedes *ΔeB14* ning *ΔeB13ΔeB14* on pärast histidiininalja indutseerimist 3AT-ga sarnane metsiktüübile (joonis 21). Antud tulemustest võib järeldada, et *GCN4* ekspressioonitase tüvedes *ΔeB14* ning *ΔeB13ΔeB14* on sarnane metsiktüübile. (joonis 21) ning silla eB14 puudumine vähendab tüves *ΔeB13ΔeB14* üleekspressseeritud eL24 N-terminaalse domeeni efekti *GCN4* ekspressioonile.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti ribosoomi eukarüoodispetsiifiliste subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 olulisust histidiininaljaga toimetulekul ning reinitsiatsioonil uORFe sisaldavalt mRNAlt. Lisaks analüüsiti ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 kooperatiivsust aminohapete näljaga toime tulekul ning reinitsiatsioonil uORFe sisaldavalt mRNAlt. Histidiininalja indutseerimiseks kasutati 3AT-d, mis on imidasoolglütseroolfosfaadi dehüdrataasi inhibiitor, reinitsiatsiooni analüüsimiseks kasutati *Renilla* ja *Firefly* lutsiferaasidel põhinevat reportersüsteemi.

Töö esimeses osas konstrueeriti kontrolltüvi *Agcn2*. *Agcn2* tüve kontrollimisel tilk-külvi meetodil ning lutsiferaasidel põhineva reportersüsteemiga leiti, et *Agcn2* tüvi on tundlik histidiininaljale ning reporteri aktiivsus tüves *Agcn2* on madal. Saadud tulemused olid korrellatsioonis varasemate tulemustega. Lisaks analüüsiti eukarüoodispetsiifiliste ribosoomisildade eB12, eB13 ning eB14 olulisust histidiininaljaga toimetulekul tilk-külvi meetodil. Tilk-külvi meetodi tulemusel leiti, et ribosoomisillad eB12, eB13 ning eB14 ei mõjuta aminohapete näljaga toimetulekut. Lutsiferaaside reportersüsteemiga leiti, et tüves *ΔeB13* on reporteri aktiivsus kõrgem kui metsiktüübis ning tüves *ΔeB14* on reporteri aktiivsus sarnane metsiktüübile. Antud tulemustest järeldati, et *GCN4* ekspressioonitase on tüves *ΔeB13* kõrgem kui metsiktüübis.

Lisaks leiti, et tüved, kus on puudu ribosoomi sillad eB12 ja eB14 või sillad eB13 ja eB14, ei ole tundlikud aminohapete näljale. Antud tulemuste põhjal järeldati, et ribosoomi subühikutevahelised sillad eB12 ja eB13 või eB13 ja eB14 ei oma kooperatiivset efekti histidiininaljaga toimetulekule. Reportersüsteemi katse abil leiti, et tüves *ΔeB13ΔeB14* on reporteri aktiivsus sarnane metsiktüübile. Antud tulemuste põhjal järeldati, et tüves *ΔeB13ΔeB14* on *GCN4* ekspressioon histidiininalja korral sarnane metsiktüübiga.

Ribosoomi subühikutevahelise silla eB13 põhikontaktid moodustab valk eL24. Valk eL24 ei ole eluks hädavajalik valk, seetõttu oli võimalik uurida eL24 mõju histidiininaljaga toimetulekule. eL24 mõju histidiininaljaga toimetulekule uuriti tilk-külvi meetodil, mille tulemusel leiti, et tüved *ΔeL24* ning *ΔeL24ΔeB14* on tundlikud histidiininaljale. Lutsiferaasi reportersüsteemiga leiti, et tüves *ΔeL24* on reporteri aktiivsus sarnane metsiktüübiga, tüves *ΔeL24ΔeB14* on reporteri aktiivsus madalam kui metsiktüübis. Antud tulemuste põhjal

järeldati et tüve *ΔeL24ΔeB14* 3AT-tundlikkus on põhjustatud *GCN4* madalamast ekspressioonitasemest.

