

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

**Eukarüootse valgukompleksi Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 puhastamine ja aktiivsuse
kontroll *in vitro* pseudouridülatsioonil**

Bakalaurusetöö

12 EAP

Eliise Haljas

Juhendaja MSc Ermo Leuska

TARTU 2022

INFOLEHT

Eukariootse valgukompleksi Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 puhastamine ja aktiivsuse kontroll *in vitro* pseudouridülatsioonil

Käesoleva töö eesmärk oli puhastada välja pseudouridülatsiooni teostava *Saccharomyces cerevisiae*-st pärit H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud ja testida kompleksi aktiivsust *in vitro* pseudouridülatsioonil.

Kompleksi moodustamiseks optimeeriti valkude ekspressioon *E. coli* ekspressioonitorudes, puhastati valgud afiinsuskromatograafia meetoditega ning sünteesiti kompleksi kuuluv giid-RNA ja pseudouridülatsioonireaktsiooni substraat-RNA kasutades *in vitro* transkriptsiooni. Moodustatud kompleksi aktiivsust hinnati triitiumi vabanemise kaudu, kasutades triitiumiga märgitud substraat-RNA-d.

Märksõnad: RNA modifikatsioonid, pseudouridiin, H/ACA RNP, valguekspressioon, afiinsuskromatograafia

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Purification and evaluation of activity of the eukaryotic protein complex Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 by *in vitro* pseudouridylation

The aim of this thesis was to recombinantly express and purify the four proteins (originating from *Saccharomyces cerevisiae*) in *E. coli*. These proteins form the H/ACA ribonucleoprotein complex that carries out the pseudouridylation reaction. The aim was to test the activity of that complex.

In order to form the complex, the expression of the proteins of the H/ACA RNP complex in *E. coli* expression strains was optimized, the proteins were purified, and the guide-RNA and substrate-RNA were synthesized using *in vitro* transcription. The activity of the RNP complex was evaluated by the release of tritium using tritiated substrate-RNA.

Keywords: RNA modifications, pseudouridine, H/ACA RNP, protein expression, affinity chromatography

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1.1. mRNA.....	7
1.1.1. mRNA üldine iseloomustus ja ajalugu	7
1.1.2. mRNA struktuur	7
1.1.3. mRNA struktuuri ja funktsiooni seos	9
1.1.4. mRNA osalemine rakuprotsessides	10
1.1.4.1. mRNA süntees ja protsessing.....	10
1.1.4.2. mRNA osalemine translatsioonis.....	10
1.1.4.3. mRNA stabiilsus ja degradatsioon	11
1.1.5. RNA süntees <i>in vitro</i>	11
1.2. mRNA modifikatsioonid.....	12
1.2.1. Pseudouridiin	12
1.2.1.1. Pseudouridiin mRNA-s	14
1.2.1.2. Pseudouridiini teadaolev funktsioon teistes RNA-des	14
1.2.1.3. Pseudouridiin mRNA vaktsiinides	15
1.3. Valgukompleks Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 üldine iseloomustus	16
1.3.1. H/ACA RNP valgud	18
1.3.2. snoRNA	18
1.3.3. H/ACA RNP tööpõhimõte.....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärk.....	20
2.2. Materjal ja metoodika	21
2.2.1. Töös kasutatud <i>E. coli</i> tüved ja plasmiidid.....	21
2.2.2. Töös kasutatud söötmed	22
2.2.3. Töös kasutatud puhvrid, ensüümid ja reagentid	22
2.2.4. Töös kasutatud oligonukleotiidid	23
2.2.5. H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valkude puhastamine	24
2.2.5.1. <i>E. coli</i> rakkude kasvatamine ja valguekspressiooni analüüs sobivate ekspressioonitingimuste leidmiseks	24
2.2.5.2. Western Blot analüüs	26
2.2.5.3. <i>E. coli</i> rakkude kasvatamine valkude suures mahus puhastamiseks.....	27

2.2.5.4.	Cbf5, Nop10 ja Gar1 valkude puhastamine	27
2.2.5.5.	Höbenitraadiga värvimine	30
2.2.5.6.	Nhp2 valgu puhastamine	30
2.2.6.	H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi giid-RNA ja kompleksi substraat-RNA transkribeerimine.....	31
2.2.6.1.	DNA ettevalmistus RNA transkriptsiooniks	31
2.2.6.2.	RNA transkriptsioonireaktsioon.....	32
2.2.6.3.	DNaasi reaktsioon	33
2.2.6.4.	RNA transkriptsioonijärgne puhastamine	34
2.2.7.	Valgukompleksi aktiivsuse kontroll	34
2.2.7.1.	H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi moodustamine	34
2.2.7.2.	Pseudouridülatsioonireaktsioon	35
2.3.	Tulemused ja arutelu.....	36
2.3.1.	Nhp2 ja Gar1 valkude ekspressioon	36
2.3.2.	Cbf5 + Nop10 ekspressiooni optimeerimine	37
2.3.3.	H/ACA RNP kompleksi valkude puhastamine afiinsuskromatograafia meetoditega	39
2.3.4.	Pseudouridülatsiooniks vajalike RNA komponentide süntees	40
2.3.5.	H/ACA RNP kompleksi valkude aktiivsuse hindamine.....	41
KOKKUVÕTE		44
SUMMARY		45
KASUTATUD KIRJANDUS		46
LISAD		55
LIHTLITSENTS.....		60

KASUTATUD LÜHENDID

25S rRNA – eukarüootse ribosoomi suure subühiku komponent

Amp – ampitsilliin

DTT – ditiotreitool

IPTG – isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid

Km – kanamütsiin

m⁶A – N⁶-metüüladenosiin

mRNA – *messenger* RNA

MQ – ülipuhas vesi (Milli-Q)

OD₆₀₀ – spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 600 nm määratud optiline tihedus, mis kirjeldab bakterite kasvufaasi

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

RNP – ribonukleoproteiin

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SDS-PAAG – naatriumdodetsüülsulfaadi polüakrüülamiidgeel

snoRNA – väike tuumakese RNA

tRNA – *transfer* RNA

β -Me – 2-merkaptetanool

Ψ – pseudouridiin

SISSEJUHATUS

Looduses kõige levinum RNA modifikatsioon on uridiini isovorm pseudouridiin (Ψ), mis avastati 1951. aastal ja on tuntud kui nn viies nukleotiid. Pseudouridiini funktsiooni erinevates RNA molekulides on palju uuritud ning on leitud, et see mõjutab näiteks RNA stabiilsust. mRNA-s leiti pseudouridiine esmakordselt 2014. aastal, kuid selle täpne funktsioon mRNA-s on veel ebaselge.

Pseudouridiini on võimalik koht-spetsiifiliselt sünteesida kasutades ensüüme, mida nimetatakse pseudouridiini süntaasideks (PUS). PUS-id võivad olla giid-RNA-st sõltuvad või mittesõltuvad. Giid-RNA-st sõltuvalt toimub pseudouridülatsioon H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi abil, mis koosneb juhtmolekulina toimivast snoRNA-st ja neljast evolutsiooniliselt konserveerunud valgust: Cbf5, Gar1, Nhp2 ja Nop10.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade mRNA-st, selle struktuurist, funktsioonist ja modifikatsioonidest ning pseudouriidinist ja selle seni teadaolevatest funktsioonidest. Töö eksperimentaalses osas optimeeritakse H/ACA RNP kompleksi kuuluvate valkude ekspressioon *E. coli*-s ning puhastatakse rakkudest välja ribonukleoproteiin-kompleksi rekombinantsed valgud. Sünteesitakse *in vitro* transkriptsiooni kasutades giid-RNA ja substraat-RNA ning kontrollitakse kompleksi aktiivsust pseudouridülatsioonireaktsioonil triitiumi vabanemise kaudu kasutades triitiumiga märgitud substraat-RNA-d.

Töö eesmärk on testida H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi aktiivsust *in vitro* pseudouridülatsioonil. Töö kaugem eesmärk on välja puhastatud kompleksi abil sisestada pseudouridiine huvipakkuvatesse piirkondadesse, et seeläbi selgitada välja mRNA modifikatsioonide potentsiaalne roll rakus.

Märksõnad: RNA modifikatsioonid, pseudouridiin, H/ACA RNP, valguekspressioon, afiinsuskromatograafia

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. mRNA

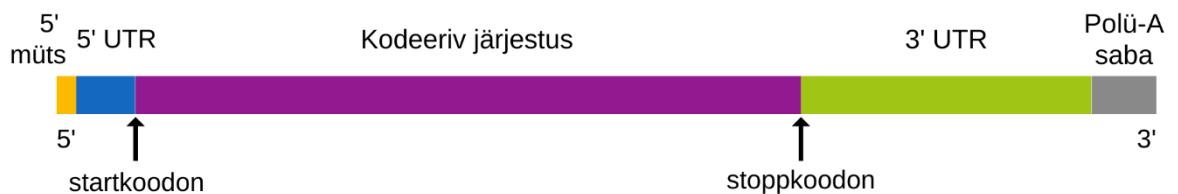
1.1.1. mRNA üldine iseloomustus ja ajalugu

Molekulaarbioloogia põhipostulaat kirjeldab, et geneetiline informatsioon elusorganismides kantakse üle nukleiinhappelt nukleiinhappele ja nukleiinhappelt valgule (Crick, 1970). *Messenger* RNA ehk informatsiooni-RNA (mRNA) on ribonukleotiidhappe jääkidest koosnev üheaahelaline polümeer, mis on komplementaarne talle vastava geenijärjestusega ning määrab sellega ära valkude aminohappelise järjestuse vastavalt geneetilisele koodile. mRNA-l on molekulaarses põhipostulaadis keskne roll: see kannab valgusünteesiks vajaliku informatsiooni DNA-lt ribosoomi.

Mõte mRNA võimalikust olemasolust tekkis esimest korda 1960. aastal Cambridge'i Ülikooli teadlaste Sydney Brenneri, François Jacobi ning California Tehnoloogiainstituudi teadlase Matthew Meselsoni poolt, kes tegid katseliselt kindlaks tollal veel tundmatu molekuli olemasolu, nimetasid selle „*messenger* RNA-ks“ ja töötasid välja esimese teoreetilise raamistiku. 1961. aastal avalikustas James Watson, et ka tema uurimisgrupp töötab sarnase katse kallal ning Watsoni palvel nõustusid Brenner ja tema kolleegid oma uurimistulemuste avalikustamisega ootama. 1961. aastal avaldasid mõlemad uurimisgrupid oma artiklid ajakirjas *Nature*. (Brenner et al., 1961; Cobb, 2015; Gros et al., 1961)

1.1.2. mRNA struktuur

mRNA struktuur koosneb kodeerivast järjestusest, mittetransleeritavatest järjestustest (*untranslated regions*, UTRs) ja eukarüootidel ka mRNA protsessingu tulemusel lisatud 5' mütsist (5' *cap*) ja 3' polü-A sabast (*poly(A) tail*) (Joonis 1) (McLaughlin et al., 1973; Ramanathan et al., 2016).



Joonis 1. Eukarüootse mRNA struktuur. Eukarüootne mRNA koosneb kodeerivast järjestusest (joonisel märgitud lillaga), mittetransleeritavatest järjestustest (5' UTR ja 3' UTR, vastavalt sinine ja roheline), 5' mütsist (kollane) ja polü-A sabast (hall). Startkoodon asub kodeeriva järjestuse alguses ja stoppkoodon selle lõpus.

Nagu ka DNA-s, sisaldub mRNA geneetiline informatsioon selle nukleotiidses järjestuses, mis kodeerivas alas on jaotatud kolme nukleotiidi kaupa koodoniteks. Kodeeriv järjestus algab startkoodoniga ja lõpeb stoppkoodoniga ning iga koodon kodeerib kindlat aminohapet, välja arvatud stoppkoodonid, mis lõpetavad valgusünteesi. Startkoodon on tavaliselt AUG, stoppkoodonid on UAG, UAA või UGA. (Křížek & Křížek, 2012)

Üheahelaline mRNA võib moodustada ka nn sisemisi aluspaare vastavalt komplementaarsusele ja selliste sekundaarstruktuuride teke võib mõjutada mRNA stabiilsust (Shabalina et al., 2006).

Kui prokarüootides on DNA-lt sünteesitud mRNA valmis otse translatsioonietappi sisenema, siis eukarüootides läbib küpse mRNA eellasmolekul – pre-mRNA – enne valgusünteesi protsessingu, mis hõlmab endas lisaks varem mainitud 5' mütsi ja 3' polü-A saba lisamisele ka splaissingut (*splicing*). Kodeerivad järjestused võivad pre-mRNA-s toimida ka regulatoorsete järjestustena, eksonis paiknevad splaissingu võimendajaid (*exonic splicing enhancer*, ESE) või eksonis paiknevad splaissingu vaigistajaid (*exonic splicing silencer*, ESS). (Black, 2003)

5' ja 3' mittetransleeritavad järjestused asuvad mRNA-s vastavalt startkoodoni ees ja stoppkoodoni järel. UTR-e ei transleerita, kuid on leitud, et need mõjutavad mRNA stabiilsust ja lokalisatsiooni ning translatsiooniefektiivsust. Nimetatud funktsioonid sõltuvad UTR-i järjestusest ja võivad mRNA-de vahel erineda. (Jia et al., 2020; Schwerk & Savan, 2015)

Prokarüootides asub mRNA 5' UTR-s umbes 5-7 nukleotiidi enne kodeerivat järjestust Shine-Dalgarno järjestus (GGAGG), mis paardub ribosoomi väikese alaühiku 16S rRNA 3'

otsas asuva Anti-Shine-Dalgarno järjestusega, käivitades translatsiooni initsiatsiooniprotsessi (G.-W. Li et al., 2012).

Eukarüootse mRNA 5' UTR sisaldab samuti ribosoomi poolt äratuntavat järjestust, mis võimaldab ribosoomil mRNA-ga seonduda ja translatsiooni alustada. Translatsiooni initsiatsiooniks skaneerib preinitsiatsioonikompleks 5' UTR-i kuni jõuab startkoodonini ning mRNA seondub ribosoomi väikese alaühikuga. (Hinnebusch et al., 2016)

3' UTR-il on oluline roll translatsiooni termineerimises ja translatsioonijärgses modifitseerimises (Barrett et al., 2013).

Eukarüootsetes rakkudes lisatakse mRNA protsessingu käigus mRNA 5' otsa 5' müts ja 3' otsa polü-A saba. 5' 7-metüülguanosiinmüts (m⁷G) koosneb guaniini nukleotiidist, mis on mRNA külge seondunud 5'-5' trifosfaatühenduse abil. Kohe pärast nukleotiidi mRNA külge lisamist metüleerib metüültransferaas selle guanosiini 7. positsioonis. (Ramanathan et al., 2016)

Polü-A saba on kuni mõnesaja nukleotiidi pikkune polüadenosiini järjestus, mis lisatakse mRNA protsessingu käigus pre-mRNA 3' otsa. Selle peamine ülesanne on kaitsta mRNA-d degradeerumast. (McLaughlin et al., 1973)

1.1.3. mRNA struktuuri ja funktsiooni seos

mRNA juhib valguekspressiooni, mille efektiivsus sõltub mRNA funktsionaalsest poolväärtusajast (*functional half-life*) ning sellest, kui hästi toimub mRNA kodeerivalt järjestuselt translatsiooni initsiatsioon ja elongatsioon. Nii translatsiooniefektiivsust kui funktsionaalset poolväärtusaega mõjutab primaarne mRNA järjestus. Sünonüümsete koodonite valikul on otsene mõju translatsioonile, kusjuures kõrge ekspressioonitasemega geenid sisaldavad tihti rohkem „optimaalseid“ koodoneid (Gustafsson et al., 2004; Horstick et al., 2015). Vastupidiselt võivad „mitteoptimaalsed“ koodonid suurendada ribosomaalsete pauside teket (*ribosomal pausing*) ja langetada mRNA poolväärtusaega (Presnyak et al., 2015; Weinberg et al., 2016). Lisaks on valgusünteesi efektiivsus seotud näiteks dinukleotiidide sagedusega mRNA kodeerivas järjestuses (Tulloch et al., 2014).

mRNA primaarjärjestus määrab lisaks valgujärjestusele ka molekuli kalduvust moodustada sekundaar- ja tertsiaarstruktuure (Mortimer et al., 2014). Transkriptoomiülese RNA struktuuri iseloomustamisega on võimalik esile tuua seoseid valguekspressiooni ja erinevate mRNA piirkondade struktuuri vahel (Ding et al., 2014; Wan et al., 2014). Näiteks vähendab

sekundaarstruktuur 5' UTR-is translatsiooni initsiatsiooni efektiivsust ja üldist valkude tootlust (Ding et al., 2014; Leppik et al., 2018; Tuller & Zur, 2015; Wan et al., 2014).

Üks viis RNA sekundaarstruktuuri muutmiseks on muuta primaarjärjestust, kuid kodeerivat järjestust muutes muutub ka koodonjärjestus. Selle vältimiseks on võimalik sekundaarstruktuuri muuta modifitseerides üksikuid nukleotiide, mis ei muuda Watson-Crick paardumist. Näiteks uridiini isomersatsioon pseudouridiiniks säilitab suure tõenäosusega koodoni identiteedi, kuid samas võib stabiliseerida või destabiliseerida aluspaare mRNA sekundaarstruktuuris. (Kierzek & Kierzek, 2003; Mauger et al., 2019; Newby & Greenbaum, 2001)

1.1.4. mRNA osalemine rakuprotsessides

1.1.4.1. mRNA süntees ja protsessing

mRNA sünteesi nimetatakse transkriptsiooniks. Transkriptsiooni käigus teeb RNA polümeraas komplementaarsusprintsiiibi alusel DNA pealt geenist koopia. Matriitsina kasutatakse ühte DNA ahelat, mida nimetatakse matriitsahelaks. Teist DNA ahelat nimetatakse kodeerivaks ahelaks, kuna sellel on sama järjestus nagu transkribeeritud mRNA-l. Prokarüootides on transkriptsiooni tulemusena tekkiv esmane transkript kohe transleeritav. Eukarüootides läbib esmane transkript ehk pre-mRNA enne valgusünteesi pre-mRNA protsessingu, mis hõlmab endas splaissingut, 5' otsa m⁷G mütsi lisamist ja 3' otsa polüadenüleerimist.

Splaissingu käigus lõigatakse pre-mRNA-st välja eksonite vahel asuvad intronid ehk valke mittekodeerivad regioonid. Splaissingut katalüüsib splaissosoom ehk RNA-valk-kompleks, mis lõikab pre-mRNA intronite otstes asuvates splaissingusaitides katki ja ligeerib eksonite otsad omavahel kokku. (Will & Lührmann, 2011)

1.1.4.2. mRNA osalemine translatsioonis

Pärast protsessingut liigub mRNA ribosoomi, kus toimub valgusüntees ehk translatsioon. mRNA järjestuse alusel sünteesib rRNA-st ja valkudest koosnev ribosoom polüpeptiidahela, mis voltub hiljem aktiivseks valguks. Translatsioon jaguneb kolmeks etapiks: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Initsiatsiooni käigus toimub mRNA ja ribosoomi omavaheline seondumine, mida vahendavad initsiatsioonifaktorid (IF) (Aitken

& Lorsch, 2012). Elongatsioonietapis toimub polüpeptiidahela pikenemine – tRNA tunneb ära koodoni ja lisab peptiidahelasse vastava aminohappe (Dever et al., 2018). Stoppkoodonini jõudes termineeritakse translatsioon, polüpeptiid ja mRNA vabanevad ribosoomi küljest ning ribosoomi alaühikud dissotseeruvad omavahel. Terminatsiooni vahendavad vabanemisfaktorid (*release factors*, RF) (Hellen, 2018).

