

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Heilike Toming

**rRNA metüültransferaas WBSCR22 ja TRMT112 interaktsiooni
uurimine imetaja rakkudes**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: *M. Sc* Kadri Õunap

Ph. D Reet Kurg

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Williams-Beureni sündroom.....	5
1.2 WBSCR22 valk.....	6
1.2 Bud23 ja Rid2 valgud	8
1.3 Trm112 - inimese TRMT112 valgule homoloog pagari pärmiss.....	9
1.5 WBSCR27 valk.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1 Eesmärgid	13
2.2 Materjalid ja meetodika	14
2.2.1 Plasmiidid.....	14
2.2.2 Eukarüootsed rakuliinid	14
2.2.3 Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	14
2.2.4 Koimmunosadestamine	15
2.2.5 Western Blot.....	15
2.3 Tulemused ja arutelu.....	16
2.3.1 WBSCR22 interakteerub TRMT112-ga	16
2.3.2 TRMT112-1 on WBSCR22 valgule stabiliseeriv efekt	18
KOKKUVÕTE	22
Summary.....	23
Tänuõnad.....	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	32

KASUTATUD LÜHENDID

FCS- veise loote seerum (*fetal calf serum*)

IMDM- Iscove'i modifitseeritud Dulbecco sööde (*Iscove's modified Dulbecco's medium*)

PVDF- polüvinülideendifloriid (*polyvinylidene difluoride*)

rpm – rootori pööret minutis (*Revolutions per minute*)

SAM – S-adenosüül-L-metioniin (*S-adenosyl-L-methionine*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

TBS – Tris puhverdatud soolalahus (*Tris buffered saline*)

Trm112/ TRMT112- tRNA metüültransferaas 11-2 (*tRNA methyltransferase 11-2*)

WBS – Williams-Beureni sündroom (*Williams-Beuren syndrome*)

WBSCR22 – Williams-Beureni sündroomi kontrollregioon 22 (*Williams-Beuren syndrome control region 22*)

WBSCR27 - Williams-Beureni sündroomi kontrollregioon 27 (*Williams-Beuren syndrome control region 27*)

SISSEJUHATUS

WBSCR22 (*Williams-Beuren syndrome 22*) on inimese rRNA metüültransferaas, mis osaleb ribosoomi 40S subühiku biogeneesis ning mõjutab rakkude normaalset proliferatsiooni. WBSCR22 on üks geenidest, mille hemisügootne deletsioon on toimunud Williams-Beureni sündroomiga (WBS) patsientidel. WBS on harvaesinev kromosomaalne häire, mille põhjuseks on mikrodeletsioon 7. kromosoomi pikast õlast. Enamikul WBS patsientidest esinevad kardiovaskulaarsed, endokrinoloogilised ja neuroloogilised häired. Iseloomuliku kognitiivse ja käitumusliku profiili tõttu on Williams-Beureni sündroom olnud neuroteadlaste huviorbiidis. Samas pole siiani teada kõikide deleteerunud geenide funktsioon organismis, samuti nende seosed WBS fenotüübi kujunemisega.

Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) on WBSCR22 homoloogi Bud23 valgu oluliseks interaktsioonipartneriks Trm112 (*tRNA methyltransferase 11-2*). Trm112 on tsinksõrme domeeni omav valk, mis on kofaktoriks erinevatele metüültransferaasidele, mõjutades nii ribosoomi väikese kui ka suure subühiku biogeneesi. Trm112 valgu inimese homoloogi, TRMT112 valgu, funktsiooni ja interaktsioonipartnerite kohta on teada vähe.

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks on anda kirjanduse põhjal ülevaade WBSCR22 ja TRMT112 valkudest ning iseloomustada TRMT112 ja WBSCR22 valkude interaktsiooni tähtsust imetaja koekultuurirakkudes. Eksperimentaalse osa eesmärgiks on analüüsida WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelist interaktsiooni ja WBSCR22 valgu stabiilsust imetajarakkudes.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Williams-Beureni sündroom

Williams-Beureni sündroom (WBS) ehk Williamsi sündroom on multisüsteemne arenguhäire, mille tekke põhjuseks on *de novo* umbes 1,5-1,8 Mb suurune mikrodeletsioon 7. kromosoomi pikast õlast, täpsemalt kromosoomipiirkonnast 7q11.23, haarates enda alla 26-28 geeni (Ewart *et al.*, 1993; Schubert, 2009; Fusco *et al.*, 2014). WBS tekkesagedus on 1/7500 kuni 1/20 000 elussünni kohta. Enamasti on haigus sporaadiline, kuid on kirjeldatud ka autosoomdominantse pärilikkuse juhtusid (Metcalf *et al.*, 2005; Strømme *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 1993).