Käesolevate tulemuste kontrollimiseks mõõdeti tüvedes *Δgcn2*, *ΔeL24*, *ΔeL24+eL24* ning *ΔeL24ΔeB14* reporteri *FLuc* ning *GCN4* transkriptsioonitaset. mRNA tasemete analüüsimisel leiti, et tüvedes *ΔeL24+eL24* ning *ΔeL24ΔeB14* toimub *GCN4* transkriptsiooni regulatsioon sarnaselt metsiktüübile. Reporteri transkriptsiooni regulatsioon erineb tüvedes *ΔeL24+eL24* ning *ΔeL24ΔeB14*: tüves *ΔeL24+eL24* reporteri transkriptsioon histidiinälja korral ei tõuse, tüves *ΔeL24ΔeB14* toimub transkriptsiooni regulatsioon sarnaselt metsiktüübile. Tüves *Δgcn2* on nii reporteri kui *GCN4* transkriptsioon võrreldes metsiktüübiga madalam. Tüves *ΔeL24* ei mõjuta aminohapete nälg reporteri ja *GCN4* transkriptsioonitaset.

SUMMARY

The role of *Saccharomyces cerevisiae* intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 during the amino acid starvation

Kristiina Raja

The ribosome is a large complex which consists of rRNA and r-proteins and conducts protein translation. Ribosome consists of two subunits: small 40S subunit and large 60S subunit. It has been shown that ribosome functionality depends on ribosome subunit rotation. Ribosome intersubunit bridges play an important role in the regulation of subunit rotation. Ribosome intersubunit bridges are divided into 3 groups by the interaction type: rRNA-rRNA, rRNA-protein and protein-protein bridges. rRNA-rRNA intersubunit bridges are mostly conserved among all life domains. Eukaryote specific intersubunit bridges are mostly rRNA-protein or protein-protein bridges. Conserved intersubunit bridges locate in the conserved core structure of the ribosome. Compared to conserved intersubunit bridges eukaryote specific intersubunit bridges are located in the periphery of the ribosome.

This thesis is a smaller part of a bigger project that studies the function of intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14. The main connections of intersubunit bridge eB12 are formed by eukaryote specific protein eL19. eL19 is coded by two paralogous genes *RPL19A* and *RPL19*. eL19 is an essential protein: deletion of both eL19 coding genes is lethal. The main connections of intersubunit bridge eB13 are formed by eukaryote specific protein eL24. eL24 is a nonessential protein: *ΔeL24* mutant is viable. The main connections of intersubunit bridge eB14 are formed by eukaryote specific protein eL41. eL41 is a nonessential protein: deletion of both eL41 coding genes is nonlethal. The intersubunit bridge eB14 is the only eukaryote specific bridge that is located in the conserved core structure.

The literature review of the thesis gives an overview about the structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* ribosome, eB12, eB13 and eB14 intersubunit bridges. In addition, the literature review gives an overview about translation initiation and its regulation through mRNAs that contain uORFs in the 5' leader sequence.

During this study, a control strain *Δgcn2* was constructed and its phenotype in histidine starvation conditions was analysed. In addition, a dual luciferase reporter system was used to

assess the activity of reporter. It was shown that *Δgcn2* strain is sensitive to histidine starvation conditions and the reporter activity in the strain is low. The phenotype and reporter activity of the newly constructed *Δgcn2* strain correlated with the results described previously in the literature.

The wildtype strain's phenotype and reporter activity was assessed as well. It was shown that wildtype strain is not sensitive to histidine starvation conditions and the reporter activity rose 3-fold after histidine starvation. The results showed that the phenotype and reporter activity correlated with the previous results described in the literature.

The first aim of this thesis was to study the function of eukaryote specific intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 during amino acid starvation conditions. It was discovered that intersubunit bridges eB12, eB13 and eB14 are not essential for coping with amino acid starvation conditions.

The protein eL24 which forms the connections in the intersubunit bridge eB13 is a nonessential protein. The function of eL24 during amino acid starvation was studied by spot-test analysis. It was discovered, that eL24 is essential for coping with amino acid starvation conditions. In addition, the expression of reporter was analysed. It was discovered that the reporter activity is similar to the reporter activation in wildtype. Although the expression of the reporter activity is similar to the wildtype, transcriptional levels of *GCN4* and the reporter were assessed. It was shown that the reporter and *GCN4* transcription regulations are similar in *ΔeL24* strain.