1.1.4.3. mRNA stabiilsus ja degradatsioon

Erinevatel mRNA molekulidel samas rakus on erinev eluiga ehk stabiilsus. Eukarüootides on mRNA prokarüootidega võrreldes tunduvalt stabiilsem. Bakterirakkudes on mRNA keskmine eluiga mõned minutid, imetajarakkudes võib see ulatuda mõnest minutist mitme päevani. Mida stabiilsem on mRNA, seda rohkem valku on võimalik sellelt sünteesida. mRNA piiratud eluiga võimaldab vastavalt raku vajadustele valgusünteesi aktiivsust kiiresti muuta. mRNA degradatsioonil on oluline roll geeniekspressiooni reguleerimises ja raku homöostaasi säilitamises, lagundades mRNA molekulid, millelt on sünteesitud piisavas koguses valke. mRNA degradatsioon on kontrollitud mitte-transleerivate piirkondade ja mRNA ahelas leiduvate modifikatsioonide poolt. (Borbolis & Syntichaki, 2015; Kushner, 2004; Tani et al., 2012)

1.1.5. RNA süntees *in vitro*

Kasutades *in vitro* ehk rakuvälist transkriptsiooni on võimalik sünteesida erinevates pikkustes RNA molekule – 30 nukleotiidist kuni 10^4 nukleotiidini. Rakuväliselt sünteesitud RNA transkripte kasutatakse muu hulgas analüütilistes tehnikates, struktuuriuuringutes, biokeemilistes ja geneetilistes uuringutes ning funktsionaalsete molekulidena. *In vitro* transkriptsioonil kasutatakse bakteriofaagi (tavaliselt T3, T7 või SP6) promootorjärjestust ja polümeraasi. Matriitsiks on plasmiid või PCR'i produkt. Suure koguse RNA sünteesiks kasutatakse plasmidi, väikese koguse puhul pigem PCR'iprodukte. Sünteesitava RNA järjestus lisatakse promootorist allavoolu. *In vitro* transkriptsioon toimub keskmiselt kiirusega 200-260 nukleotiidi sekundis ning vigade tekkimise sagedus on ligikaudu 6×10^{-6} ühe nukleotiidi kohta. (Beckert & Masquida, 2011)

1.2. mRNA modifikatsioonid

Kuigi enamik RNA modifikatsioone esineb tRNA-s ja rRNA-s, leidub ka mRNA-s mitmeid nukleotiidseid modifikatsioone. Nukleiinhapete, sealhulgas ka mRNA modifikatsioonid avaldavad olulist mõju geeniekspressioonile ja mõjutavad muuhulgas erinevaid arenguprotsesse, tüvirakkude diferentseerumist ning mitmesuguste haiguste, nt vähi teket (Ontiveros et al., 2019). RNA modifikatsioone lisavad ja eemaldavad ensüümid, mida nimetatakse vastavalt *writer* („kirjutaja“) ja *eraser* („kustutaja“) valkudeks. Ensüüme, mis selliseid modifikatsioone ära tunnevad, nimetatakse *reader* („lugeja“) valkudeks. Need ensüümid on võimelised läbi viima metülatsioone, deaminatsioone, glükosülatsioone, isomerisatsioone jne. Kõige enam esineb mRNA modifikatsioonide hulgas metülatsiooni ning kõige sagedasem modifikatsioon on N⁶-metüüladenosiin (m⁶A). (Ontiveros et al., 2019)

Modifikatsioonide olulisust võib kirjeldada läbi mRNAs kõige levinuma modifikatsiooni, m⁶A, mis on adenosini N6-positsiooni metülatsioon. m⁶A-d esineb 1000 nukleotiidi kohta keskmiselt 1-2 ning see mõjutab erinevaid rakulisi ja füsioloogilisi protsesse, sealhulgas rakkude diferentseerumist, apoptoosi, kortikaalset neurogeneesi ja vähi tüvirakkude regulatsiooni ägeda müeloidleukeemia puhul. Modifikatsiooni lisavad RNA-le m⁶A metüültransferaasid ja eemaldavad m⁶A demetülaasid. (Boo & Kim, 2020; He et al., 2019)

mRNA-s ühena viimastena avastatud modifikatsioonidest – pseudouridiinidest – on küll palju teada teiste RNA molekulide puhul, kuid selle roll mRNA-s on senini veel kindlalt välja selgitamata.

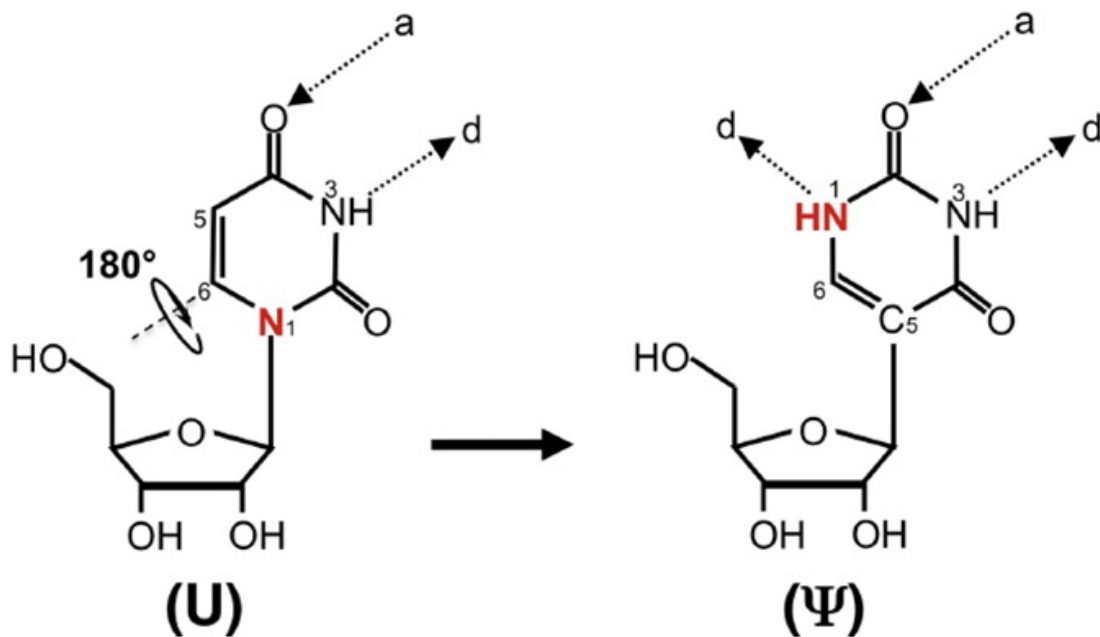
1.2.1. Pseudouridiin

Üks kõige tihedamini esinev ja esimesena avastatud transkriptsioonijärgne RNA modifikatsioon on uridiini isovorm pseudouridiin (Ψ). Ψ sünteesi katalüseerivad ensüümid nimega pseudouridiini süntaasid (*pseudouridine synthase*, PUS), mis jagunevad kaheks – giid-RNA-st sõltuvateks ja mittesõltuvateks. Giid-RNA-st sõltuvad ensüümid vajavad märklaudsaadiga komplementaarseid giid-RNA molekule, mittesõltuvad ensüümid mitte. (Lin et al., 2021)

Ψ erineb enamikest teistest modifitseeritud nukleosiididest selle poolest, et sellel on lämmastikaluse ja suhkru vahel tavapärase lämmastik-süsiniku glükosiidsideme asemel süsinik-süsiniku side. Kui uratsiilalus uridiinis on seotud esimeses positsioonis asuva

lämmastikuaatomi abil ribosijäägiga, siis uridiini isomerisatsioonil pseudouridiiniks pööratakse uratsiili lämmastikalus 180° ümber N3–C6 telje, põhjustades C-C sideme, mis on nukleotiidide seas unikaalne. Kui uridiin saab anda kaks vesiniksidet siis pseudouridiini puhul on võimalik moodustada kolm vesiniksidet (Joonis 2). (Adachi et al., 2019)

Pseudouridiini leidub nii tRNA-s, mRNA-s, rRNA-s (*ribosomal RNA*), snRNA-s (*small nuclear RNA*), kui snoRNA-s (*small nucleolar RNA*). Kuigi pseudouridiini esineb erinevates RNA molekulides palju, on selle roll veel suuresti välja selgitamata. On leitud, et see jäigastab RNA suhkur-fosfaadi selgroogu ja tugevdab aluspaaride omavahelist interaktsiooni, mida nimetatakse *stacking*'u efektiks. *Stacking*-u interaktsioonide suurendamine muudab RNA molekule stabiilsemaks. Ψ eemaldamisel tRNA või rRNA molekulidest on märgatud muuhulgas translatsiooni efektiivsuse langemist ja aeglustunud kasvukiirust. (Charette & Gray, 2000)



Joonis 2. Erinevused uridiini ja pseudouridiini vahel. Uratsiilalus uridiinis (vasakul, tähistusega U) on seotud esimeses positsioonis asuva lämmastikuaatomi abil (joonisel märgitud punaselt) ribosijäägiga. Uridiini isomerisatsioonil pseudouridiiniks (paremal, tähistusega Ψ) pööratakse uratsiili lämmastikalus 180° ümber N3–C6 telje, põhjustades C-C sideme, mis on nukleotiidide seas unikaalne. Uridiin saab anda kaks vesiniksidet (joonisel tähistatud punktiirjoonega noolega vesiniksideme aktseptor ja doonor (vastavalt „a“ ja „d“)) ning pseudouridiin kolm vesiniksidet. (Adachi et al., 2019).

1.2.1.1. Pseudouridiin mRNA-s

mRNA-s avastati Ψ 2014. aastal (Schwartz et al., 2014). On leitud, et pseudouridiini jäägid võivad mRNA-s mõjutada stoppkoodonite UAA, UGA ja UAG spetsiifilisust. Nii $U \rightarrow \Psi$ modifikatsioon kui $U \rightarrow C$ mutatsioon põhjustavad stoppkoodoni läbilugemist (*nonsense suppression*) (Adachi et al., 2019).

Uurides pseudouridüleeritud mRNA mõju translatsioonile, leiti, et Ψ lisamine koodonisse mõjutab vastava aminohappe lisamist polüpeptiidahelasse ja vähendab üldist translatsiooni kiirust, kuigi Ψ mõju translatsiooni kiirusele võib sõltuda omakorda koodoni järjestuse kontekstist. Lisaks nähti, et Ψ olemasolu soodustab mitme polüpeptiidahela sünteesi ühelt mRNA järjestuselt nii *in vitro* kui inimrakkudes. (Eyler et al., 2019)

1.2.1.2. Pseudouridiini teadaolev funktsioon teistes RNA-des

Pseudouridiin tRNA-s

tRNA-s on pseudouridiin väga levinud ja see stabiliseerib tRNA struktuurseid motiive. Üks selline struktuurne motiiv on T Ψ C õlg (T Ψ C *stem loop*). Ψ -d leidub kõikides eluslooduse domeenides tRNA D-õlas ning antikoodonõlas ja -silmuses (*anticodon stem-loop*, ASL), harvem ka teistes tRNA piirkondades. (Charette & Gray, 2000)

Translatsiooni käigus mõjutab Ψ tRNA molekulide interaktsioone rRNA ja mRNA molekulidega. Ψ ja teised modifitseeritud nukleotiidid mõjutavad tRNA domeenide struktuuri, kuid mitte RNA üldist voltumist. Antikoodonõla ja -silmuse domeenis on Ψ vajalik tRNA-de korrektseks seondumiseks ribosoomiga. Ψ stabiliseerib ASL-i struktuuri ja aitab tugevdada seondumist ribosoomi 30S alaühikuga. ASL-i stabiliseeritud konformatsioon aitab translatsiooni ajal hoida õigeid koodon-antikoodoni paare. See stabiilsus tõstab translatsiooni täpsust langetades peptiidsidemete moodustumise kiirust ja andes rohkem aega valede koodon-antikoodoni paaride hülgamiseks. Vaatamata Ψ rollile tRNA struktuuri stabiliseerimisel ei ole tRNA pseudouridülatsioon raku elutegevuse jaoks hädavajalik. (Charette & Gray, 2000)

Pseudouridiin rRNA-s

Pseudouridiini on leitud kõikides eluslooduse domeenides ribosoomi suures ja väikeses alaühikus. Ψ jäägid on koondunud peamiselt ribosoomi II, IV ja V domeeni ja need stabiliseerivad RNA-RNA-vahelisi ja/või RNA-valgu-vahelisi interaktsioone. See

stabiilsus võib aidata kaasa rRNA voltumisele ja ribosoomi kokkupanekule. Ψ võib mõjutada ka kohalike struktuuride stabiilsust ja seeläbi ka dekodeerimise ja korrektuuri (*proofreading*) kiirust ja täpsust translatsioonil. (Charette & Gray, 2000)

Pseudouridiin snRNA-s

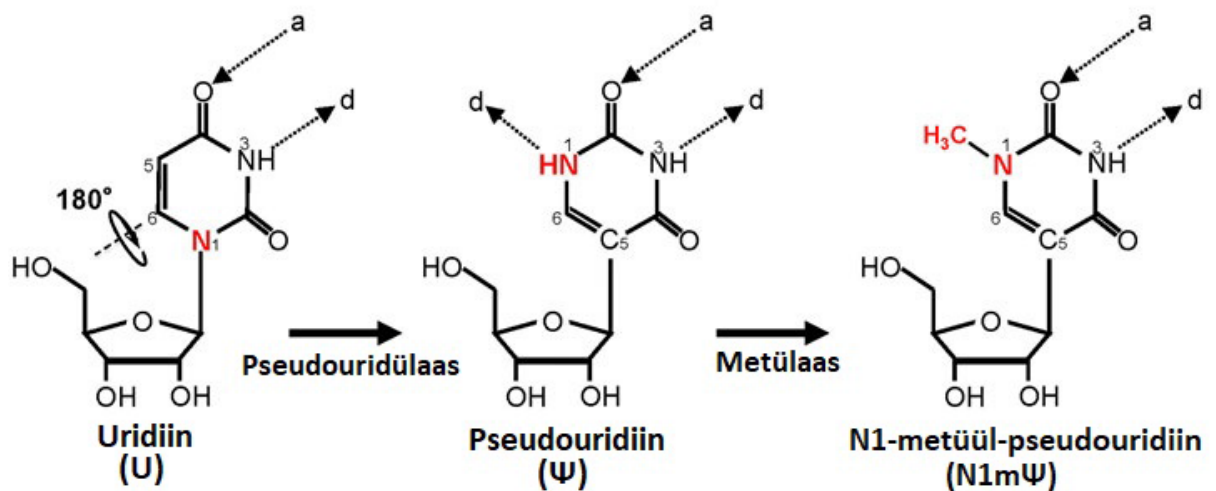
Ψ -d on leitud ka eukariootide splaissosomaalsetes snRNA-des. Ψ jäägid on snRNA-s tihti fülogeneetiliselt konserveerunud, kuid varieeruvad taksonite ja organismide vahel veidi. Ψ jäägid asuvad snRNA-s tavaliselt regioonides, mis osalevad RNA-RNA-vahelistes ja/või RNA-valgu-vahelistes interaktsioonides, mis on seotud splaissosoomi kokkupaneku ja funktsiooniga. Ψ jäägid snRNA-s aitavad kaasa splaissosoomi korrektsele voltumisele, mis on vajalik pre-mRNA protsessingu jaoks. (Charette & Gray, 2000)

1.2.1.3. Pseudouridiin mRNA vaktsiinides

Modifitseeritud pseudouridiini, N1-metüül-pseudouridiini (N1m Ψ) kasutatakse mRNA vaktsiinides, sealhulgas COVID-19 mRNA vaktsiinides. Võrreldes näiteks atenuueeritud või inaktiveeritud vaktsiinidega võtab mRNA vaktsiinide tootmine aega vaid mõned päevad või nädalad ning vaktsiine toodetakse kasutades mRNA *in vitro* transkriptsiooni. (Pascolo, 2021)

Kasutades sünteetilises mRNA-s uridiini asemel N1-metüül-pseudouridiini, on tollilaadsete retseptorite (*toll-like receptors*, TLR) vastus modifitseeritud mRNA molekulile väiksem, kui tavapäraselt väljaspoolt organismi sisestatud mRNA molekuli puhul. Selle omaduse, et TLR-id ei pea N1-metüül-pseudouridiini sisaldavat mRNA-d sissetungijaks, avastasid Katalin Karikó ja Drew Weissman 2005. aastal. (Dolgin, 2021; Karikó et al., 2005)

N1-metüül-pseudouridiin (N1m Ψ) ärgitab kaasasündinud immuunvastust isegi vähem kui Ψ ja parandab ka translatsioonivõimet. Seetõttu kasutatakse nii Pfizer-BioNTech kui Moderna mRNA vaktsiinides N1-metüül-pseudouridiini. (Morais et al., 2021).