Williams-Beureni sündroomiga patsientidel on rida erinevaid sümptomeid nagu näiteks kaasasündinud südame-veresoonkonna haigused, millest kõige sagedamini esineb supraavalvulaarne aordi stenoos ehk aordi kitsenemine (SVAS – *supraavalvular aortic stenosis*), umbes 70% WBS patsientidel, ja hüpertensioon (Ewart *et al.*, 1993; Pober, 2010). WBS iseloomustab ka enneaegne vananemine, spetsiifiline näokuju ja patsientide lühem kasv. Teisteks arenguhäire tunnusteks on müopaatia ja erinevad endokriinsed probleemid, millest tavaliseimad on lapsea hüperkaltseemia ja diabeet (Bellugi *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1993; Schubert, 2009; Pober, 2010; Morris, 2010). Lisaks südame- ja veresoonkonna ning endokrinoloogilistele haigustele esineb kraniaalnärvidega seotud probleeme: hüperrefleksia, hüperakuusia, kõõrdsilmsus ehk strabism ja tahtmatu silmade liikumine (Merla *et al.*, 2010). Williamsi sündroomiga indiviididel esineb leebe kuni mõõdukas intellektuaalne mahajäämus - patsientide IQ on vahemikus 40-100, tavaliselt 50-60 piires (Meyer-Lindberg *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2008). WBS patsientidel on väga sotsiaalne ja sõbralik iseloom (Mervis *et al.*, 2000), neil on suhteliselt hästi arenenud verbaalsed oskused ja mälu, samas visuaalne ruumitaju on väga nõrgalt arenenud (Mervis *et al.*, 2000). Umbes 80% täiskasvanud WBS patsientidest kannatab ärevushäirete all, lisaks esinevad erinevad hirmud, nende seas üleliigne muretsemine ning ärrituvus, mis tekitab raskusi sõprussidemete loomisel ja hoidmisel (Davies *et al.*, 1998).

Esimene WBS lookusesse kaardistatud geen oli elastiini geen (Ewart *et al.*, 1993). Elastiin (ELN) on valk, mis aitab tagada veresoonte elastsuse. Täna on kindlaks tehtud, et ELN geeni hemisügootsus põhjustab Williamsi sündroomi ühte kõige sagedasemat sümptomit - supraavalvulaarset aordi stenoosi (Ewart *et al.*, 1993; Merla *et al.*, 2010). LIMK1 geeni

deletsiooni seostatakse kuulmise kaotamise, hüperakuusia ja kognitiivse profiili patoloogiaga (Todorovski *et al.*, 2015; Matsumoto *et al.*, 2011). Ka GTF2IRD1 geeni deletsiooni seostatakse WBS patsientide kognitiivse ja näokolju patoloogiaga, lisaks ka sündroomile iseäraliku käitumise tekkega (Tassabehji *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2007; Ewart *et al.*, 1993). CLYN2 geeni deletsioon põhjustab aju väärenguid ning puudujääke motoorses koordineerimises (Hoogenraad *et al.*, 2002). Teiste WBS lookusest ekspresseeritavate valkude roll haiguse fenotüübi kujunemisel on ebaselge ning vajab täiendavat uurimist (Pober, 2010).

1.2 WBSCR22 valk

Mitmed teadustööd on näidanud, et WBSCR22 (Williams-Beureni sündroomi kromosoomiregion 22) ekspressioon on ülesreguleeritud erinevate kasvujavormide korral, näiteks infiltreruva duktaalse rinnavähi ja melanoomi rakkudes, samuti hepatotsellulaarse kartsinoomi ja hulгимüeloomi puhul (Nakazawa *et al.*, 2011; Tiedemann *et al.*, 2012; Stefanska *et al.*, 2014). Infiltreruv duktaalne rinnavähk on vähivorm, mille korral vähirakud on levinud piimajuhadest väljapoole, kõige sagedamini lümfisõlmedesse, kopsudesse, maksa ja ajju (Minn *et al.*, 2005; Lacroix, 2006). Sarnane metastaaside levik esineb ka melanoomi korral (Fiddler, 1995). Hulгимüeloom on pahaloomuline kasvaja, mida iseloomustab plasmarakkude proliferatsioon luuüdis või teistes organismi kudedes (Raab *et al.*, 2009). WBSCR22 ekspressioonitase on inimese plasma- ja hulгимüeloomirakkudes üle 10 korra kõrgem kui ülejäänud somaatilistes rakkudes ning WBSCR22 ekspressioonitaseme allareguleerimine RNAi abil vähendas hulгимüeloomi rakkude elulemust kaks korda. (Tiedemann *et al.*, 2012). WBSCR22 ekspressiooni mahasurumine vähendas ka hepatotsellulaarse kartsinoomi rakkude kasvu ja invasiooni võimet (Stefanska *et al.*, 2014), mis veelgi tõestab WBSCR22 olulisust rakkude jagunemise reguleerimisel. Samas on näidatud, et mõnede vähivormide puhul ning samuti põletikuliste ja neoplastiliste kopsupatoloogiate korral on WBSCR22 ekspresioonitase madalam (Jangani *et al.*, 2014).