The second aim of this thesis was to study the cooperation of intersubunit bridges eB12 and eB14 or eB13 and eB14 during amino acid starvation. Firstly, the intersubunit bridge mutants were analysed by spot-test method. Secondly, the mutants were analysed with luciferase reporter system. It was discovered that intersubunit bridge mutants *ΔeB12ΔeB13* and *ΔeB13ΔeB14* do not demonstrate any sensitivity to 3AT. Because eL24 is a nonessential protein, the phenotype of *ΔeL24ΔeB14* was studied by spot-test analysis. The reporter activation was analysed and it was discovered that *ΔeL24ΔeB14* mutant is sensitive to amino acid starvation conditions. In addition, the reporter activation in *ΔeL24ΔeB14* mutant was lower than in wildtype strains. After the assessment of reporter and *GCN4* mRNA levels it was concluded that the transcriptional regulation of both mRNAs is similar to the regulation of wildtype and the lower activity of reporter is caused by decreased *GCN4* expression.

TÄNUSÕNAD

Minu suured tänusõnad lähevad juhendajale Tiina Tammele, ilma tema abita ei oleks antud töö valmimine võimalik olnud. Lisaks soovin tänada molekulaarbioloogia ning üldise- ja mikroobibiokeemia õppetooli töötajaid ning tudengeid meeldejäävate magistriaastate eest.

Kõige suuremad tänusõnad lähevad aga minu elukaaslasele, kes hoidis mind kogu magistritöö kirjutamise ajal täie mõistuse juures.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Aitken, C. E. and Lorsch, J. R. (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 19(6):568-576.
2. Albrecht, G., Mösch, H., Hoffmann, B., Reusser, U., and Braus, G. H. (1998) Monitoring the Gcn4 Protein-mediated Response in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 12696-12702.
3. Arribere, J. A., and Gilbert, W. V. (2013) Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res* 23: 977–987.
4. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H. D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L. J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M. T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A. J., Williamson, J. R., Wilson, D., Yonath, A., and Yusupov, M. (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 24: 165-169.
5. Barkić, M., Crnomarković, S., Grabusić, K., Bogetić, I., Panić, L., Tamarut, S., Cokarić, M., Jerić, I., Vidak, S., and Volarević, S. (2009) The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24- deficient mice and promotes their survival. *Mol Cell Biol*. 29: 2489-2504.
6. Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. 334:1524-1529.
7. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science*. 330:1203-1209.
8. Clemons, W. M. Jr, May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S. and Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*. 400:833-840.

9. Dever, T. E. and Green, R. (2012) The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a013706.
10. Dever, T. E., Kinzy, T. G., and Pavitt, G. D. (2016) Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 203(1):65-107.
11. Dresios, J., Derkatch, I. L., Liebman, S. W., and Synetos, D. (2000) Yeast Ribosomal Protein L24 Affects the Kinetics of Protein Synthesis and Ribosomal Protein L39 Improves Translational Accuracy, While Mutants Lacking Both Remain Viable. *Biochemistry.* 39: 7236-7244.
12. Dresios, J., Panopoulos, P., Suzuki, K., and Synetos, D. (2002) A Dispensable Yeast Ribosomal Protein Optimizes Peptidyltransferase Activity and Affects Translocation. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(5):3314-3322.
13. Dresios, J., Panopoulos, P. and Synetos, D. (2006) Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Molecular Microbiology.* 59(6): 1651-1663.
14. Driscoll-Penn, M., Thireos, G., Greer, H.. (1984) Temporal analysis of general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: role of positive regulatory genes in initiation and maintenance of mRNA derepression. *Mol. Cell. Biol.* 4: 520–28.
15. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S. *et al.* (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418:387–391.
16. Grant, C. M., Miller, P. F., Hinnebusch, A. G. (1994) Requirements for intercistronic distance and level of eukaryotic initiation factor 2 activity in reinitiation on GCN4 mRNA vary with the downstream cistron. *Mol Cell Biol.* 14(4):2616-2628.
17. Hinnebusch, A. G. (1984) Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6442–46.