Joonis 3. N1-metüül-pseudouridiini süntees. Uridiini (U, joonisel vasakul) süntees pseudouridiiniks (Ψ, joonisel keskel) toimub nagu kirjeldatud käesoleva töö punktis 1.2.1. Pseudouridiini süntees N1-metüül-pseudouridiiniks (N1mΨ, joonisel paremal) toimub metülaasi abil. Pseudouridiini N1 lämmastikaatomile (joonisel punaselt) lisatakse metüülrühm (CH₃, punaselt). Võrreldes pseudouridiiniga saab N1-metüül-pseudouridiinil anda kolme vesiniksideme (joonisel tähistatud punktiirjoonega noolega vesiniksideme aktseptor ja doonor (vastavalt „a“ ja „d“)) asemel kaks vesiniksidet nagu ka uridiin. (Joonis kohandatud artiklist Morais et al., 2021)

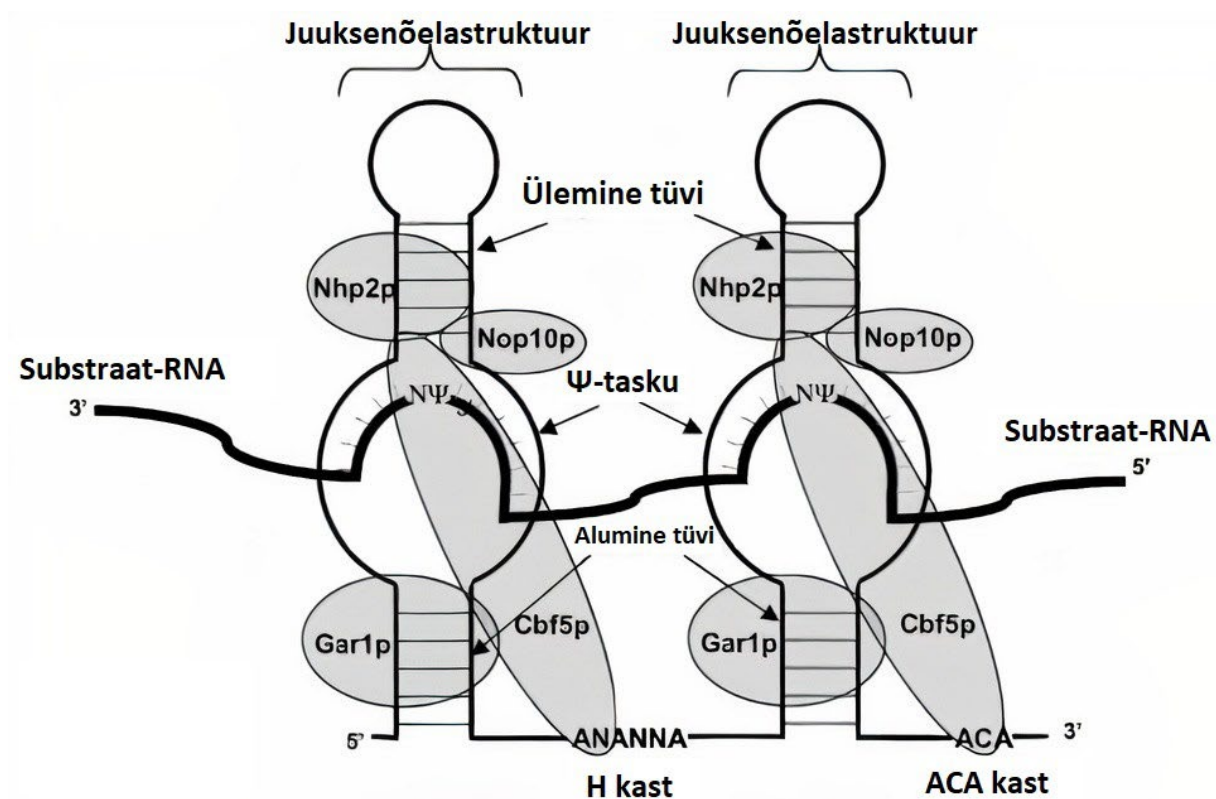
Kuna N1-metüül-pseudouridiini puhul on uratsiili esimeses positsioonis asuv lämmastik metüleeritud (Joonis 3), siis ei saa N1mΨ anda kolmandat vesiniksidet nagu pseudouridiin. Seega käitub N1mΨ vesiniksidemete vahendatud interaktsioonides nagu tavapärane uridiin.

1.3. Valgukompleks Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 üldine iseloomustus

Eukarüootse RNA puhul katalüüsivad koht-spetsiifilist pseudouridülatsiooni kas giid-RNA-st mittesõltuvad või giid-RNA-st sõltuvad ensüümid. Viimaseid nimetatakse H/ACA kasti (H/ACA box) väikesteks ribonukleoproteiinideks (*small ribonucleoprotein*, sRNP). H/ACA sRNP-d koosnevad H/ACA giid-RNA-st, mis tunneb ära pseudouridülatsiooni sihtmärgiks olevaid uridiine, ja neljast valgust, mis *S. cerevisiae*-s on nimetatud Cbf5, Gar1, Nop10 ja Nhp2. (Czekay & Kothe, 2021; Kiss et al., 2004; Rozhdestvensky et al., 2003)

Eukarüootsete H/ACA sRNP-de puhul eristatakse H/ACA väikeseid tuumakese RNP-sid (snoRNP-d) ja H/ACA väikeseid Cajali keha RNP-sid (scaRNP-s), mis tegutsevad vastavalt tuumakestes ja Cajali kehas (Darzacq et al., 2002). H/ACA kasti snoRNA-de sekundaarstruktuuri nimetatakse juuksenõel-liigend-juuksenõel-saba struktuuriks (*hairpin-*

hinge-hairpin-tail structure), kuna see koosneb kahest juuksenõelast ja kahest üheaahelalisest regioonist (Joonis 4) (Bachellerie et al., 2002). H/ACA snoRNA-d sisaldavad konserveerunud järjestusi: liigend-struktuuril asuv H kast (H box) järjestusega ANANNA ja saba-struktuuril asuv ACA kast (ACA box) (Ganot et al., 1997). Need järjestused on olulised H/ACA RNA-de korrektseks moodustumiseks (Bortolin et al., 1999; Ganot et al., 1997).



Joonis 4. Ülevaade H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksist. Giid-RNA moodustab juuksenõel-liigend-juuksenõel-saba struktuuri. Liigend- ja sabastruktuuril asuvad vastavalt H ja ACA kast. Kompleksi kuuluvad valgud Cbf5, Gar1, Nop10 ja Nhp2. Substraad-RNA seondub pseudouridülatsioonitaskutesse (Ψ -tasku), kus katalüütiline ensüüm Cbf5 viib substraad-RNA-l läbi pseudouridülatsioonireaktsiooni. (Joonis kohandatud artiklist Xiao et al., 2008)

1.3.1. H/ACA RNP valgud

H/ACA snoRNP koosseisu kuulub neli evolutsiooniliselt konserveerunud valku, mis võivad organismide vahel veidi erineda (Joonis 4). Need valgud on vajalikud üksteise ja H/ACA kasti RNA stabiilsuse ning pseudouridülatsiooni katalüüsi jaoks. (De Zoysa & Yu, 2017)

Cbf5 (55 kDa) (inimeses düskeriin, rotis NAP57 ja äädikakärbses Nop60B) on ensüüm, mis katalüüsib pseudouridülatsioonireaktsiooni. Cbf5 sisaldab katalüütilist domeeni ja karboksüül-terminaalset PUA domeeni (PUS ja arheosiin transglükosülaas). Mõlemad domeenid on bakteriaalsete, arheaalsete ja pärmis leiduvate pseudouridiini süntaaside vahel struktuuriliselt konserveerunud. (Kiss et al., 2002; Terns & Terns, 2006)

Gar1 (21,5 kDa) koosneb kahest glütsiini- ja argiiniirikast (*glycine-arginine-rich*, GAR) domeenist ja nendevahelisest tuumikdomeenist. Gar1-l on oluline roll substraat-RNA seondumises ja vabastamises ning on seondunud Cbf5-ga. (De Zoysa & Yu, 2017)

Nop10 (6,6 kDa) on kompleksi väikseim valk koosnedes vaid 64 aminohappejäägist. Nop10 kindel roll H/ACA RNP-s pole teada, kuid arvatakse, et see mõjutab Cbf5 katalüütilise tsentri struktuurset korraldust ja stabiliseerumist. Samuti on teada, et rekombinantse valgu Nop10 üleekspressseerimine on vajalik valgu Cbf5 üleekspressseerimisel, sest ilma Nop10 juuresolekuta ei ole Cbf5 lahustuval kujul. (De Zoysa & Yu, 2017; Hamma et al., 2005; Kiss et al., 2010)

Nhp2 (17 kDa) (arhede L7Ae) on pseudouridülatsiooni aktiivsuseks hädavajalik, kuigi see ei mõjuta giid- ja substraat-RNA seondumist (Caton et al., 2018). Arvatakse, et Nhp2 roll on seotud substraat-uridiini õige positsioneerimisega Cbf5 aktiivtsentrisse (Liang et al., 2007).

1.3.2. snoRNA

Väikesed tuumake RNA-d (*small nucleolar RNA*, snoRNA) on mittekodeerivad RNA-d, mille peamine funktsioon on aidata läbi viia modifikatsioone teistes RNA-des, põhiliselt rRNA-s, tRNA-s ja snRNA-s. snoRNA-d leidub eukarüootides ja arhede, kuid mitte bakterites. snoRNA liigitatakse kahte perekonda: C/D kasti (C/D box) snoRNA-d, mis on seotud metülatsiooniga, ja H/ACA kasti snoRNA-d, mis osalevad pseudouridülatsioonil. Mõlema modifikatsioonitüübi läbiviimiseks moodustab snoRNA RNP kompleksi ensüümidega (mille hulgas on vastavalt metülaas või pseudouridiini süntaas), milles snoRNA roll on olla juhtmolekul: tuvastada ja seonduda sihtmärk-RNA-ga. (Bachellerie et al., 2002; Patra Bhattacharya et al., 2016)

1.3.3. H/ACA RNP tööpõhimõte

Kompleksi moodustamiseks seondub giid-RNA ülemine tüvi Cbf5, Nop10 ja Nhp2-ga ning Cbf5 PUA domeen seondub giid-RNA alumise tüve ja vastavalt H või ACA elemendiga (Joonis 4). Gar1 seondub Cbf5 külge, kuid ei ole giid-RNA-ga seondunud. (De Zoysa & Yu, 2017; Li & Ye, 2006)

H/ACA snoRNA mõlemad juuksenõelastruktuurid sisaldavad sisemist lingu (*internal loop*), mida nimetatakse pseudouridülatsioonitaskuks (Ψ -tasku, *pseudouridylation pocket*) (Joonis 4). Giid-RNA ülemise tüve, alumise tüve ja/või H/ACA elemendi interaktsioonid kompleksi valkudega paigutavad Cbf5 katalüütilise domeeni täpselt Ψ -tasku kohale. Pseudouridülatsioonitasku sisaldab lühikest substraat-RNA-ga komplementaarset järjestust ja juhatab Cbf5 valgu RNA modifikatsiooni märklauapositsioonini (De Zoysa & Yu, 2017; Yu et al., 2004).

Substraat-RNA seondumine H/ACA snoRNA-ga moodustab kolmesuunalise ühenduse, kus pseudouridülatsioonitasku keskele jääv märklau-uridiin ja selle 3' suunal kõrvalasuv nukleotiid ei seonu giid-RNA-ga ning märklau-uridiin sisestatakse modifitseerimiseks Cbf5 valgu aktiivtsentrisse (Liang et al., 2007; Liang et al., 2009; Wu & Feigon, 2007). Efektiivseks pseudouridülatsiooniks peavad giid- ja substraat-RNA olema omavahel ühendatud vähemalt kaheksa aluspaari jagu, sealjuures kummalgi pool pseudouridülatsioonitaskut vähemalt kolme aluspaariga (De Zoysa et al., 2018; Kelly et al., 2019).

Kõigi funktsionaalsete H/ACA sRNA-de puhul on pseudouridülatsioonisaidi ja allavoolu lähima konsensusjärjestuselemendi (H kasti või ACA kasti) vahel kindel vahemaa, mis on tavaliselt 15-16 nukleotiidi (Czekay & Kothe, 2021; Tang et al., 2002; Toffano-Nioche et al., 2015). See vahemaa tagab substraat-RNA märklau-uridiini modifitseerimiseks giid-RNA õige positsioneerumise Cbf5 aktiivtsentri suhtes (Caton et al., 2018).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Erinevate RNA molekulide koht-spetsiifiline pseudouridüleerimine on suure rakendusliku potentsiaaliga. Näiteks eukarüootse mRNA puhul on senini ebaselge seal esinevate pseudouridiinide roll, siis oleks tarvis sobilikku molekulaarset tööriista, et läbi viia suunatud pseudouridülatsioon huvipakkuval sihtmärk mRNA-l. Varem on kirjanduses näidatud eukarüootides ja arhedes esineva H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi kasutamine looduslikel substraatidel (rRNA, tRNA) pseudouridiini sünteesimiseks (Caton et al., 2018), kuid nende tööde eesmärk on olnud uurida antud kompleksi erinevate osade omavahelist seondumist ja katalüütilist kineetikat. Käesoleva töö kaugemaks eesmärgiks on kasutada looduses olemasolevat molekulaarset tööriista, et viia pseudouridiine huvipakkuvatesse piirkondadesse, et seeläbi selgitada välja mRNA modifikatsioonide potentsiaalne roll rakus. Olemasolevas töös kasutatakse ensümaatilise reaktsiooni läbi viimisel substraadina lühikest osa rRNA-st.

Käesoleva töö eesmärk on puhastada välja pseudouridülatsiooni teostava *Saccharomyces cerevisiae*-st pärit H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud ja testida kompleksi aktiivsust *in vitro* pseudouridülatsioonil.

Püstitati hüpotees, et meie optimeeritud tingimustel ekspresseeritud ja väljapuhastatud H/ACA RNP kompleksi valgud on *in vitro* pseudouridülatsiooni reaktsioonil aktiivsed. Hüpoteesi kontrollimiseks ekspresseeriti H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi rekombinantsed valgud *E. coli* tüvedes, puhastati need aafiinsuskromatograafia abil, transkribeeriti giid- ja substraat-RNA-d ning teostati *in vitro* pseudouridülatsioonireaktsioon, testimaks väljapuhastatud valgukompleksi aktiivsust.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud *E. coli* tüved ja plasmiidid

Tabel 1. Töös kasutatud *E. coli* tüved

Tüvi	Genotüüp	Allikas
BL21 (DE3)	F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	Sigma-Aldrich
Rosetta 2 BL21 (DE3)	F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)	Sigma-Aldrich
DH5α	F-f80lacZDM15D(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r-K, mK-) phoA supE44 l- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
pETDuet-1 Cbf5+Nop10	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olevad koodon-optimeeritud geenid CBF5 ja NOP10; Amp ^R	Ute Kothe
pGEX-5x-3 Gar1	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olev koodon-optimeeritud geen GAR1; Amp ^R	Ute Kothe
pET28a Nhp2	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olev koodon-optimeeritud geen NHP2; Km ^R	Ute Kothe
pUC18 snR5 snoRNA	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olev giid-RNA järjestus	Margus Leppik
pUC18 25S h38 rRNA	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olev substraat-RNA järjestus	Margus Leppik

2.2.2. Töös kasutatud söötmed

Tabel 3. Töös kasutatud söötmed

Sööde	Koostis	Allikas
Luria-Bertani (LB) agarsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar	Bertani, 1951
Luria-Bertani (LB) vedelsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Bertani, 1951

Vedelsöötme puhul lisati antibiootikum vastavalt kasutatava plasmidi resistentsusele lõppkontsentratsioonis:

100 µg/ml ampitsilliin (Amp)

25 µg/ml kanamütsiin (Km)

Agarsöötme puhul lisati antibiootikum vastavalt kasutatava plasmidi resistentsusele lõppkontsentratsioonis:

200 µg/ml ampitsilliin (Amp)

50 µg/ml kanamütsiin (Km)

2.2.3. Töös kasutatud puhvid, ensüümid ja reagentid

Tabel 4. Töös kasutatud puhvid

Puhver	Koostis
2x SDS proovipuhver	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) broomfenoolsinine, 20% (v/v) glütserool, 200 mM DTT
1x SDS geeli jooksutamise puhver	25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS (w/v)
1x PBS puhver	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
Aluselise fosfataasi (AP) puhver	100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
Puhver A1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM β-merkaptotetanool
Puhver A2	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM β-merkaptotetanool, 10 mM redutseeritud L-glutatioon
Puhver B1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 1 mM β-merkaptotetanool, 20 mM imidasool
Puhver B2	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 1 mM β-merkaptotetanool, 300 mM imidasool

Puhver C1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 400 mM KCl, 0,1 mM PMSF, 5 mM β-merkaptotetanool
Puhver C2	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 400 mM KCl, 0,1 mM PMSF, 5 mM β-merkaptotetanool, 20 mM imidasool
Puhver C3	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 400 mM KCl, 0,1 mM PMSF, 5 mM β-merkaptotetanool, 300 mM imidasool
10x PCR-puhver	750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM NH ₂ SO ₄ , 0,1% TritonX 100, 5% Ficoll 400, 10 mM tartasiin
4x transkriptsioonipuhver	800 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 120 mM MgCl ₂ , 120 mM DTT, 8 mM spermiidiin
Giid-RNA voltumispuhver	20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1,5 mM Mg(OAc) ₂ , 0,75 mM DTT
Substraat-RNA puhver	20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 150 mM NaCl, 7 mM Mg(OAc) ₂ , 0,75 mM DTT
Pseudouridülatsioonipuhver	20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 150 mM NaCl, 4 mM Mg(OAc) ₂ , 0,75 mM DTT

MQ H₂O toodeti seadmega Millipore Milli-Q® Integral 10.

Ensüümid ja reagentid:

NBT (*4-nitro blue tetrazolium chloride*) (Thermo Fisher), BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*) (Thermo Fisher), DMF (dimetüülfomamiid) (Sigma-Aldrich) DNAas (*Amresco*), T7 RNA polümeraas (puhastatud molekulaarbioloogia õppetooli laboris), Ribolock RNAasi inhibiitor (Thermo Fisher), rNTP (Sigma-Aldrich) dNTP (Sigma-Aldrich), uridiin 5'-trifosfaat [5-³H] (Hartmann Analytic), sintsillatsioonisegu *Optiphase Hisafe 3* (*PerkinElmer*), lõss (Tere AS), Taq DNA polümeraas (puhastatud üldise ja mikroobiokeemia õppetooli laboris), valkude suurusmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), DNA suurusmarker GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher), endonukleas BamHI (Thermo Fisher), 10x BamHI puhver (Thermo Fisher), aktiivsüsi (Merck)

2.2.4. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Tabel 5. Töös kasutatud oligonukleotiidide järjestused

Praimeri nimi	Oligonukleotiidi järjestus
snR5 RNA T7 DIR	5' - GCTAATACGACTCACTATAGGATCATT- CAATAAACTGATCTTCCGGATTACC - 3'
snR5 RNA REV	5' - AGTGAAGAATATGTACACCTAGAGCGAACC - 3'
25S rRNA heeliks 38 DIR	5' - GCTAATACGACTCACTATAGGGTA- AAGCGAATGATTAGAAA - 3'
25S rRNA heeliks 38 REV	5' - TGCTTACCAAAAATGGCCCACTAAAAGC - 3'

2.2.5. H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valkude puhastamine

2.2.5.1. *E. coli* rakkude kasvatamine ja valguekspressiooni analüüs sobivate ekspressioonitingimuste leidmiseks

Ekspresseerimaks H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi rekombinantseid valke *E. coli*-s, valiti vastavalt varem teadaolevale meetodile (Caton et al., 2018) ekspressioonitüved (Tabel 1). Kasutasime käesolevas töös plasmide, kus koodonoptimeeritud geenid olid bakteriofaag T7 promootori kontrolli all (Tabel 2). Töös kasutati ekspressioonitüvesid, kus on bakterikromosoomi viidud *lac* promootori kontrolli alla bakteriofaag T7 polümeraasi geen. Lisades sünteetilist laktoosi analoogi – IPTG-d – kasvukeskkonda, indutseeritakse ekspressioonitüves T7 polümeraasi ekspressiooni. Seeläbi on võimalik ekspressioonitüvesse sisestatud plasmiidilt transkribeerida meid huvitav transkript, kui geenijärjestus on T7 promootori kontrolli all.