WBSCR22 geenilt kodeeritav valk molekulmassiga ~31,8 kDa koosneb 281 aminohappest. WBSCR22 omab S-adenosüül-L-metioniini (SAM) sõltuvat metüültransferaasset domeeni ning kuulub *Rossmann-fold* motiivi sisaldavate ensüümide klassi (Wang *et al.*, 1997; Merla

et al., 2002). *Rossmann-fold* ensüümide katalaüütiline piirkond koosneb seitsmest paralleelsest beeta-struktuurist ja neid ühendavast kahest alfa-heeliksi paarist (Martin ja McMillian, 2002). WBSCR22 ekspressiooni allareguleerimine RNAi abil aeglustab rakkude kasvu (Õunap *et al.*, 2013). Tänapäevaks on teada, et WBSCR22 osaleb ribosoomi 40S subühiku biosünteesil ja metüleerib 18S rRNA N⁷- positsioonis G1639 (Õunap *et al.*, 2013; Haag *et al.*, 2015). WBSCR22 *knockdown*'i tagajärjel akumulereb rakutuumas 18S-E pre-rRNA ning see viib tsütoplasmas oleva 18S rRNA hulga vähenemisele (Õunap *et al.*, 2013; Haag *et al.*, 2015). Haag *et al.* (2015) katsed näitasid, et WBSCR22-1 on ribosoomi väikese subühiku biogeneesil kaks eraldiseisvat funktsiooni. Ribosoomi 40S subühiku biogeneesiks on vajalik WBSCR22 valgu olemasolu, kuid mitte tema metüültransferaasne aktiivsus (Haag *et al.*, 2015). Endogeenne WBSCR22 valk lokaliseerub difuusselt rakutuumas ning üleekspressiooni tingimustes akumulereb tuumakesse, kuigi ta pre-ribosoomidega stabiilseid interaktsioone ei moodusta (Nakazawa *et al.*, 2011; Õunap *et al.*, 2013; Õunap *et al.*, 2015, *under revision*).

Lisaks rRNA metüültransferaasle aktiivsusele, on näidatud, et WBSCR22 mõjutab ka histoonide metüleerimist, inhibeerides Zac1 ekspressiooni läbi Zac1 promootoralas oleva histooni H3K9 metüleerimise (Nakazawa *et al.*, 2011). Zac1 on transkriptsioonifaktor, mis koaktiveerib tuumor-supressorgeeni p53 ekspressiooni ja mõjutab seeläbi kasvajakude proliferatsiooni. Nakazawa *et al.* (2011) näitasid, et WBSCR22 ekspresseerimine viib Zac1-p53-sõltuva apoptoosiraja inhibeerimiseni. Kasutades hiire metastaasimudelit, näidati, et endogeense WBSCR22 olemasolu suurendas kasvajakude ellujäämist veresoontes ning seeläbi soodustas metastaaside teket kopsudes ja maksa. Seejuures oli metastaaside moodustumiseks oluline WBSCR22 SAM-sõltuv metüültransferaasne domeen (Nakazawa *et al.*, 2011).

WBSCR22 mõjutab glükokortikoidide regulatsiooni läbi oma seondumise glükokortikoidretseptori ko-aktivaator GRIP1-ga (Jangani *et al.*, 2014). Glükokortikoidid on steroidhormoonid, mis osalevad rakkudes metabolismiradades ning raku spetsialiseerumise ja proliferatsiooni protsessides (Sommer *et al.*, 2010). Lisaks osalevad glükokortikoidid organismi põletikuliste reaktsioonide mahasurumisel. WBSCR22 ekspressiooni mahasurumine takistas glükokortikoidretseptorite seondumist substraatidega, mõjutades sellega glükokortikoidide transaktivatsiooni ja transrepressiooni (Jangani *et al.*, 2014). Bronhides on täheldatud kõrget WBSCR22 ekspressioonitaset, mis põletikuliste ja kasvajakude kopsupatoloogiate korral on märgatavalt vähenenud (Jangani *et al.*, 2014).

Lisaks sellele ekspresseerub WBSCR22 valk ka B- lümfotsüütides ja CD8⁺ T lümfotsüütides, mis viitab, et WBSCR22 võib osaleda põletikuliste signaalide ülekandumisel (Jangani *et al.*, 2014).