18. Hinnebusch, A. G. (1985) A hierarchy of trans-acting factors modulate translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2349–60.
19. Hinnebusch, A. G. (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* 59:407-450.
20. Hinnebusch, A. G., and Lorsch, J. R. (2012) The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
21. Hinnebusch, A. G., and Natarajan, K. (2002) Gcn4p, a Master Regulator of Gene Expression, Is Controlled at Multiple Levels by Diverse Signals of Starvation and Stress. *Eukaryotic Cell.* 1(1):22-32.
22. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews.* 10:113-127.
23. Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., Ramakrishnan, V. (2010) Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release. *Proc Natl Acad Sci.* 107: 8593–8598.
24. Johnstone, T. G., Bazzini, A. A., Giraldez, A. J. (2016) Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* 35: 706–723.
25. Kisly, I., Gulay, S. P., Mäeorg, U., Dinman, J. D., Remme, J., and Tamm, T. (2016) The Functional Role of eL19 and eB12 Intersubunit Bridge in the Eukaryotic Ribosome. *Journal of Molecular Biology.* 428(10): 2203-2216.
26. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science.* 334:941-949.

27. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999) Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. *Yeast*. 15: 963-972.
28. Kozak, M. (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47: 1–45.
29. Lee, B., Udagawa, T., Singh, C. R., and Asano, K. (2007) Yeast phenotypic assays on translational control. *Methods in Enzymology*. 429: 107-137.
30. Lu, P. D., Harding, H. P., Ron, D. (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 167:27–33.
31. Lööke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011) Extraction of Genomic DNA From Yeasts for PCR-based Applications. *Biotechniques*. 50(5): 325–328.
32. Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M. P., and Grant, C. M. (2008) Gcn4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 19: 2995-3007.
33. McCarthy, J. E. G. (1998). Posttranscriptional Control of Gene Expression in Yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4): 1492-1553.
34. McGeachy, A. M., and Ingolia, N. T. (2016) Starting too soon: upstream reading frames repress downstream translation. *The EMBO Journal*. 35(7):699-700.
35. McNabb, D. S., Reed, R., and Marciniak, R. A. (2005) Dual Luciferase Assay System for Rapid Assessment of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 4(9): 1539-1549.
36. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Lasse Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 19(6): 560-567.

37. Mueller, P. P., and Hinnebusch, A. G. (1986) Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell*. 45(2): 201-207.
38. Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., and Marton, M. J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol*. 21(13):4347-4368.
39. Niederberger, P., Miozzari, G., Huetter, R. (1981) Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 1: 584–93.
40. Nishimura, T., Wada, T., Yamamoto, K. T., and Okada, K. (2005) The Arabidopsis STV1 Protein, Responsible for Translation Reinitiation, Is Required for Auxin-Mediated Gynoecium Patterning. *Plant Cell*. 17(11): 2940-2953.
41. Pestova, T. V., Lorsch, J. R. and Hellen, C. U. T. (2007) Translational Control in Biology and Medicine (eds. Mathews, M. B., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. B.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. 87–128.
42. Pöll, G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford Jr, J. L., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2009) rRNA Maturation in Yeast Cells Depleted of Large Ribosomal Subunit Proteins. *PLoS ONE*. 4(12):1-13.
43. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*. 331. 730-736.
44. Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108: 557-572.
45. Ramirez, M., Wek, R. C., Vazquez de Aldana, C. R., Jackson, B. M., Freeman, B., and Hinnebusch, A. G. (1992) Mutations activating the yeast eIF-2 α kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell. Biol*. 12: 5801-5815.