E. coli rakud transformeeriti *heat-shock* meetodil. Selleks lisati varem keemiliselt kompetentseks muudetud ekspressioonitüvede rakukultuuridele (Tabel 1) 10 ng plasmiidset DNA-d ning segu inkubeeriti 30 minutit jääl. Seejärel tekitati rakkudele kuumašokk 1,5 minuti vältel +42 °C juures ja segu jahutati 2 minutit jääl. Rakkudele lisati LB vedelsööde (Tabel 3) 1 ml ning lasti kasvada 60 minutit +37 °C juures antibiootikumi juuresolekuta, misjärel külvati rakud vastavalt ampitsilliini (pETDuet-1 ja pGEX-5x-3 plasmidi puhul) või kanamütsiini (pET28a plasmidi puhul) sisaldavale LB tardsöötmele (Tabel 3) ning inkubeeriti temperatuuril +37 °C kuni kolooniate ilmumiseni.

Valguekspressiooni hindamiseks Gar1 ja Nhp2 järjestusi plasmiidil kandvate rakkude puhul inokuleeriti tardsöötmelt üks rakukoloonia 2 ml LB söötmesse ning rakke inkubeeriti +37 °C juures loksutil 180 pööret minutis (rpm) kuni optilise tiheduseni $OD_{600} \approx 0,6$, et tagada kasvatatavate *E. coli* rakkude olek eksponentsiaalses kasvufaasis (Joonis 5). Rekombinantsete valkude ekspressiooni hindamiseks jagati rakud kahte võrdsesse ossa ning ühel juhul lisati söötmesse IPTG (lõppkontsentratsioon (f.c.) 1 mM), millega käivitati ekspressioonitüve genoomi integreeritud bakteriofaag T7 RNA polümeraasi transkriptsioon, mis viib vastava polümeraasi ekspressioonini rakus ning seejärel meid huvitava valgu ekspressioonini rakus. Rakke, millele ei lisatud IPTG-d, kasutati negatiivse kontrollina.

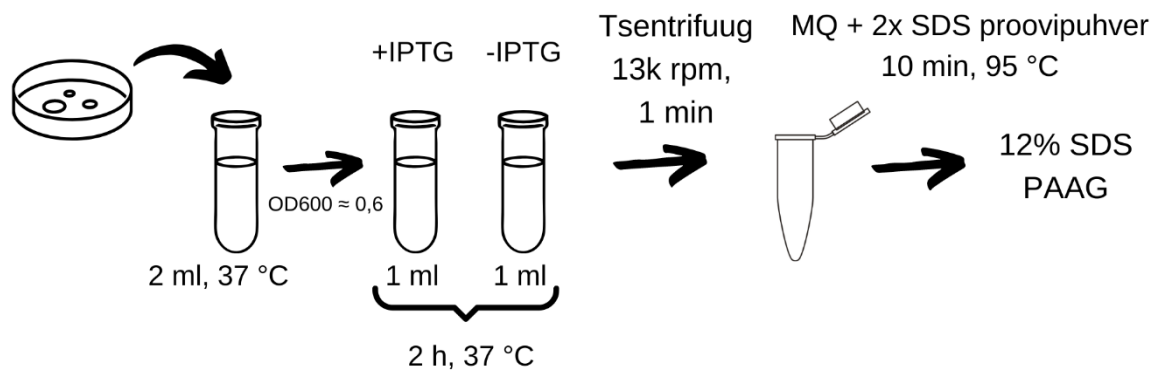
IPTG lisamise järgselt kasvatati rakke 2 tundi +37 °C ning rakud koguti tsentrifuugimise teel (tsentrifuug Heraeus fresco, 13000 rpm, +4 °C, 1 minut). Sööde eemaldati ja rakkude

resuspendeeriti 50 µl-s MQ-vees ja lisati võrdses mahus 2x SDS proovipuhvrit. segu inkubeeriti +95 °C 10 minutit rakkude lüüsimiseks ja valkude denatureerimiseks. Igast segust võeti 5 µl proov ning kanti 12% SDS-poliüakrüülamiidgeelile (SDS-PAAG) koos valkude suurusmarkeriga ja valgud lahutati elektriväljas (150 V). Valkude visualiseerimiseks värviti geeli värviga *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

Valkude Cbf5 ja Nop10 ko-ekspressioon viidi läbi temperatuuril +18 °C. Ekspressiooni tarbeks inokuleeriti tardsöötmetelt üks koloonia 2 ml LB söötmesse ning rakke inkubeeriti +37 °C juures loksutil 180 pööret minutis (rpm) kuni OD₆₀₀ ≈ 1, misjärel tehti 5x lahjendus ja kasvatati (+37 °C) 10 ml rakke kuni OD₆₀₀ ≈ 0,6. Rakud jagati kahte võrdsesse ossa ning asetati +18 °C juurde. Pool kogust indutseeriti IPTG-ga (f.c. 1 mM) ning rakke inkubeeriti vastavalt 3 h, 6 h, 9 h ja 18 h. Igas ajapunktis võeti 1 ml mahus proov.

Rakud koguti tsentrifuugimise teel (tsentrifuug Heraeus fresco, 13000 rpm, +4 °C, 1 minut). Sööde eemaldati ja rakusade resuspendeeriti MQ vees ja segati võrdses mahus 2x SDS proovipuhvriga. Segu inkubeeriti +95 °C 10 minutit rakkude lüüsimiseks ja valkude denatureerimiseks. Segust võeti proovid ning kanti 12% SDS-poliüakrüülamiidgeelile (SDS-PAAG) ja valgud lahutati elektriväljas ning visualiseeriti nagu varem.

Täpsemaks ekspressiooni hindamiseks korraldati Cbf5 ja Nop10 ko-ekspressioonirakkude kasvatamist 25 ml, võttes tihedamalt ajapunkte – ühetunnise vahetega vahemikus 5h kuni 12h ning teostati rakkude kogumine ja ettevalmistus nagu varem. Peale valkude lahutamist SDS-PAA geelil elektriväljas ja geeli värvimist *Coomassie Brilliant Blue R-250*-ga analüüsiti valke Western Blot meetodil.



Joonis 5. Rakkude kasvatamine rekombinantse valgu üleekspressiooni hindamiseks.

Agaroostassilt inokuleeriti üks koloonia 2 ml söötmesse ja kasvatati +37 °C juures kuni OD₆₀₀ väärtuseni 0,6. Rakud jagati kahte võrdsesse ossa ning ühel juhul indutseeriti valguekspressioon IPTG lisamisega. Rakud koguti 2h möödudes tsentrifuugimise teel. Rakud lüüsi ja valgud denatureeriti SDS proovipuhvris temperatuuril +95 °C. Valgud lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelil elektriväljas.

2.2.5.2. Western Blot analüüs

Valgud kanti SDS-PAA geelist üle PVDF (polüvinüül-dieenfluoriid) membraanile (Immobilon-P Millipore 0,2 µm) poolkuiva ülekande abil (Biometra Fastblot). Ülekanne tehti pingel 15 V 40 minuti jooksul vastavalt tootja protokollile.

Seejärel blokeeriti membraan toatemperatuuril 1 tunni jooksul kasutades blokeerimislahust (PBS, 5% lõss) (Tabel 4). Cbf5 valguekspressiooni hindamiseks kasutati valgu küljes oleva His-märgise spetsiifilisi primaarseid antikehi (Abcam). Inkubeerimislahusesse (PBS, 5% lõss) lisati primaarne antikeha (lahjendusega 1:2000) ja inkubeeriti üleöö +4 °C juures loksutil. Seejärel pesti PVDF membraani kolm korda 10 minutit PBS puhvris. Membraan inkubeeriti sekundaarse antikehaga (Sigma-Aldrich) (lahjendusega 1:10000) toatemperatuuril 1 tund loksutil. Lõpuks pesti membraani kolm korda 10 minutit PBS puhvris ja viidi läbi ilmutamisreaktsioon. Ilmutamiseks viidi membraan 10 ml aluselise fosfataasi (AP) puhvrise (Tabel 4) ja lisati reagente NBT (66 µl) ja BCIP (33 µl), mis olid lahustatud dimetüülformamiidis (DMF) vastavalt 50 mg/ml NBT 70% DMF-s ja 50 mg/ml BCIP 100% DMF-s (Tabel 4). Membraani hoiti 10 minutit pimedas ja seejärel pildistati membraan üles.

Western blot analüüsi abil valiti välja sobivad ekspressioonitingimused edasiseks valkude puhastamiseks.

2.2.5.3. *E. coli* rakkude kasvatamine valkude suures mahus puhastamiseks

Pärast valguekspressiooni optimeerimist kasvatati rakke suures mahus, et rekombinantset valgud välja puhastada. LB tardsöötmetelt inokuleeriti üks koloonia 2 ml LB vedelsöötmesse. Rakke kasvatati +37 °C loksutil üleöö ja seejärel tehti 25x lahjendus 50 ml LB söötmesse ning kasvatati +37 °C kuni $OD_{600} \approx 1$. Seejärel tehti 8x lahjendus 400 ml LB söötmesse ja kasvatati kuni $OD_{600} \approx 0,6$. Rakukultuurilt võeti negatiivne proov (-IPTG) ja ülejäänud rakud indutseeriti IPTG-ga (f.c. 1 mM) ning kasvatati vastavalt temperatuuril: Cbf5 ja Nop10 ko-ekspressiooni puhul +18 °C juures 12 tundi ning Gar1 ja Nhp2 ekspressioonide puhul +37 °C juures 2 tundi.

Rakkude lüüsimine

Bakterirakud koguti tsentrifuugimise teel (Rotina 420, rootor: Hettich 4723 Rotina Swing Bucket) 10 minuti jooksul (4500 rpm, +4 °C) ja seejärel eemaldati rakuosadest sööde. Rakud resuspendeeriti pesemise eesmärgil MQ vees ja koguti uuesti tsentrifuugimise teel ning resuspendeeriti edasises töös kasutatavas puhvris: Cbf5 + Nop10 ja Gar1 puhul puhvris A1 (10 ml 1 g rakkude kohta); Nhp2 puhul puhvris C1 (5 ml 1 g rakkude kohta).

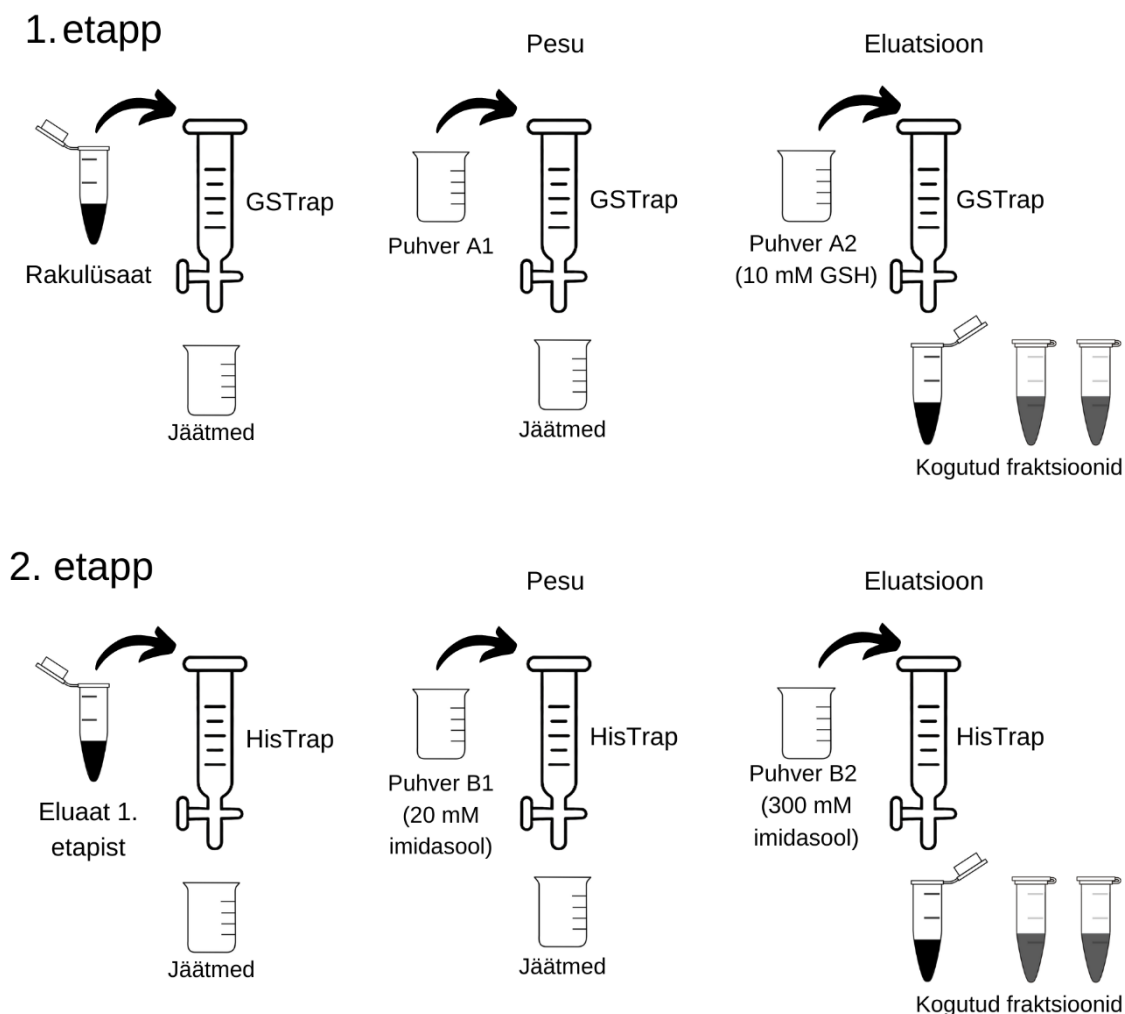
Rekombinantset valgud lüüsi ja puhastati välja kahes osas: kõigepealt korraga Cbf5, Nop10 ja Gar1 ning seejärel lüüsi ja puhastati Nhp2 teistest eraldi.

Cbf5 + Nop10 valke üleekspresseerivad rakud segati kokku Gar1 valku üleekspresseerivate rakkudega ja lüüsi French pressiga rõhul 110 MPa (Stansted *Pressure Cell Homogeniser*). Rakulüsaat klaariti tsentrifuugimise teel 30 minuti jooksul (4500 rpm, +4 °C) ning filtreeriti läbi 0,45 µm filtri. Klaaritud lüsaat inkubeeriti *end-over-end* segajal +4 °C juures 60 minutit, et moodustuks Cbf5 + Nop10 + Gar1 kompleks.

Nhp2 valku üleekspresseerivad rakud lüüsi French pressiga rõhul 110 MPa (Stansted *Pressure Cell Homogeniser*). Rakulüsaat klaariti tsentrifuugimise teel 30 minuti jooksul (4500 rpm, +4 °C) ning filtreeriti läbi 0,45 µm filtri.

2.2.5.4. Cbf5, Nop10 ja Gar1 valkude puhastamine

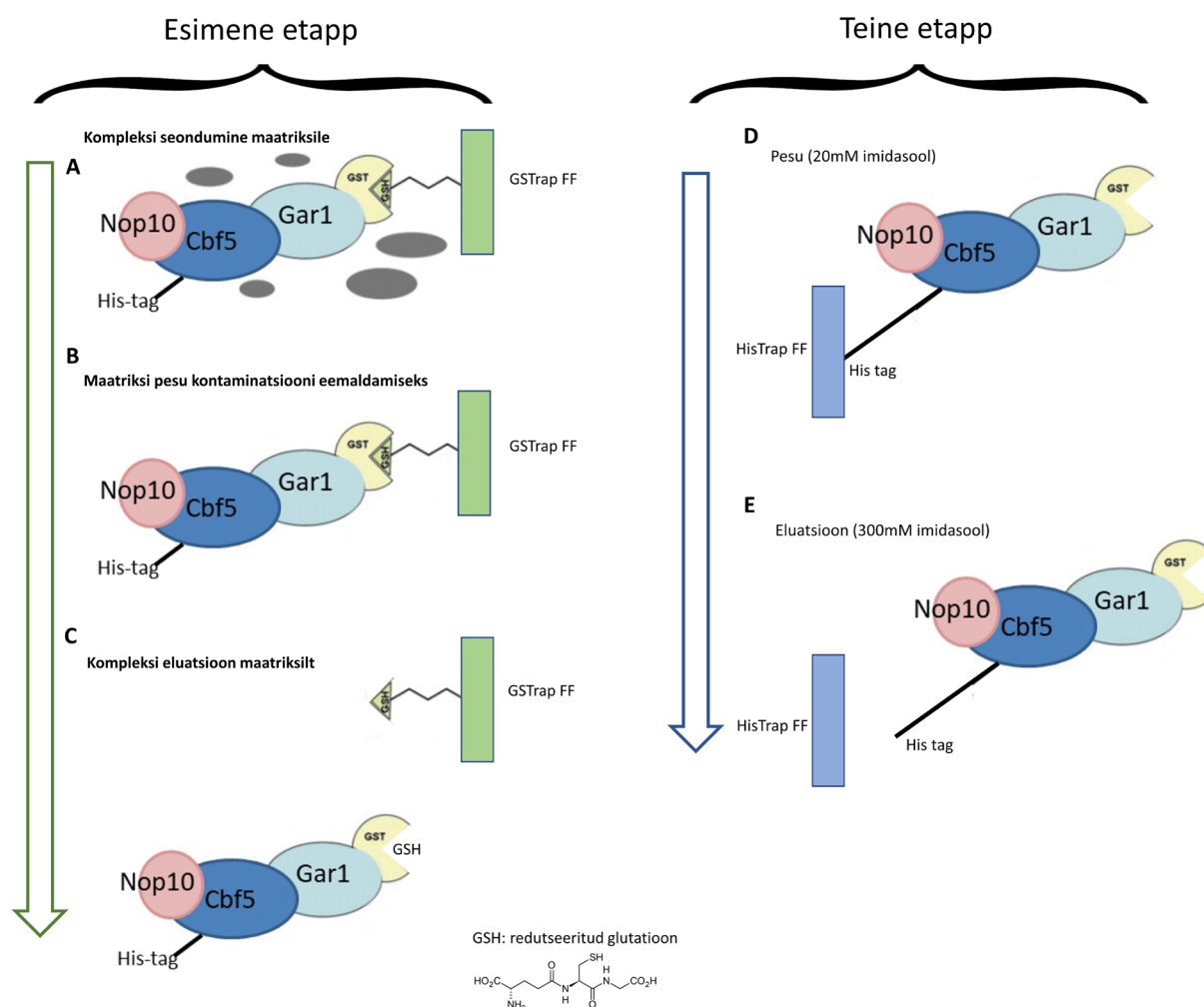
Cbf5, Nop10 ja Gar1 valgud puhastati aafiinsuskromatograafia abil kahes etapis kasutades vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) ja 1 ml aafiinsuskromatograafia kolonne GSTrap™ FF ja HisTrap™ FF (Cytiva) (Joonis 6).