46. Rolfes, R. J., and Hinnebusch, A. G. (1993) Translation of the Yeast Transcriptional Activator GCN4 Is Stimulated by Purine Limitation: Implications for Activation of the Protein Kinase GCN2. *Molecular and Cellular Biology*. 13(8): 5099-5111.
47. Schlutzen, F, Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J. Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000) Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell*. 102: 615-623.
48. Schmeing, T. M. and Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461: 1234-1242.
49. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*. 3(6): 1101-1108.
50. Song, J. M., Cheung, E., and Rabinowitz, J. C. (2006) Organization and characterization of the two yeast ribosomal protein YL19 genes, *Curr. Genet*. 30:273–278.
51. Spahn, M. T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001) Structure of the 80S Ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-Ribosome and Subunit-Subunit Interactions. *Cell*. 107(3):373-386.
52. Steffen, K. K., MacKay, V. L., Kerr, E. O., Tsuchiya, M., Hu, D., Fox, L. A., Dang, N., Johnston, E. D., Oakes, J. A., Tchao, B. A., Pak, D. N., Fields, S., Kennedy, B. K., and Kaeberlein, M. (2008) Yeast lifespan extension by depletion of 60S ribosomal subunits is mediated by Gcn4. *Cell* 133(2): 292-302.
53. Steffen, K. K., McCormick, M. A., Pham, K. M., MacKay, V. L., Delaney, J. R., Murakami, C. J., Kaeberlein, M., and Kennedy, B. K. (2012) Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191:107–118.
54. Sundaram, A., and Grant, C. M. (2014) A single inhibitory upstream open reading frame (uORF) is sufficient to regulate *Candida albicans* GCN4 translation in response to amino acid starvation conditions. *RNA* 20:559-567.

55. Zhou, F., Roy, B., and von Arnim, A. G. (2010) Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biology*. 10(193):1-11.
56. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P. and Noller, H. F. (2013) Crystal Structures of EF-G–Ribosome Complexes Trapped in Intermediate States of Translocation. *Science*. 340(6140): 1236086.
57. Tournu, H., Tripathi, G., Bertram, G., Macaskill, S., Mavor, A., Walker, L., Odds, F. C., Gow, N. A. R., and Brown, A. J. P. (2005) Global Role of the Protein Kinase Gcn2 in the Human Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 4(10): 1687-1696.
58. Tzamarias, D., Roussou, I., Thireos, G. (1989) Coupling of GCN4 mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation. *Cell* 57: 947–54.
59. Vattem, K. M., and Wek, R. C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *PNAS* 101(31): 11269-11274.
60. Wilson-Edell, K. A., Kehasse, A., Scott, G. K., Yau, C., Rothschild, D. E., Birgit Schilling, B., Gabriel, B. S., Yevtushenko, M. A., Hanson, I. M., Held, J. M., Gibson, B. W., and Benz, C. C. (2014) RPL24: a potential therapeutic target whose depletion or acetylation inhibits polysome assembly and cancer cell growth. *Oncotarget*. 5(13): 5165-5176.
61. Wilson. D. N. and Doudna Cate, J. H. (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1-13.
62. Yang, R., Wek, S. A., Wek, R. C. (2000) Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol*. 20:2706–2717.
63. You, T., Stansfield, I., Romano, M. C., Brown, A. J. P., and Coghill, G. M. (2011) Analysing GCN4 translational control in yeast by stochastic chemical kinetics modelling and simulation. *BMC Systems Biology*. 5:131.

LISAD

LISA 1. Töös kasutatud pärmisöötmete koostised

Tadrsöötme söötme jaoks lisati vedelsöötmesse agarit 20g/l kohta.

Sööde	Söötme koostis
YPD	<i>Bacto</i> peptoon 2%, <i>Bacto</i> pärmiekstrakt 1%, glükoos 2%
SC-HIS	0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudub histidiin, 0,67% pärmis lämmastikaluste segu, 2% glükoos
SC-TRP	0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puudub trüptofaan, 0,67% pärmis lämmastikaluste segu, 2% glükoos
SC-URA-HIS	0,2% aminohapete, puriinide ja pürimidiinide segu, millest puuduvad uratsiil ja histidiin, 0,67% pärmis lämmastikaluste segu, 2% glükoos