Joonis 6. Kompleksi valkude väljapuhastamise skeem. Esimeses etapis kanti Cbf5 + Nop10 + Gar1 kompleksi sisaldav rakulüsaat GSTrap™ FF kolonnile. Kolonni pesti puhvriga A1 (Tabel 4), et vabaneda ebaspetsiifiliselt seondunud valkudest, ning kompleks elueeriti kolonnilt 10 mM glutatiooni (GSH) sisaldava puhvriga A2. Teises etapis kanti esimesest etapist saadud eluaat HisTrap™ FF kolonnile, kolonni pesti 20 mM imidasooli sisaldava puhvriga B1 ja kompleks elueeriti kolonnilt 300 mM imidasooli sisaldava puhvriga B2. Nhp2 valk puhastati teistest eraldi ühes etapis kasutades ainult HisTrap™ FF kolonni (joonisel 2. etapp).

Esmalt kanti klaaritud rakulüsaat GSTrap™ FF (Glutathione Sepharose Fast Flow) kolonnile, kus valgukompleks seoti Gar1 küljes oleva GST-liitvalgu märgise abil maatriksile (Joonis 7). Kolonni pesti puhvriga A1 kolonniga ebaspetsiifiliselt seondunud valkudest lahti saamiseks ja kompleks elueeriti kolonnilt puhvriga A2 vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

Esimesest etapist saadud eluaat kanti HisTrap™ FF kolonnile ning valgukompleks seoti Cbf5 küljes oleva His-märgise abil maatriksile. Kolonni pesti puhvriga B1, et eemaldada kolonnile mittespetsiifiliselt seondunud materjal, eesmärgiga saada võimalikult puhas valgukompleks. Kompleks elueeriti kolonnilt puhvriga B2. Puhastamine viidi läbi vastavalt kolonnitootja juhistele.



Joonis 7. Kaheetapilise afiinsuskromatograafia põhimõte. Esimeses valgupuhastusetapis (paneelid A, B ja C) seotakse kolmest valgust (joonisel Cbf5 tumesiniselt, Nop10 roosalt ja Gar1 helesiniselt) koosnev kompleks GSTrap FF kolonnile Gar1 küljes oleva GST valgu (joonisel kollaselt) kaudu ning kolonni pestakse kontaminatsiooni (joonisel tähistatud hallilt) eemaldamiseks. Kolonni maatriksile on immobiliseeritud glutatioon (GSH, joonisel roheline kolmnurk). Kompleksi eluatsioon maatriksilt toimub läbi redutseeritud glutatiooni lisamise puhvriss, misjärel vaba glutatioon seondub valgukompleksiga ja kompleks vabaneb. Teises etapis (paneelid D ja E) valgukompleks seondub Cbf5 küljes oleva His-märgise kaudu kolonnile. Peale kolonni pesemist 20 mM imidasooli sisaldava puhvriga elueeritakse valgukompleks 300 mM imidasooli lisamisega.

Afiinsuskromatograafia abil puhastatud valkude fraktsioonid analüüsiti SDS-PAA geelil lahutades valgud elektriväljas ning värvides *Coomassie Brilliant Blue* R-250-ga. Et tuvastada Nop10 olemasolu teostati eraldi geelile hõbenitraadiga värvimine. Käesoleva töö raames valkude kontsentratsiooni ei mõõdetud, esialgseks eesmärgiks oli veenduda, kas kõik vajalikud valgud on olemas.

Kaheetapilise afiinsuskromatograafia abil puhastatud kompleksi valgud (Cbf5, Nop10 ja Gar1) segati glütserooliga suhtes 1:1, alikvooditi 5 µl kaupa ja säilitati -80 °C juures edasisteks pseuouridüleerimise katseteks.

2.2.5.5. Hõbenitraadiga värvimine

Valgud lahutati 12% SDS-PAA geelil elektriväljas nagu käesoleva töö punktis 2.2.5.1. Geel inkubeeriti 30% etanooli ja 10% äädikhappe lahuses toatemperatuuril üleöö, misjärel vahetati lahus uue vastu ning inkubeeriti veel 1 h. Geel loputati 20% etanoolis 2 x 10 minutit. Seejärel inkubeeriti geeli 0,02% naatriumtiosulfaadi ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) lahuses 1 minut. Geel loputati MQ vees kaks korda (2 x 1 min) ning immutati hõbenitraadi (AgNO_3) lahuses (f.c. 12 mM) 2 h.

Peale hõbentraadiga immutamist loputati geeli MQ vees (1 min) ning seejärel inkubeeriti ilmutuslahuses (3% Na_2CO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,01% formaldehüüd) 45 minutit. Ilmutusreaktsioon peatamiseks hoiti geeli lahuses, mis sisaldas 4% Tris ja 2% äädikhapet 30 minutit. Seejärel inkubeeriti geeli MQ vees 2 x 30 minutit, misjärel geel pildistati üles.

2.2.5.6. Nhp2 valgu puhastamine

Nhp2 valk, mille küljes oli His-märgis puhastati afiinsuskromatograafia abil, samamoodi nagu ülalkirjeldatud valkude puhastamise teises etapis (Joonised 6 ja 7) kasutades vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) ja 1 ml afiinsuskromatograafia kolonni HisTrap™ FF (Cytiva). Erinevalt eelnevalt puhastatud valgukompleksist, kasutati Nhp2 puhastamisel puhvreid C2 (kolonni pesuks) ja C3 (valgu elueerimiseks kolonnilt) (Tabel 4).

Puhastatud Nhp2 fraktsioonid analüüsiti SDS-PAA geelil lahutades valgud elektriväljas ning värvides *Coomassie Brilliant Blue* R-250-ga. Puhastatud valk segati glütserooliga

suhtes 1:1, alikvooditi 5 µl kaupa ja säilitati -80 °C juures edasisteks pseuouridüleerimise katseteks. Käesoleva töö raames Nhp2 kontsentratsiooni ei mõõdetud.

2.2.6. H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi giid-RNA ja kompleksi substraat-RNA transkribeerimine

Giid-RNA (snR5 H/ACA *box small nucleolar* RNA) ja substraat-RNA (25S heeliks 38 rRNA) (Tabel 5) sünteesimiseks viidi läbi *in vitro* transkriptsioon matriits-DNA-lt kasutades T7 polümeraasi. Matriits-DNA konstruktid on meid huvitav järjestus bakteriofaag T7 promootori kontrolli all. DNA konstruktid olid varem valmistatud Margus Leppiku poolt.

Esialgu teostati transkriptsioon lineariseeritud plasmiidilt, hiljem kasutati transkriptsiooniks samadelt plasmiididelt PCR-iga tehtud substraati.

2.2.6.1. DNA ettevalmistus RNA transkriptsiooniks

Plasmiidse DNA paljundamine

RNA transkriptsiooni läbiviimiseks paljundati plasmiidset-DNAd (mis vastavalt sisaldas giid-RNA matriitsi või substraat-RNA matriitsi järjestust) (Tabel 2). Selleks transformeeriti Margus Leppiku konstrueeritud plasmiidid *E. coli* DH5α tüvesse (Tabel 1) kasutades varem käesoleva töö peatükis 2.2.5.7. kirjeldatud *heat-shock* meetodit. Tardsöötmel saadud üksikkolooniast kasvatati rakke lõppmahus 250 ml sarnaselt peatükile 2.2.5.7. kuni OD₆₀₀ ≈ 2. Rakud lüüsi ja plasmiidne DNA eraldati FavorPrep *Plasmid DNA Extraction Maxi Kit*-iga vastavalt tootja ettenähtud protokollile.

Töö käigus kasutati RNA transkriptsioonil (nii giid-RNA kui substraat-RNA puhul) DNA matriitsina ka PCR produkti, kus PCR substraadina kasutati ülalpuhastatud plasmiidset DNA-d.

DNA amplifitseerimine PCR meetodil

PCR reaktsioonid viidi läbi kasutades termotsüklerit Mastercycler nexus (Eppendorf). Reaktsioonis kasutati *Taq* DNA polümeraasi (1 U ensüümi 50 µl reaktsioonimahu kohta) selleks ette nähtud puhvris (Tabel 4). 50 µl PCR reaktsioonisegu sisaldas plasmiidset DNA-d (f.c. 0,1 ng/µl), dNTP-d (f.c. 200 µM iga desoksünukleotiidi kohta), DIR ja REV praimereid vastavalt tabelile 5 (f.c. 0,5 µM iga praimeri kohta), MgCl₂ (f.c. 1,5 mM). Reaktsioon viidi läbi tabelis 6 kirjeldatud tingimustel. Saadud PCR produktid puhastati

kasutades *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-i vastavalt tootja protokollile. DNA produktid valideeriti suuruse järgi 2% agarosgeelil, kasutades suurusmarkerina GeneRuler 100 bp Plus. Proovide visualiseerimiseks kasutati nukleiinhappega seondunud etiidiumbromiidi fluoretsentsi ultraviolettkiirguse juuresolekul. Lõplikuks valideerimiseks kontrolliti saadud PCR produktid sekveneerimise teel (TÜ genoomika instituudi tuumiklabor).

Tabel 6. PCR reaktsiooni tingimused

Etapp	Nimetus	Temperatuur	Aeg (s)	Tsüklite arv
1.	Esialgne denaturatsioon	+95 °C	120	1
2.	Denaturatsioon	+95 °C	40	31
3.	Praimerite seondumine	+60 °C	40	
4.	Elongatsioon	+72 °C	60	
5.	Lõplik elongatsioon	+72 °C	300	1

Plasmiidse DNA lineariseerimine ja fenool-kloroform töötlus

RNA sünteesiks vajalikku matriitsjärjestust sisaldav plasmiidne DNA sisaldas endonukleas BamHI lõikejärjestust, mida kasutati plasmiidi lineariseerimiseks vastavalt endonukleasi tootja soovitatud protokollile.

Et lahti saada DNA puhastamise käigus lisatud RNAasist viidi läbi lineariseeritud plasmiidsele DNA-le fenool-kloroformtöötlus. Selleks lisati lahusele võrdne maht fenooli ja kloroformi segu (pH 7,5) ja segati intensiivselt. Faaside eraldamiseks tsentrifuugiti segu toatemperatuuril (5 min, 13000 rpm) ja vesifaas tõsteti uude tuubi. Protsessi korrati ning seejärel lisati DNA sadestamiseks lahusele 2,5 mahtu etanooli (96%) ja segu hoiti -80 °C juures 30 minutit ning seejärel tsentrifuugiti (+4 °C, 10 min, 13000 rpm). Sademelt eemaldati etanool, misjärel sade pesti 80% etanooliga ja tsentrifuugiti veel 5 minutit. Pesuks kasutatud etanool eemaldati ning DNA sade kuivatati täielikuks etanooli eemaldamiseks +37 °C juures 10 minutit ning resuspendeeriti 50 µl MQ vees. Nukleiinhappe kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriselt lainepikkusel 260 nm kasutades analüsaatorit NanoDrop (Thermo Fisher).

2.2.6.2. RNA transkriptsioonireaktsioon

RNA transkriptsiooniks kasutati varem molekulaarbioloogia laboris Ivan Kisly poolt optimeeritud protokoll (Joonis 8). 50 µl reaktsioonisegu kohta võeti 1 µg matriits-DNA-d.

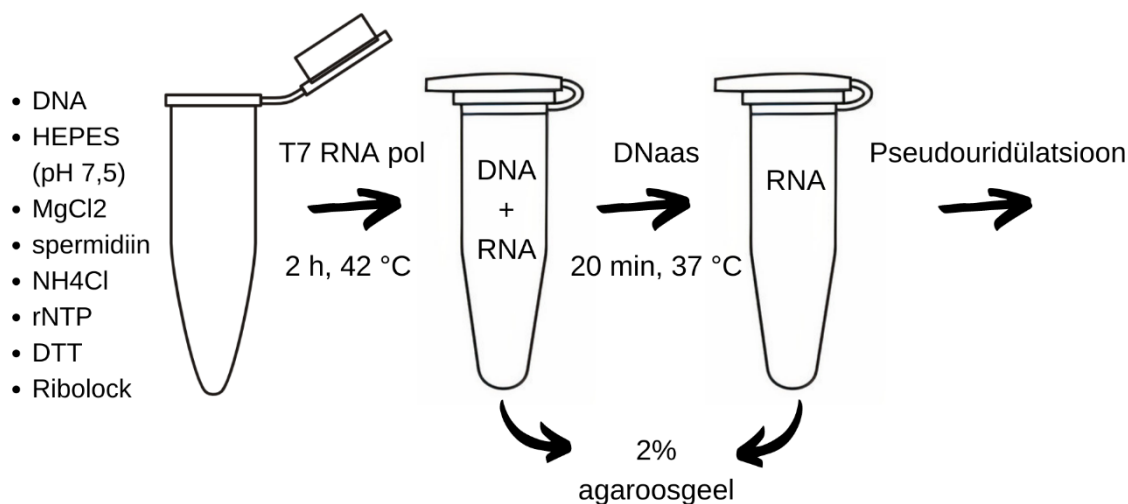
Reaktsioonisegu sisaldas transkriptsioonipuhvrit (tabel 4), rNTP-d (f.c. 3,75 mM iga ribonukleotiidi kohta), NH₄Cl (f.c. 50 mM), 40 U RNAasi inhibiitorit Ribolock ning 250 U T7 polümeraasi. Reaktsioon viidi läbi temperatuuril +42 °C 2h jooksul. Reaktsioonisegust võeti proov hilisemaks analüüsimiseks agarosgeelil.

RNA transkriptsioonireaktsioon substraat-RNA triitiumiga märkimiseks

Triitiumiga märgitud substraat-RNA saamiseks viidi läbi transkriptsioonireaktsioon samadel tingimustel nagu eelnevalt kirjeldatud lõigus. Lisaks ülalmainitud komponentidele (sh märkimata uridiintrifosfaat) lisati reaktsioonisegusse 5. positsioonist triitiumiga märgitud 50 µl uridiintrifosfaati. Puhastatud RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 260 nm kasutades ühekordseid küvette ning analüsaatorit BioPhotometer (Eppendorf). Triitiumiga märgitud uridiintrifosfaadi ja väljapuhastatud substraat-RNA radioaktiivsuse hindamiseks lisati proovidele 5 ml sintsilatsioonisegu *Optiphase Hisafe 3 (PerkinElmer)* ja radioaktiivsus mõõdeti sintsilatsioonianalüsaatoriga *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer*.

2.2.6.3. DNAasi reaktsioon

RNA transkriptsioonijärgselt lisati segusse 10 U DNAasi 50 µl kohta ning reaktsioonisegu inkubeeriti +37 °C juures 20 minutit. Reaktsioonisegust võeti proov ning analüüsiti koos eelnevas etapis võetud prooviga. RNA produktid valideeriti suuruse järgi 2% agarosgeelil, kasutades suurusmarkerina GeneRuler 100 bp Plus. Proovide visualiseerimiseks kasutati nukleiinhappega seondunud etiidiumbromiidi fluoresentsi ultraviolettkiirguse juuresolekul.



Joonis 8. RNA transkriptsiooniskeem. Kasutades DNA-matriitsi, sünteesitakse T7 polümeraasiga RNA järjestus, misjärel eemaldatakse DNAasi abil matriits-DNA. Nii enne DNAasi töötlust reaktsioonisegust võetud proovi kui DNAasiga töödeldud proovi hinnati 2% agarosgeelil.

2.2.6.4. RNA transkriptsioonijärgne puhastamine

Eelnevas etapis transkribeeritud RNA puhastati enne pseudouridüleerimist *RNeasy Kit*-iga (QIAGEN) vastavalt tootja protokollile ja nukleiinhappe kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 260 nm kasutades analüsaatorit NanoDrop (Thermo Fisher).

2.2.7. Valgukompleksi aktiivsuse kontroll

Valgukompleksi aktiivsuse kontrolliks kasutati puhastatud H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valke ning giid-RNA-d, et pseudouridüleerida substraat-RNA.

2.2.7.1. H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi moodustamine

GiidRNA voltumine

snR5 snoRNA (giid-RNA) korrektseks voltumiseks viidi 5 µg transkribeeritud ja puhastatud produkti 380 ml voltumispuhvrise (giid-RNA voltumispuhver) (Tabel 4). Lahuse temperatuur tõsteti +65 °C ning lasti aeglaselt (3h jooksul vesivannis) jahtuda +30 °C juurde.

Kompleksi moodustamine

Voltunud giid-RNA lahusele lisati 10 µl eelnevalt puhastatud Cbf5, Nop10 ja Gar1 valkude segu ning 10 µl Nhp2 valku ning inkubeeriti H/ACA RNP kompleksi moodustamiseks +30 °C juures 10 minutit.

2.2.7.2. Pseudouridülatsioonireaktsioon

5 µg triitiumiga märgitud uridiine sisaldav substraat RNA viidi 400 µl puhvrissi (substraat-RNA puhver) (Tabel 4) ning inkubeeriti +30 °C juures 10 minutit temperatuuri ühtlustamiseks enne pseudouridülatsioonireaktsiooni.

Reaktsiooni läbiviimiseks segati 400 µl lahust (eelinkubeeritud H/ACA RNP valgud ja giid-RNA) kokku 400 µl eelinkubeeritud substraat-RNA-ga. Kahe lahuse segunemisel saavutati pseudouridülatsiooniks vajalik puhver (pseudouridülatsioonipuhver) (Tabel 4).

Pseudouridülatsioonireaktsioon viidi läbi +37 °C juures 60 minuti jooksul ning reaktsiooni käigus võeti ajapunkte: 5 min, 10 min, 20 min, 30 min ja 60 min juures võeti reaktsioonisegust 100 µl proov, kus reaktsioon peatati 1 ml 5% aktiivsöe vesilahuse (sisaldab f.c. 100 mM HCl) lisamisega. Proovid segati väristajal 10 minutit reaktsioonis osalenud komponentide absorbeerimiseks. Seejärel materjal tsentrifuugiti (13k rpm, 10 min) ja aktiivsöe kontaminatsiooni vältimiseks supernatant tsentrifuugiti uuesti (13k rpm, 10 min). Klaaritud supernatandile (1 ml) lisati 5 ml sintsilatsioonisegu *Optiphase Hisafe 3* (PerkinElmer) ja radioaktiivsus mõõdeti sintsilatsioonianalüsaatoriga *PerkinElmer Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer*.

Lisaks pseudouridülatsioonireaktsioonile viidi paralleelselt läbi kaks kontrollreaktsiooni, kus reaktsioonisegust puudus vastavalt giid-RNA või H/ACA RNP kompleksi valgud, mis asendati kontrollreaktsioonides puhvriga.

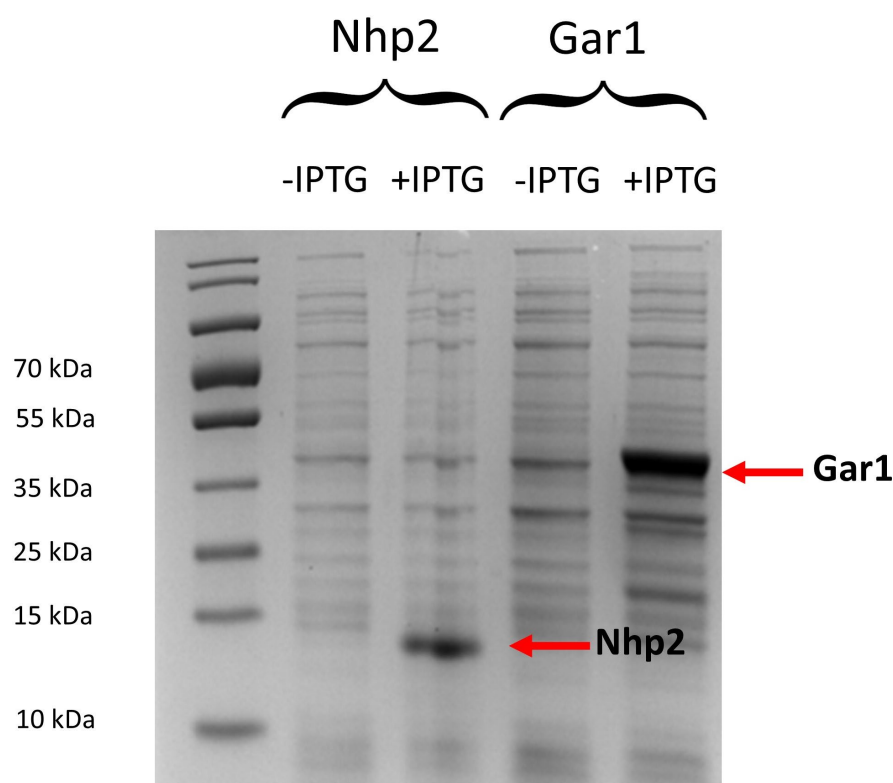
2.3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli välja puhastada eukarüootse H/ACA ribonukleoproteiinkompleksi valgud vastavalt varem kirjanduses avaldatud meetodile (Caton et al., 2018) ning kontrollida kompleksi aktiivsust *in vitro* transkribeeritud giid-RNA-d ja substraat RNA-d kasutades. Töö käigus selgus, et täpselt samasugust valgupuhastamise protokoll ei õnnestu rakendada, kuna info meetodi kohta on varasemalt avaldatud kirjanduses puudulik. Käesoleva bakalaureusetöö juhendaja Ermo Leuska koostöös enda doktoritöö juhendaja Margus Leppikuga olid varasemalt alustanud eksperimendi ülesseadmist ning proovinud *Saccharomyces cerevisiae* H/ACA RNP rekombinantsete valkude üleekspressiooni *E. coli*-s, kasutades Margus Leppiku poolt konstrueeritud ekspressioonivektoreid. Käesolevas töös kasutati valguekspressiooniks kingitusena saadud koodon-optimeeritud gene sisaldavaid ekspressioonivektoreid. Nhp2 ja Gar1 puhul sobisid esialgselt valitud tingimused (+37 °C, 2h), kuid katalüütilise valgu Cbf5 puhul oli vajalik ekspressioonitingimuste optimeerimine.

2.3.1. Nhp2 ja Gar1 valkude ekspressioon

Rekombinantsete *S. cerevisiae* valkude Nhp2 ja Gar1 ekspressioon viidi läbi käesoleva töö meetodites kirjeldatud tingimustel (punkt 2.2.5.1). Enne suures mahus valkude puhastamist teostati eelkatse ekspressiooni hindamiseks. Selleks lahutati *E. coli* rakkudes leiduvad valgud elektriväljas SDS-PAA geelil, mis näitas selgesti, et induktori IPTG juuresolekul on rakkudes üleekspreseeritud vastavalt Nhp2 või Gar1 (Joonis 9). Geelile lisatud suurusmarkeri järgi oli võimalik hinnata, et ekspresseeritavad valkude suurus on vastavuses nende teadaolevate molekulmassidega (käesoleva töö punkt 1.3.1).

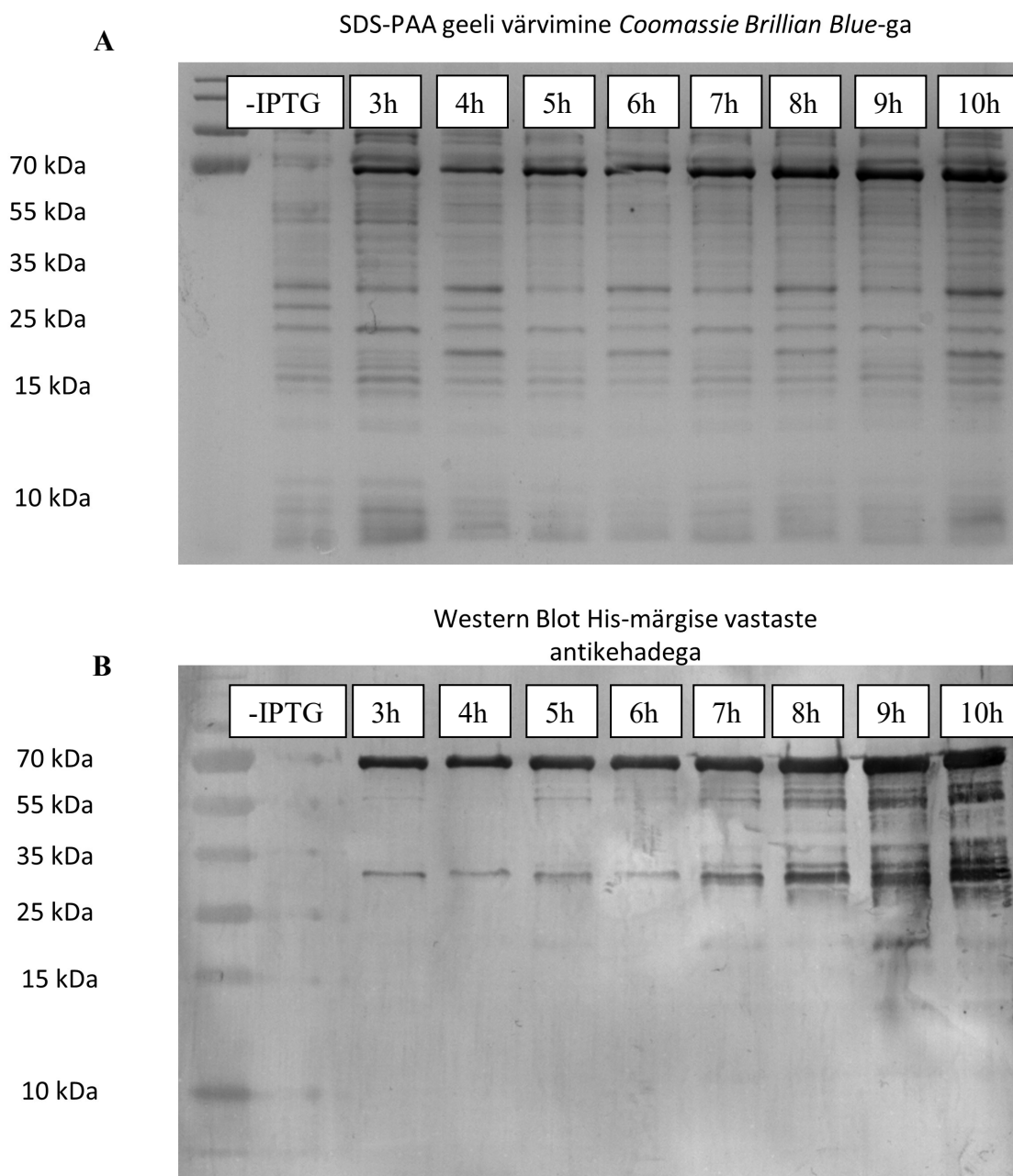
Plasmiididesse sisse viidud vastavate valkude geenijärjestused olid bakteriofaag T7 kontrolli all, mis tagab selle, et rakkude tavapärase elutegevuse käigus neid valke ei ekspresseerita. Kui rekombinantsed valgud oleksid konstitutiivse promootori all, siis oleks see rakkudele lisastressi tekitajaks ja suure tõenäosusega üleekspressioon ei õnnestuks. Valitud *E. coli* ekspresioonitüvedes (Tabel 1) on kromosoomi sisse viidud *lac* promootori alla bakteriofaag T7 polümeraasi geen. Sünteetilise laktoosi analoogi, IPTG lisamisega kasvukeskonda *E. coli* eksponentsiaalses kasvufaasis käivitatakse kromosoomilt T7 polümeraasi mRNA transkriptsioon ja ribosoomides sünteesitakse ensüüm. T7 polümeraas tunneb *E. coli* rakus ära sisseviidud plasmiidil oleva T7 promootorjärjestuse ja saab toimuda meid huvitavate valkude üleekspressioon. Vastavalt geelile kantud materjalile (Joonis 9) on selgelt näha, et ilma IPTG lisamiseta antud rakkudes vastava valgu ekspressiooni ei ole.



Joonis 9. Nhp2 ja Gar1 valkude ekspressioon. SDS-PAA geeli pilt, kus esimesel rajal on suurusmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) ning teisel ja kolmandal rajal on geelile kantud totaalne *E. coli* rakulüsaat rakkudest, mis kandsid NHP2 geenijärjestust sisaldavat plasmidi. Kolmandal rajal on punase noolega näidatud Nhp2 asukoht valgugeelis. Geeli neljandal ja viiendal rajal on geelile kantud totaalne *E. coli* rakulüsaat rakkudest, mis kandsid GAR1 geenijärjestust sisaldavat plasmidi. Viiendal rajal on punase noolega näidatud Gar1 asukoht valgugeelis. Mõlemal juhul ei ole ei ole näha geelil valguekspressiooni rakkudes, kuhu IPTG-d ei lisatud.

2.3.2. Cbf5 + Nop10 ekspressiooni optimeerimine

Varem on kirjandusest teada, et rekombinantsete *S. cerevisiae* valkude Cbf5 ja Nop10 ekspressiooni ei ole võimalik läbi viia +37 °C juures (Caton et al., 2018). On teada, et H/ACA RNP kompleksi kuuluv katalüütiline valk Cbf5 vajab prokarüootses süsteemis üleekspresseerimisel valgusünteesil korrektseks voltumiseks aega. Seepärast viidi valguekspressioon läbi temperatuuril +18 °C, et tagada produkti korrektne voltumine (punkt 2.2.5.1). Kuna polnud teada sobilik ekspressiooniaeg, siis viidi läbi eelkatse optimaalse aja leidmiseks. Lisaks temperatuurile on varasema kirjanduse põhjal oluline ka, et Cbf5 oleks üleekspresseeritud koos sama kompleksi valguga Nop10. Seepärast on ka ekspressioonivektor valitud selliselt, et ühelt vektorilt transkribeeritakse kaks geeni (Tabel 2).



Joonis 10. Cbf5 + Nop10 ekspressiooni hilisem optimeerimine ja Western Blot analüüs. Joonise paneelil A on SDS-PAA geeli pilt, kus esimesel rajal on suurusmarker ning teisel rajal on geelile kantud totaalne *E. coli* rakulüsaat rakkudest, mis kandsid Cbf5 ja Nop10 geenide järjestust plasmiidil, kuid kuhu ei olnud kasvukeskonda lisatud IPTG-d. Radadel 3-10 on näha ajapunktid IPTG lisamise järgselt vastavalt 3h - 10h. Suurusmarkeri 70 kDa piirkonnas on näha Cbf5 valgu üleekspressioon. Joonise paneelil B on sama geeli kasutades tehtud Western Blot analüüs His-märgise vastase antikehadega, millelt on näha Cbf5 ekspressioon suurusmarkeri 70 kDa piirkonnas ning Cbf5 lagunemine suurusmarkeri 25 kDa ja 35 kDa piirkonnas.

SDS PAA geelipiltidelt tulemusi analüüsides on oluline mõista, et Cbf5 ja Nop10 ei ole liitvalk, vaid tegu on kahe eraldiseisva valguga, mis on omavahel rakkudes kompleksis. Enne geelile kandmist valgud denatureeritakse ja kompleks laguneb, mistõttu peaks olema näha kahte erinevat valku. Nop10 on niivõrd väike valk, et jääb tavapärase *Coomassie Brilliant Blue* värvimisega varju. Et hinnata Nop10 olemasolu kompleksis viidi kompleksi puhastamise järgselt läbi SDS-PAA geeli värvimine hõbenitraadiga (käesoleva töö punkt 2.5.5.2) (Joonis 11).

Oluline tähelepanek seoses Cbf5 valgu lahutamisega elektriväljal SDS-PAA geelil on see, et kuigi varasemalt on teada, et Cbf5 molekulmass on ~55 kDa (käesoleva töö punkt 1.3.1), siis nii käesolevas töös kui varasemalt kirjanduses on näidatud, et Cbf5 asub valgugeelis suurusmarkeri 70 kDa piirkonnas. Seda võib põhjustada valgu suhteliselt kõrge isoelektriline punkt (pI), mille puhul on teada, et valgud liiguvad elektriväljas aeglasemalt.

Sobiva Cbf5 ekspressioonija leidmiseks kasvatati rakke käesolevas töös kirjeldatud meetodil ja võeti ajapunktid vastavalt 3h, 6h, 9h ja 18h järel pärast IPTG lisamist (Lisa 1).

Kuna antud katse järgi ei olnud võimalik hinnata Cbf5 võimalikku lagunemist pika ekspressioonija korral, siis korrati katset võttes tihedamalt ajapunkte (3h – 10 h) ning lisaks varasemalt teostatud *Coomassie Brilliant Blue*-ga värvimisele teostati ka valguekspressiooni analüüs Western Blot meetodil, kasutades His-märgise vastaseid antikehi, sest Cbf5 valgule oli afiinsuskromatograafia läbiviimiseks lisatud His-märgis (punkt 2.2.5.2) (Joonis 10).

Eelkirjeldatud tingimuste optimeerimise katse analüüsiga valiti edasiseks sobilikuks ekspressioonijaks 9 h. Hinnati, et lühema ekspressioonija puhul on küll Cbf5 lagunemine väiksem, kuid samas on ka valgusaagis väiksem.

2.3.3. H/ACA RNP kompleksi valkude puhastamine afiinsuskromatograafia meetoditega

Vastavalt eelkirjeldatud eelkatsetele ekspresseeriti H/ACA RNP kompleksi valke leitud optimaalsetel tingimustel suures mahus. Valkude väljapuhastamiseks kasutati Cbf5 küljes olevat His-märgist, Gar1 küljes olevat GST-märgist ja Nhp2 küljes olevat His-märgist. Nop10 küljes ei olnud ühtegi afiinsuskromatograafia märgist, vaid see puhastus Cbf5-Nop10-Gar1 kompleksina.

Nhp2 puhastamine

Valkude puhastamine viidi läbi Nhp2 puhul ühes etapis vastavalt käesoleva töö punktile 2.2.5.6. Nhp2 valk seoti Ni^{2+} metalliioone sisaldava maatriksi külge. Maatriksile ebaspetsiifiliselt seondnud kontaminatsioonist lahti saamiseks pesti maatriksit madala imidasooli kontsentratsiooniga lahusega, kuna imidasool konkureerib His-märgisega arvestades Ni^{2+} metallioonide afiinsust. Tõstes imidasooli kontsentratsiooni lahuses kõrgemale, konkureeris imidasool seondnud valgu täielikult välja ja eluaat koguti fraktsioonidena ning analüüsiti SDS-PAA geelil värvides valgud *Coomassie Brilliant Blue* abil (Lisa 2).

Cbf5, Nop10 ja Gar1 puhastamine

H/ACA kompleksi valkude Cbf5, Nop10 ja Gar1 puhul viidi läbi kaheetapiline afiinsuskromatograafia vastavalt käesoleva töö punktile 2.2.5.4. Cbf5 ja Nop10 valke ekspresseerivad rakud segati enne lüüsi Gar1 ekspresseerivate valkudega ning enne afiinsuskromatograafia esimest etappi teostati klaaritud rakulüsaadile 1h jooksul inkubatsioon, et võimaldada valgukompleksi moodustamine.

Afiinsuskromatograafia esimeses etapis seoti valgukompleks Gar1 küljes oleva GST-märgise abil maatriksile, kuhu oli immobiliseeritud glutatioon, mis tagab afiinsuse. Kompleks elueeriti redutseeritud glutatiooni lisamisega puhvriss, mis konkureerib maatriksis asuva glutatiooniga. Eluaat koguti fraktsioonide kaupa ja analüüsiti SDS-PAA geelil värvides valgud *Coomassie Brilliant Blue* abil ja hõbenitraadiga (Lisa 3).

2.3.4. Pseudouridülatsiooniks vajalike RNA komponentide süntees

Käesoleva töö käigus teostati hulgaliselt RNA transkriptsioonireaktsioone, et leida edasiseks tööks vajaliku giid-RNA ja substraat-RNA sünteesi jaoks sobilikud tingimused. Esialgu kasutati matriitsina Margus Leppiku poolt konstrueeritud plasmide, mis enne transkriptsiooni lineariseeriti. Kuna RNA saagis plasmidset DNA-d kasutades oli madal, siis teostati kontrolliks RNA transkriptsioon PCR-i produktidelt. Selleks viidi käesoleva töö raames läbi PCR reaktsioonid nii giid-RNA kui ka substraat-RNA amplifitseerimiseks (punkt 2.2.6.1).

PCR-i produktidelt oli RNA transkriptsiooni efektiivus oluliselt kõrgem. Kasutades järjestusi, mis on bakterifaag T7 promootori kontrolli all viidi läbi *in vitro* RNA

transkriptsioon kasutades T7 RNA polümeraasi. Edukalt sünteesiti H/ACA RNP kompleksi aktiivsuse kontrollimiseks nii giid-RNA kui ka substraat-RNA (Lisa 4).

H/ACA RNP valkude aktiivsuse kontrolliks sünteesiti triitiumiga märgitud uridiinfosfaati kasutades radioaktiivne substraat-RNA. Töös kasutatud uridiintrifosfaat oli märgitud triitiumiga 5. positsioonist, mis annab võimaluse triitiumil vabaneneda lämmastikaluse isomerisatsiooni käigus (uridiin pseudouridiiniks (punkt 1.2.1, joonis 2)). Kirjeldatud triitiumi vabanemist kasutatakse töö järgmises osas valgukompleksi aktiivsuse hindamisel.

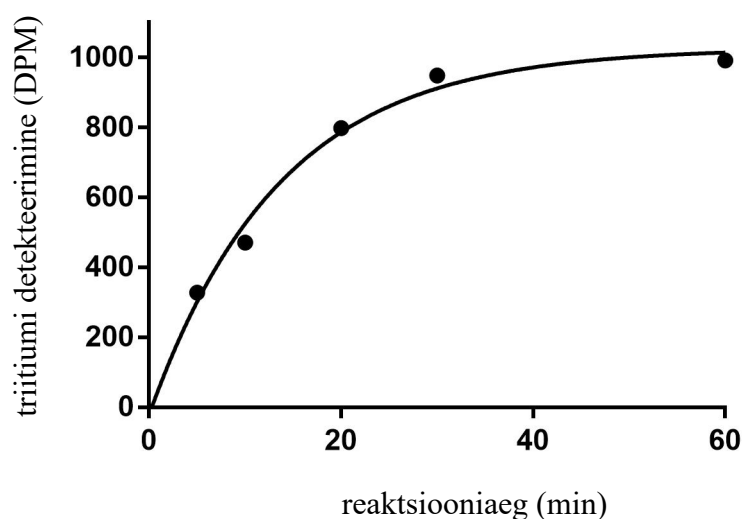
2.3.5. H/ACA RNP kompleksi valkude aktiivsuse hindamine

Eelnevates etappides puhastati edukalt välja eukarüootse H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud Cbf5, Nop10, Gar1 ja Nhp2, sealjuures kolm esimest on välja puhastatud kompleksina ning viimane eraldiseisvalt (Lisa 2 ja 3). Samuti transkribeeriti ning puhastati ribonukleoproteiin-kompleksi kuuluv giid-RNA ning pseudouridülatsiooni substraadina osalev RNA. Sealjuures substraat-RNA sünteesiti triitiumiga märgitud uridiintrifosfaadi juuresolekul, et käesolevas etapis hinnata pseudouridülatsioonireaktsioonis osalevate valkude aktiivsust.