LISA 2. Töös kasutatud praimerid

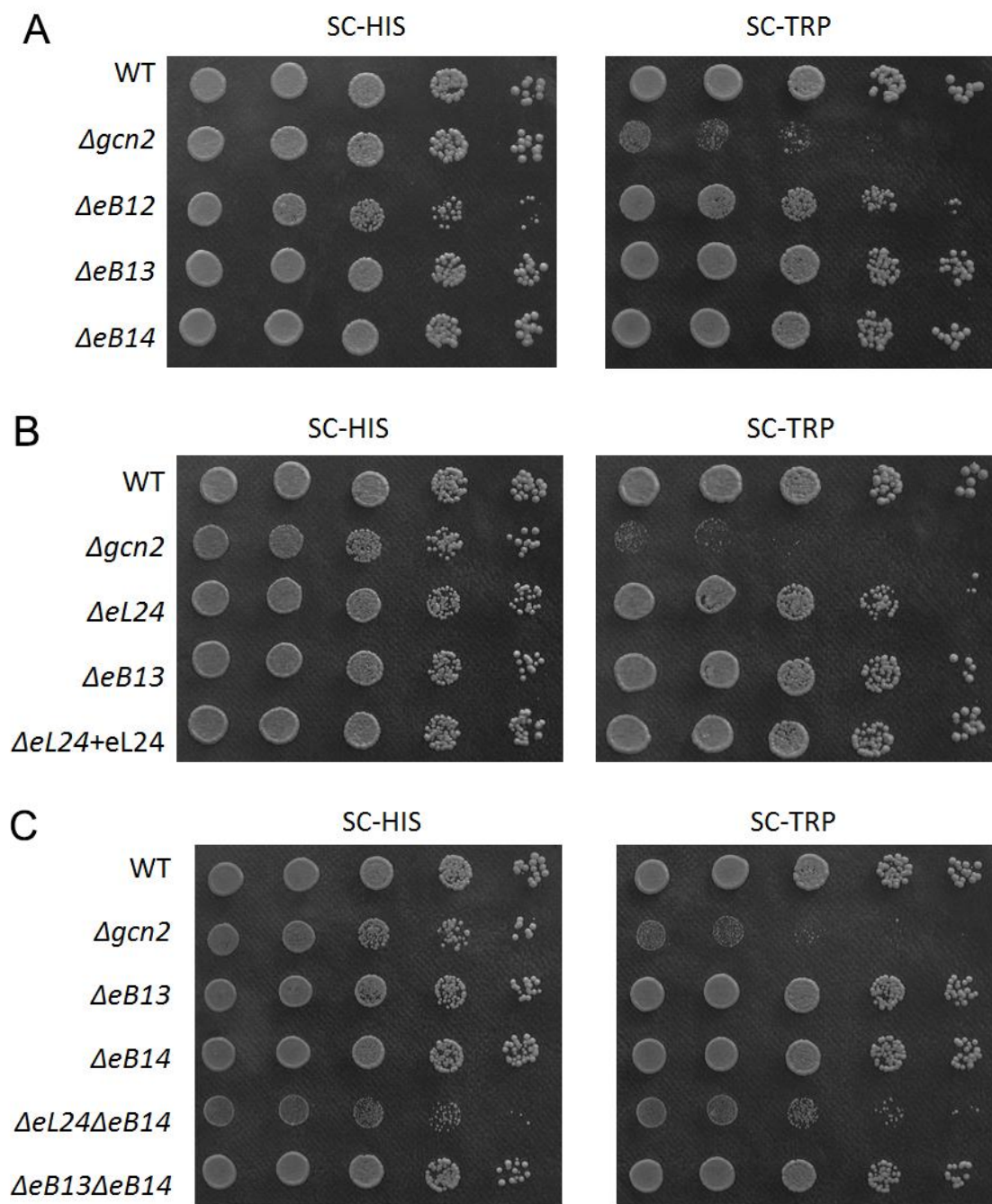
Nimi	5'-3' järjestus	Milleks kasutati
<i>GCN2_del_forw</i>	TAGGAAGCAGTTGAGTAGCTGATTT	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>GCN2_del_rev</i>	GGAATATGTATAAGAAAGGTGACCTACC	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>GCN2_check_forw</i>	CTCTATCCAGAACTCAAGATTACAGAC	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>GCN2_check_rev</i>	GCTAGTCAAACCTTCTGAATGAAAGC	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>pFA6a_check_forw</i>	CTCGACATCATCTGCCCAGATG	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>pYM_check_rev</i>	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>HIS3_forw</i>	CCACGACGCTTTGTCTTCATTCAACG	Lookuse amplifitseerimine
<i>HIS3_rev</i>	AACCATTCTCGTTGTTGTCGTTGATGC	Lookuse amplifitseerimine
<i>HIS3_check_forw</i>	CGCTGTTGGTGCCGTAGACATATTCG	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>HIS3_check_rev</i>	CTATGTGTAAGTCACCAATGCACTC	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>UBC6_forw</i>	CAGGAAAATGTAGAGACATTAGAAAAGAG	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>UBC_rev</i>	GCTTGTTTCAGCGCGTATTCTGTC	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil

<i>ARP6_forw</i>	ACTACAAAGGCAATTACCCACAGATTG	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>ARP6_rev</i>	CGGGACCATGCTCATAGTATTCTTC	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>GCN4_forw</i>	TGACGAATCGAGACTGGATCATCT	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>GCN4_rev</i>	TTTGCAACTTTCTCGCACGAGAAC	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>FLuc_forw</i>	AAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATA	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil
<i>FLuc_rev</i>	ATGTCTCCAGAATGTAGCCATCCA	mRNA taseme kontroll qPCR meetodil

LISA 3. Töös kasutatud plasmiidid

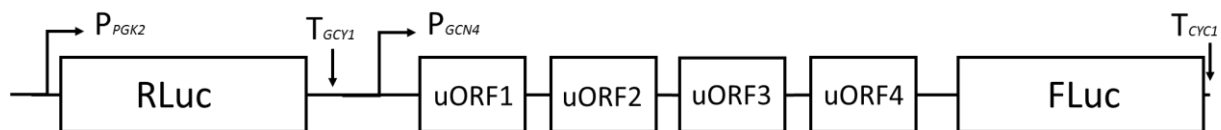
Plasmidi nimi	Milleks kasutati	Päritolu
<i>pFA6a-natMX6</i>	$\Delta gcn2$ deletsioonikasseti amplifitseerimine	Knop <i>et al.</i> 1999
<i>pRS314</i>	$\Delta eL24$ kontroll	Sikorski ja Hieter, 1989
<i>pRS314-eL24₍₁₋₆₅₎</i>	$\Delta eB13$ tüve konstrueerimine	Konstrueeritud I. Kisly poolt
<i>pRS314-eL24</i>	eB13 tüve WT kontroll	Konstrueeritud I. Kisly poolt
<i>pVW31</i>	Lutsiferaasi reporter	Steffen <i>et al.</i> 2008

LISA 4. Rakkude kasv SC-TRP selektiivsöötmetel.



Paneelil A on toodud WT, $\Delta gcn2$ ja ribosoomi sillamutantide $\Delta eB12$, $\Delta eB13$ ja $\Delta eB14$ kasv SC-HIS ja SC-TRP söötmetel. Paneelil B on toodud WT, $\Delta gcn2$ ja eL24 mutantide $\Delta eL24$, $\Delta eB13$ ja $\Delta eL24+eL24$ kasv SC-HIS ja SC-TRP söötmetel. Paneelil C on toodud WT, $\Delta gcn2$ ning ribosoomi sillamutantide $\Delta eB13$, $\Delta eB14$, $\Delta eL24\Delta eB14$ ja $\Delta eB13\Delta eB14$ kasv SC-HIS ja SC-TRP söötmetel.

LISA 5. Kahe lutsiferaasi reporteri skeem



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristiina Raja
(sünnikuupäev: 15.08.1993)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Pagaripärmi ribosoomi subühikutevaheliste sildade eB12, eB13 ja eB14 roll aminohapete
nälgjaga toimetulekul,

mille juhendaja on PhD Tiina Tamm

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 30.12.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

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

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

Tartus, 31.05.2017