Kompleksi valkude aktiivsuse hindamiseks (punkt 2.2.7) loodi katseskeem, kus võeti arvesse, et sünteesitud giid-RNA ei ole sünteesijärgselt korrektselt voltunud. Selleks teostati varasema kirjanduse põhjal (Caton et al., 2018) giid-RNA voltumine ning lisati käesolevas töös väljapuhastatud valgud, et moodustuks H/ACA RNP kompleks. Kuna antud bakalaureusetöö käigus ei hinnatud väljapuhastatud valkude kontsentratsiooni, vaid sooviti esialgu üldisemalt hinnata valkude aktiivsust, siis on edaspidi vajalik kirjeldatud pseudouridüleerimisreaktsiooni kindlasti optimeerida. Reaktsioon viidi läbi triitiumiga märgitud substraat-RNA juuresolekul 5 min – 60 min jooksul.

Reaktsioonisegust võeti erinevatel ajapunktidel proove ning reaktsioonisegus osalevad komponendid seoti absorbeeriva materjaliga (aktiivsüsi), et kindlustada radioaktiivse signaali päritolu reaktsiooni käigus vabanenud triitiumist.

Reaktsiooni käigus vabanenud triitiumi hulk mõõdeti ning saadud andmete põhjal (Lisa 5) arvutati programmis *Graphpad Prism* (tootja *GraphPad Software, Inc.*) reaktsiooni ajakõver (Joonis 12). Käesoleva bakalaureusetöö käigus ei mõõdetud pseudouridülatsioonireaktsiooni kineetikat, kuid edaspidi optimeeritud tingimusi kasutades on see uurimisrühmal plaanis.



Joonis 12. Triitiumi vabanemise ajakõver, kasutades pseudouridülatsioonireaktsioonil H/ACA RNP kompleksi. Graafikul on näidatud viiel ajapunktil võetud proovid (5 min – 60 min) pseudouridülatsioonireaktsioonist, mis viidi läbi käesolevas töös välja puhastatud H/ACA RNP kompleksi valkudega. Graafiku X-teljel on reaktsiooniaeg minutites ning Y-teljel triitiumi detekteerimine (DPM) proovidest, millest on absorbeeritud reaktsioonis osalenud komponendid.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus ei hinnatud reaktsioonis osalenud RNA ja valkude hulka, vaid sooviti näidata eukarüootse H/ACA ribonukleoproteiini valkude aktiivsust. Edaspidistes katsetes on plaanis täpsemalt hinnata toimunud uridiini isomerisatsioonireaktsiooni efektiivsust, vastavalt potentsiaalsete sihtmärkide arvule ning RNA kogusele. Samuti tuleb hinnata lisatud valkude stöhhiomeetrilist kogust, mida käesoleva töö raames ei tehtud.

Tuleb arvesse võtta, et läbi viidud H/ACA RNP kompleksi moodustumisel ei pruukinud giid-RNA 100% efektiivsusega korrektselt voltuda ning ei ole täpselt teada, kas läbi viidud pseudouridülatsioonireaktsiooni efektiivsus on piisavalt kõrge. H/ACA RNP kompleksi valkude aktiivsuse hindamise katset viidi läbi bakalaureusetöös kirjeldatud substraadiga kaks korda.

Kuigi vastavalt varem teadaolevale kirjandusele viivad eukarüootsetes rakkudes koht-spetsiifilisi pseudouridüleerimisreaktsioone läbi nn *stand-alone* ensüümid, on H/ACA RNP kompleksi kasutamisel suur roll *in vitro* modifikatsioonide sisse viimisel huvipakkuvatesse sihtmärk-RNA-desse. Eelkõige on käesoleva bakalaureusetöö käigus välja puhastatud kompleksi valgud suure potentsiaaliga eukarüootse mRNA modifikatsioonide uurimisel, sest

head tööriista koht-spetsiifiliselt pseudouridiinide sisestamiseks senini ei ole. Nagu selle töö kirjanduse osas mainitud, on suhteliselt hiljuti avastatud mRNA-s sisalduvate pseudouridiinide roll senini ebaselge ja tänaseks avaldatud teadustööd on keskendunud mõne üksiku kindla modifikatsiooni asukohale (nt stoppkoodon) või siis läinud substraat-RNA totaalse pseudouridüleerimise teed. Kasutades pseudouridüleerimiseks H/ACA RNP kompleksi on võimalik väga spetsiifiliselt uurida pseudouridiinide rolli erinevates RNA molekulides *in vitro*. Antud töös jõuti välja puhastatud valgukompleksi aktiivsuse hindamise esimesse etappi kasutades substraadina lühikest osa 25S rRNA-st. Järgmises etapis on töögrupil plaanis kasutada looduslike giid-RNA-de kunstlikke analooge ning huvipakkuvaid substraate pseudouridiinide rolli selgitamiseks.

Lisaks mainitud mRNA pseudouridiinidele pakub väga suurt teaduslikku huvi ka mitmete looduslike reguleerivate RNA-de roll ja nende potentsiaalne modifikatsioonimuster. Kasutades H/ACA RNP kompleksi tööriistana, et sisse viia *in vitro* huvipakkuvaid modifikatsioone erinevatesse RNA molekulidesse, on võimalik tulevikus uurida keerulisi eluslooduse seaduspärasusi ning seeläbi kasutada modifikatsioonide potentsiaali ka meditsiinis.

Bakalaureusetöös püstitatud hüpoteesi kontrollimiseks puhastati *Saccharomyces cerevisiae*-st pärit H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud ning transkribeeriti vajalikud RNA komponendid kasutades matriitsina nii lineariseeritud plasmide kui ka bakalaureusetöö käigus valmistatud PCR-i produkte. Tehtud eksperimentide põhjal saab väita, et H/ACA RNP kasutamine pseudouridülatsiooniks on suure potentsiaaliga, kuid katsesüsteem vajab veel optimeerimist.

KOKKUVÕTE

Looduslik RNA sisaldab modifikatsioone, sealhulgas pseudouridiine, mille roll ei ole veel lõplikult välja selgitatud. Selleks, et uurida pseudouridiinide bioloogilist tähendust, on tarvis neid *in vitro* huvipakkuvatesse RNA substraatidesse sisse viia. Kasutades eukarüootides ja arhedes levinud, kuid mitte peamist pseudouridülatsiooni läbi viivat süsteemi – giid-RNA juhtitud H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi vahendatud uridiini isomerisatsiooni pseudouridiiniks, oleks potentsiaalselt võimalik viia igasse huvipakkuvasse RNA molekuli koht-spetsiifiliselt vajalik modifikatsioon *in vitro*.

Käesoleva töö eesmärk oli puhastada välja H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud ja testida kompleksi aktiivsust *in vitro* pseudouridülatsioonil. Selleks optimeeriti valkude ekspressioon *E. coli* ekspressioonitüvedes, puhastati valgud tüvedest välja kasutades afiinsuskromatograafiat. Samuti sünteesiti kompleksi kuuluv giid-RNA ja pseudouridüleeritav substraat-RNA kasutades *in vitro* transkriptsiooni.

Bakalaureusetöö käigus tehtud katsete tulemusena oli võimalik formeerida H/ACA RNP kompleks ning läbi viia *in vitro* pseudouridülatsioon. Töö käigus puhastatud valkude aktiivsust hinnati triitiumi vabanemise järgi, kasutades reaktsiooni substraadina radioaktiivselt märgitud RNA-d.

Töö tulemusena kinnitati töö alguses püstitatud hüpotees, et bakalaureusetöö käigus optimeeritud tingimustel ekspresseeritud ja väljapuhastatud eukarüootse H/ACA ribonukleoproteiin-kompleksi valgud on aktiivsed antud töös läbi viidud pseudouridülatsiooni eksperimendis.

SUMMARY

Purification and evaluation of activity of the eukaryotic protein complex Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 by *in vitro* pseudouridylation

Eliise Haljas

Summary

Pseudouridine (Ψ) is the most abundant modification in RNA. The function of Ψ in different RNAs has been widely studied since its discovery in 1951. Ψ was discovered in mRNA in 2014, although its specific functions in mRNA are still relatively unknown.

Pseudouridine can be site-specifically synthesized using pseudouridine synthases (PUS), which can be either guide-RNA dependent or independent. The guide-RNA dependent H/ACA box ribonucleoprotein complex consists of snoRNA which acts as a guide, and four evolutionarily conserved proteins: Cbf5, Gar1, Nop10 and Nhp2. In this complex, Cbf5 is the catalytic enzyme. The functions of the other proteins are thought to help bind and release substrate-RNA (Gar1), take part in the stabilization and structural organization of Cbf5 (Nop10), and to assist the correct positioning of the target-uridine into the Cbf5 active site (Nhp2).

The aim of this thesis was to recombinantly express and purify the four proteins (originating from *Saccharomyces cerevisiae*) in *E. coli*. These proteins form the H/ACA ribonucleoprotein complex that carries out the pseudouridylation reaction. The aim was to test the activity of that complex.

In the experimental part of the thesis we purified the proteins of the complex from *Escherichia coli* cells using different methods of affinity chromatography. Additionally we synthesized the guide RNA and substrate RNA using *in vitro* transcription, and evaluated the activity of the complex during *in vitro* pseudouridylation reaction. The activity was assessed by the release of tritium using tritiated substrate-RNA.

The results of the experiments indicated that the purified H/ACA RNP complex proteins are active and carry out the pseudouridylation reaction. This complex can be used for mRNA site-specific pseudouridylation to further study the function of pseudouridines in mRNA.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adachi, H., De Zoysa, M. D., & Yu, Y.-T. (2019). Post-transcriptional pseudouridylation in mRNA as well as in some major types of noncoding RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), 230–239.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.11.002>
- Aitken, C. E., & Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 568–576.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2303>
- Bachellerie, J. P., Cavaillé, J., & Hüttenhofer, A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie*, 84(8), 775–790. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01402-5](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01402-5)
- Barrett, L., Fletcher, S., & Wilton, S. (2013). *Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements* (pp. 1–56). https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0679-4_1
- Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 703, 29–41. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_3
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 291–336.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>
- Boo, S. H., & Kim, Y. K. (2020). The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 400–408.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0407-z>
- Borbolis, F., & Syntichaki, P. (2015). Cytoplasmic mRNA turnover and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 152, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.09.006>
- Bortolin, M. L., Ganot, P., & Kiss, T. (1999). Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of

- ribosomal RNAs. *The EMBO Journal*, 18(2), 457–469.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.457>
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190, 576–581.
<https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Caton, E. A., Kelly, E. K., Kamalampeta, R., & Kothe, U. (2018). Efficient RNA pseudouridylation by eukaryotic H/ACA ribonucleoproteins requires high affinity binding and correct positioning of guide RNA. *Nucleic Acids Research*, 46(2), 905–916. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1167>
- Charette, M., & Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why. *IUBMB Life*, 49(5), 341–351. <https://doi.org/10.1080/152165400410182>
- Cobb, M. (2015). Who discovered messenger RNA? *Current Biology*, 25(13), R526–R532.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.032>
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258).
<https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Czekay, D. P., & Kothe, U. (2021). H/ACA Small Ribonucleoproteins: Structural and Functional Comparison Between Archaea and Eukaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.654370>
- Darzacq, X., Jády, B. E., Verheggen, C., Kiss, A. M., Bertrand, E., & Kiss, T. (2002). Cajal body-specific small nuclear RNAs: A novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *The EMBO Journal*, 21(11), 2746–2756.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2746>
- De Zoysa, M. D., Wu, G., Katz, R., & Yu, Y.-T. (2018). Guide-substrate base-pairing requirement for box H/ACA RNA-guided RNA pseudouridylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 24(8), 1106–1117. <https://doi.org/10.1261/rna.066837.118>

- De Zoysa, M. D., & Yu, Y.-T. (2017). Posttranscriptional RNA Pseudouridylation. *The Enzymes*, 41, 151–167. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.02.001>
- Dever, T. E., Dinman, J. D., & Green, R. (2018). Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(8), a032649. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649>
- Ding, Y., Tang, Y., Kwok, C. K., Zhang, Y., Bevilacqua, P. C., & Assmann, S. M. (2014). In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature*, 505(7485), 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature12756>
- Dolgin, E. (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 597(7876), 318–324. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
- Eyler, D. E., Franco, M. K., Batool, Z., Wu, M. Z., Dubuke, M. L., Dobosz-Bartoszek, M., Jones, J. D., Polikanov, Y. S., Roy, B., & Koutmou, K. S. (2019). Pseudouridylation of mRNA coding sequences alters translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(46), 23068–23074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821754116>
- Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., & Kiss, T. (1997). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes & Development*, 11(7), 941–956. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.941>
- Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W., & Watson, J. D. (1961). Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of Escherichia Coli. *Nature*, 190(4776), 581–585. <https://doi.org/10.1038/190581a0>
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>

- He, L., Li, H., Wu, A., Peng, Y., Shu, G., & Yin, G. (2019). Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 176.
<https://doi.org/10.1186/s12943-019-1109-9>
- Hellen, C. U. T. (2018). Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), a032656.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1413–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>
- Horstick, E. J., Jordan, D. C., Bergeron, S. A., Tabor, K. M., Serpe, M., Feldman, B., & Burgess, H. A. (2015). Increased functional protein expression using nucleotide sequence features enriched in highly expressed genes in zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv035>
- Jia, L., Mao, Y., Ji, Q., Dersh, D., Yewdell, J. W., & Qian, S.-B. (2020). Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0465-x>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165–175.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Kelly, E. K., Czekay, D. P., & Kothe, U. (2019). Base-pairing interactions between substrate RNA and H/ACA guide RNA modulate the kinetics of pseudouridylation, but not the affinity of substrate binding by H/ACA small nucleolar ribonucleoproteins. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(10), 1393–1404. <https://doi.org/10.1261/rna.071043.119>

- Kierzek, E., & Kierzek, R. (2003). The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines. *Nucleic Acids Research*, 31(15), 4472–4480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg633>
- Kiss, A. M., Jády, B. E., Bertrand, E., & Kiss, T. (2004). Human Box H/ACA Pseudouridylation Guide RNA Machinery. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 5797–5807. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5797-5807.2004>
- Kiss, A. M., Jády, B. E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E., & Kiss, T. (2002). A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Research*, 30(21), 4643–4649. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf592>
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., & Jády, B. E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Molecular Cell*, 37(5), 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.032>
- Křížek, M., & Křížek, P. (2012). Why has nature invented three stop codons of DNA and only one start codon? *Journal of Theoretical Biology*, 304, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.03.026>
- Kushner, S. R. (2004). mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: Different approaches to a similar problem. *IUBMB Life*, 56(10), 585–594. <https://doi.org/10.1080/15216540400022441>
- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>
- Li, G.-W., Oh, E., & Weissman, J. S. (2012). The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 484(7395), 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10965>
- Li, L., & Ye, K. (2006). Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature*, 443(7109), 302–307. <https://doi.org/10.1038/nature05151>

- Liang, B., Xue, S., Terns, R. M., Terns, M. P., & Li, H. (2007). Substrate RNA positioning in the archaeal H/ACA ribonucleoprotein complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(12), 1189–1195. <https://doi.org/10.1038/nsmb1336>
- Liang, B., Zhou, J., Kahen, E., Terns, R. M., Terns, M. P., & Li, H. (2009). Structure of a functional ribonucleoprotein pseudouridine synthase bound to a substrate RNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(7), 740–746. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1624>
- Lin, T.-Y., Mehta, R., & Glatt, S. (2021). Pseudouridines in RNAs: Switching atoms means shifting paradigms. *FEBS Letters*, *595*(18), 2310–2322. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14188>
- Mauger, D. M., Cabral, B. J., Presnyak, V., Su, S. V., Reid, D. W., Goodman, B., Link, K., Khatwani, N., Reynders, J., Moore, M. J., & McFadyen, I. J. (2019). mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(48), 24075–24083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908052116>
- McLaughlin, C. S., Warner, J. R., Edmonds, M., Nakazato, H., & Vaughan, M. H. (1973). Polyadenylic Acid Sequences in Yeast Messenger Ribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(4), 1466–1471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)44322-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44322-6)
- Morais, P., Adachi, H., & Yu, Y.-T. (2021). The Critical Contribution of Pseudouridine to mRNA COVID-19 Vaccines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.789427>
- Mortimer, S. A., Kidwell, M. A., & Doudna, J. A. (2014). Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nature Reviews Genetics*, *15*(7), 469–479. <https://doi.org/10.1038/nrg3681>

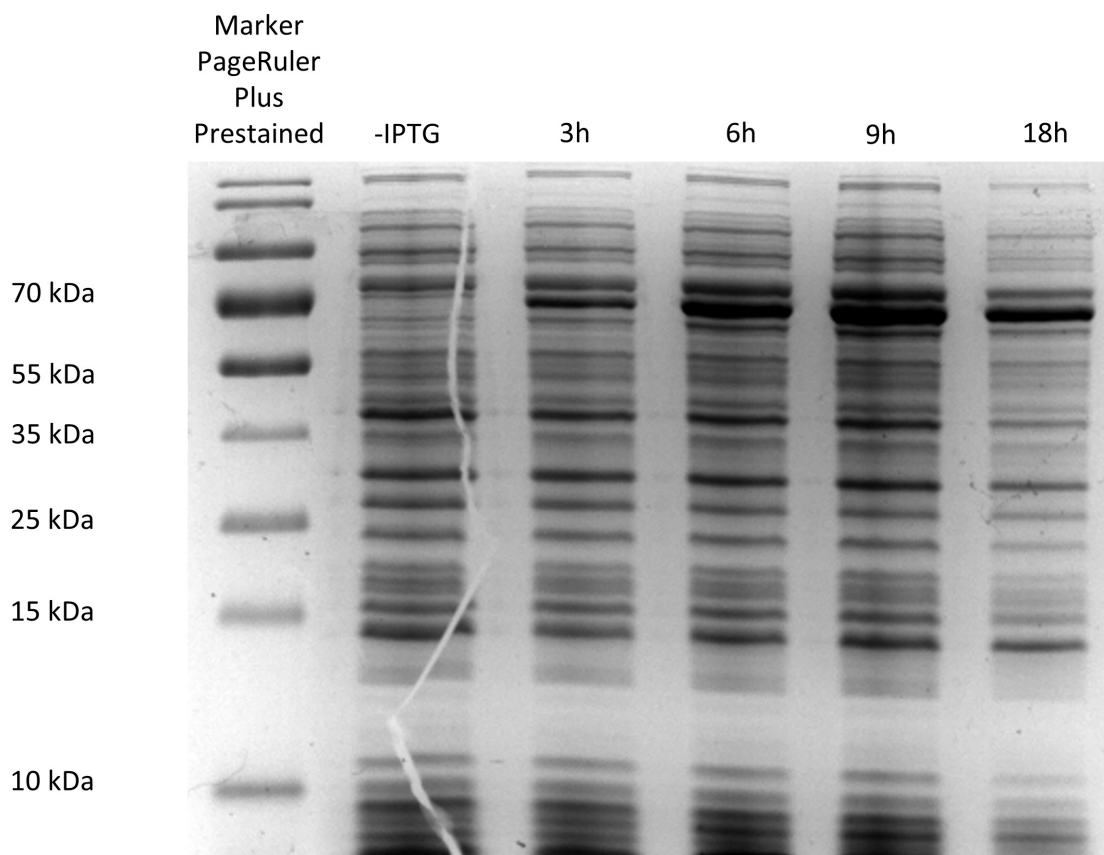
- Newby, M. I., & Greenbaum, N. L. (2001). A conserved pseudouridine modification in eukaryotic U2 snRNA induces a change in branch-site architecture. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(6), 833–845. <https://doi.org/10.1017/s1355838201002308>
- Ontiveros, R. J., Stoute, J., & Liu, K. F. (2019). The chemical diversity of RNA modifications. *The Biochemical Journal*, 476(8), 1227–1245. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180445>
- Pascolo, S. (2021). Synthetic Messenger RNA-Based Vaccines: From Scorn to Hype. *Viruses*, 13(2), 270. <https://doi.org/10.3390/v13020270>
- Patra Bhattacharya, D., Canzler, S., Kehr, S., Hertel, J., Grosse, I., & Stadler, P. F. (2016). Phylogenetic distribution of plant snoRNA families. *BMC Genomics*, 17(1), 969. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3301-2>
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K. E., Graveley, B. R., & Collier, J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 160(6), 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S.-H. (2016). mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Rozhdestvensky, T. S., Tang, T. H., Tchirkova, I. V., Brosius, J., Bachellerie, J.-P., & Hüttenhofer, A. (2003). Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: A shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 869–877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg175>
- Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., León-Ricardo, B. X., Engreitz, J. M., Guttman, M., Satija, R., Lander, E. S., Fink, G., & Regev, A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated

- pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 159(1), 148–162.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.028>
- Schwerk, J., & Savan, R. (2015). Translating the untranslated region. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(7), 2963–2971.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500756>
- Shabalina, S. A., Ogurtsov, A. Y., & Spiridonov, N. A. (2006). A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Research*, 34(8), 2428–2437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl287>
- Tang, T.-H., Bachellerie, J.-P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M.-L., Huber, H., Drungowski, M., Elge, T., Brosius, J., & Hüttenhofer, A. (2002). Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7536–7541. <https://doi.org/10.1073/pnas.112047299>
- Tani, H., Mizutani, R., Salam, K. A., Tano, K., Ijiri, K., Wakamatsu, A., Isogai, T., Suzuki, Y., & Akimitsu, N. (2012). Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Research*, 22(5), 947–956. <https://doi.org/10.1101/gr.130559.111>
- Terns, M., & Terns, R. (2006). Noncoding RNAs of the H/ACA family. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71, 395–405.
<https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.034>
- Toffano-Nioche, C., Gautheret, D., & Leclerc, F. (2015). Revisiting the structure/function relationships of H/ACA(-like) RNAs: A unified model for Euryarchaea and Crenarchaea. *Nucleic Acids Research*, 43(16), 7744–7761.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv756>
- Tuller, T., & Zur, H. (2015). Multiple roles of the coding sequence 5' end in gene expression regulation. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 13–28. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1313>

- Tulloch, F., Atkinson, N. J., Evans, D. J., Ryan, M. D., & Simmonds, P. (2014). RNA virus attenuation by codon pair deoptimisation is an artefact of increases in CpG/UpA dinucleotide frequencies. *ELife*, 3, e04531. <https://doi.org/10.7554/eLife.04531>
- Wan, Y., Qu, K., Zhang, Q. C., Flynn, R. A., Manor, O., Ouyang, Z., Zhang, J., Spitale, R. C., Snyder, M. P., Segal, E., & Chang, H. Y. (2014). Landscape and variation of RNA secondary structure across the human transcriptome. *Nature*, 505(7485), 706–709. <https://doi.org/10.1038/nature12946>
- Weinberg, D. E., Shah, P., Eichhorn, S. W., Hussmann, J. A., Plotkin, J. B., & Bartel, D. P. (2016). Improved Ribosome-Footprint and mRNA Measurements Provide Insights into Dynamics and Regulation of Yeast Translation. *Cell Reports*, 14(7), 1787–1799. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.043>
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- Wu, H., & Feigon, J. (2007). H/ACA small nucleolar RNA pseudouridylation pockets bind substrate RNA to form three-way junctions that position the target U for modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6655–6660. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701534104>
- Xiao, M., Yang, C., Schattner, P., & Yu, Y.-T. (2008). Functionality and substrate specificity of human box H/ACA guide RNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 15, 176–186. <https://doi.org/10.1261/rna.1361509>
- Yu, Y.-T., Terns, R., & Terns, M. (2004). Mechanisms and functions of RNA-guided RNA modification. In *Topics in Current Genetics* (Vol. 12, pp. 859–889). <https://doi.org/10.1007/b105585>

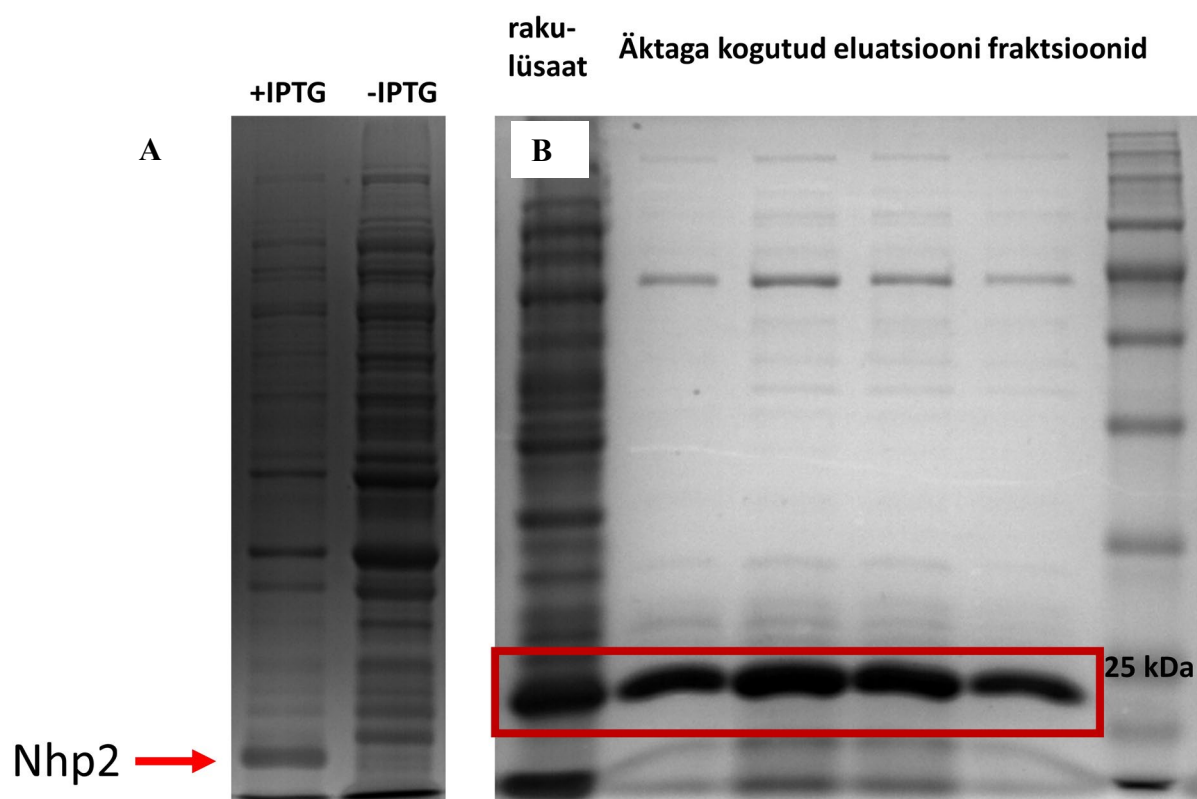
LISAD

Lisa 1. Cbf5 + Nop10 ekspressiooni esialgne optimeerimine



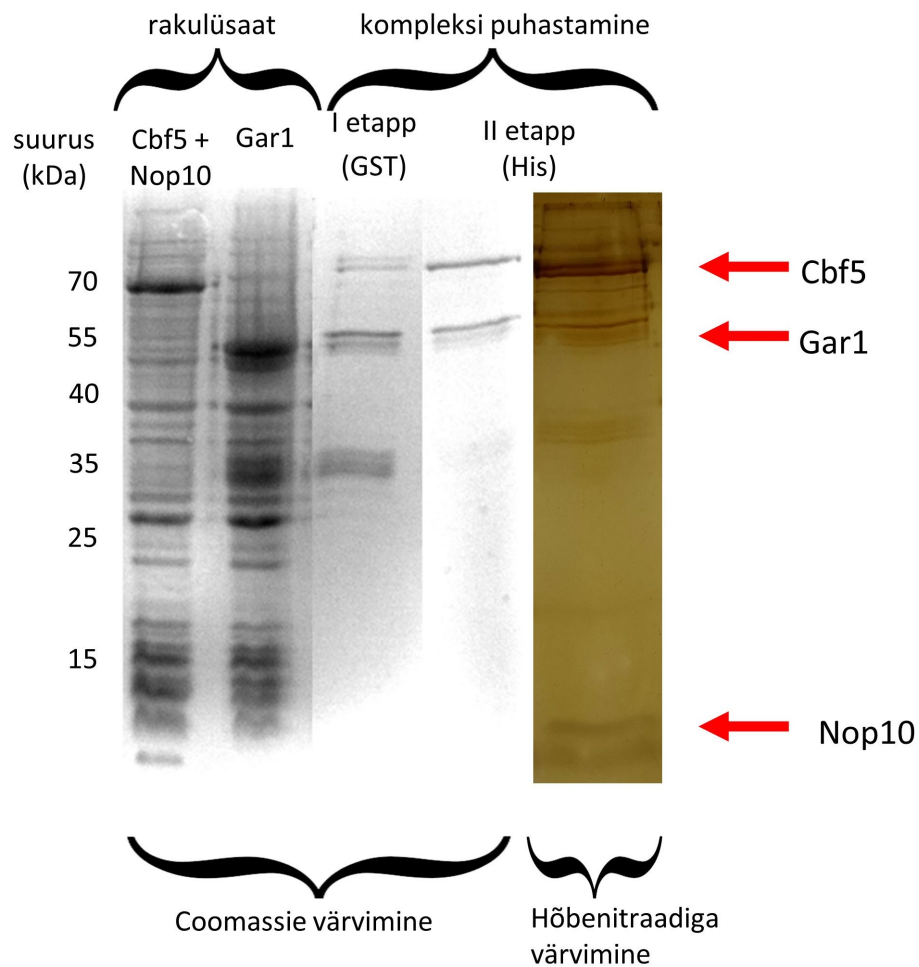
Lisa 1. Cbf5 + Nop10 ekspressiooni esialgne optimeerimine. SDS-PAA geeli pilt, kus esimesel rajal on suurusmarker ning teisel rajal on geelile kantud totaalne *E.coli* rakulüsaat rakkudest, mis kandsid Cbf5 ja Nop10 geenide järjestust plasmiidil, kuid kuhu ei olnud kasvukeskonda lisatud IPTG-d. Radadel 3-6 on näha ajapunktid IPTG lisamise järgselt vastavalt, 3h, 6h, 9h ja 18h. Suurusmarkeri 70 kDa piirkonnas on näha Cbf5 valgu üleekspressiooni. Nop10 üleekspressiooni valitud meetodiga ei ole võimalik vaadelda.

Lisa 2. Nhp2 ekspressiooni hindamine ja puhastamine afiinsuskromatograafia meetodil



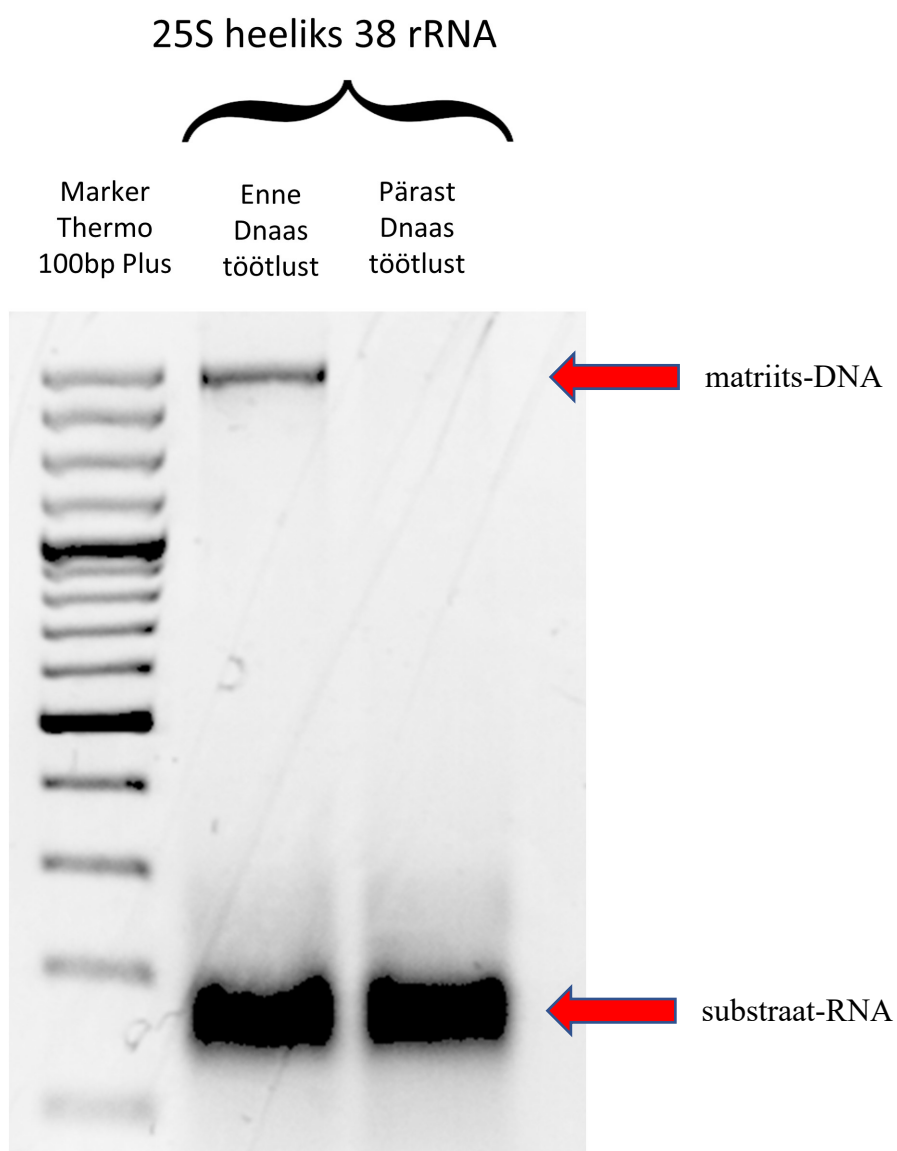
Lisa 2. Nhp2 ekspressiooni hindamine ja puhastamine afiinsuskromatograafia meetodil. Joonise paneelil A on SDS-PAA geeli pilt, kus on esimesel rajal IPTG juuresolekul kasvatatud rakud ning teisel rajal ilma IPTG lisamiseta kasvatatud rakud. Punase noolega on näidatud Nhp2 asukoht geelil. Joonise paneelil B on esimesel rajal afiinsuskromatograafias kasutatud totaalne rakulüsaat ning viimasel rajal suurusmarker. Radadel 2 – 5 on näha afiinsuskromatograafia kolonnilt elueeritud fraktsioonide proovide analüüs. Punase ristküliku sees on näha Nhp2 valgu asukoht geelil.

Lisa 3. H/ACA RNP kompleksi valkude Cbf5, Nop10 ja Gar1 puhastamine kaheetapilise afiinsuskromatograafia meetodil



Lisa 3. H/ACA RNP kompleksi valkude Cbf5, Nop10 ja Gar1 puhastamine kaheetapilise afiinsuskromatograafia meetodil. Joonisel on näidatud väljavõtted geelipiltidest: esimesel kahel rajal on SDS-PAA geelile kantud rakulüsaat, vastavalt Cbf5 ja Nop10 ning Gar1 valke ekspresseerivatest rakkudest. Kolmandal ja neljandal rajal on elektriväljas lahutatud kolmest valgust koosneva kompleksi valgud ning punase noolega on näidatud Cbf5 ja Gar1 asukoht. Kolmas ja neljas rada on tähistatud vastavalt afiinsuskromatograafia etapile, kas GST-märgise järgi puhastades (esimene etapp) või His-märgise järgi puhastades (teine etapp). Viiendal rajal on neljanda rajaga identset geeli värvitud höbenitraadiga ja seeläbi visualiseeritud valk Nop10, mis on näidatud punase noolega. Esimese nelja raja pildid on võetud geelidest, mis on värvitud kasutades värvi *Comassie Brilliant Blue*.

Lisa 4. Substraat-RNA visualiseerimine 2% agarosgeelil



Lisa 4. Substraat-RNA visualiseerimine 2% agarosgeelil. Joonisel on näha geelelektroforeesi käigus lahutatud ning etiidiumbromiidiga UV-kiirguses visualiseeritud substraat-RNA (teisel ja kolmandal rajal) ning matriits DNA enne DNaas töötlust (teisel rajal).

Lisa 5. Pseudouridülatsioonireaktsiooni läbi viimisel saadud andmed triitumi vabanemise kohta vastavatel ajapunktidel võetud proovidest (töö punkt 2.3.5) (Joonis 12).

Lisa 5. Pseudouridülatsioonireaktsiooni läbi viimisel saadud andmed triitumi vabanemise kohta vastavatel ajapunktidel võetud proovidest.

aeg	reaktsioon	loendatud DPM	tegelik DPM (loendatud DPM miinus kontroll)
5min	1) täielik kompleks	814	328
	2) –giidRNA (foon)	486	
10min	1) täielik kompleks	962	471
	2) –giidRNA (foon)	491	
20min	1) täielik kompleks	1293	798
	2) –giidRNA (foon)	495	
30min	1) täielik kompleks	1561	948
	2) –giidRNA (foon)	613	
60min	1) täielik kompleks	1844	991
	2) –giidRNA (foon)	853	

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eliise Haljas

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
**„Eukarüootse valgukompleksi Cbf5-Gar1-Nop10-Nhp2 puhastamine ja
aktiivsuse kontroll *in vitro* pseudouridülatsioonil“**

mille juhendaja on Ermo Leuska

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Eliise Haljas

26.05.2022