1.2 Bud23 ja Rid2 valgud

Bud23 on inimese WBSCR22 valgu homoloog pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) ning kuulub SAM-sõltuvate metüültransferaaside klassi. Bud23 identifitseeriti *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomide biogeneesiga seotud geene analüüsides (Lee *et al.*, 2007). Bud23 valk ei ole pagaripärmi rakkudele essentsiaalne, kuid selle geeni deletsioon põhjustab väga aeglase kasvufenotüübi ning ribosoomi 40S subühiku biogeneesidefekti (White *et al.*, 2008). *Bud23* deletsiooni tõttu blokeeritakse 20S rRNA protsessing 18S rRNA-ks, mis viib vaba 40S subühiku taseme alanemiseni ning põhjustab vaba 60S subühikute taseme tõusu (White *et al.*, 2008). Bud23 on samuti rRNA lämmastikaluse metüültransferaas, mis metüleerib 18S rRNA G1575 (White *et al.*, 2008). Katalüütiliselt inaktiivsetel Bud23 mutantidel puudub *bud23* deletsioonimutantidele omane kasvudefekt, mis näitab, et metüültransferaasne aktiivsus ei ole vajalik 40S subühiku bisünteesiks (White *et al.*, 2008). Öunap *et al.* (2013) näitasid, et WBSCR22 kompenseeris suures osas *Bud23* deletsioonimutantide kasvudefekti, mis kinnitab, et WBSCR22 ja Bud23 on funktsionaalsed homoloogid. Erinevalt WBSCR22-st, moodustab Bud23 tuumakeses pre-ribosoomidega stabiilseid interaktsioone (White *et al.*, 2008; Figaro *et al.*, 2012; Sardana ja Johnson, 2012).

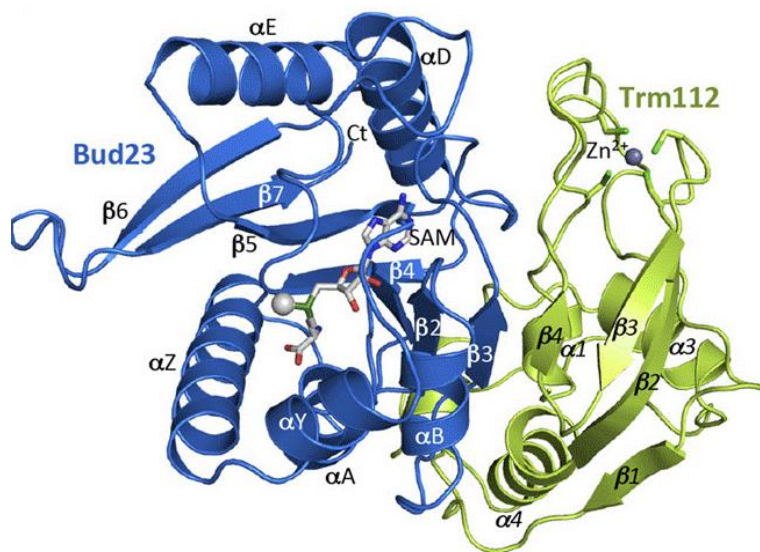
Rid2 (*root initiation defective 2*) valk on Bud23 ja WBSCR22 homoloog müürloogas (*Arabidopsis thaliana*). Rid2 ekspresseerub taime esmases juures, abilehtedes, lehekarvades, õietolmus ja embrüos (Ohbayashi *et al.*, 2011). Rid2 asub rakus tuumas ning sarnaselt homoloogidele akumulereerub tuumakesse (Ohbayashi *et al.*, 2011). Rid2 deletsioonimutantides oli mitmete rRNA prekursorite tase võrreldes metsiktüüpi taimega kõrgem, mis viitab, et Rid2 mõjutab samuti rRNA protsessingut (Ohbayashi *et al.*, 2011). Erinevalt WBSCR22-st, ei komplementeerinud Rid2 ekspresseerimine *bud23*-defektse pagaripärmi aeglase kasvu fenotüüpi (Ohbayashi *et al.*, 2011).

1.3 Trm112 - inimese TRMT112 valgu homoloog pagaripärmis

Pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) tRNA metüültransferaas 11-2 (Trm112) on väike tsinksõrme motiivi omav valk suurusega 15 kDa, mis on kofaktoriks erinevatele tRNA, rRNA ja valkude metülatsioonil osalevatele metüültransferaasidele (Purushothaman *et al.*, 2005; Sabine *et al.*, 2012). Trm112 vastutab oma interaktsioonipartnerite õige pakkimise ja stabiilsuse eest (Purushothaman *et al.*, 2005; Heurgue-Hamard *et al.*, 2006; Mazauric *et al.*, 2010; Liger *et al.*, 2011). Kuna Trm112 valgu hulk rakus on limiteeritud, peavad tema interaktsioonipartnerid omavahel konkureerima (Figaro *et al.*, 2012). Trm112 seondub oma interaktsioonipartneritega eraldi, mitte ei teki mitmevalgulisi komplekse (Figaro *et al.*, 2012).

Pagaripärmi Trm112 on koaktivaatoriks erinevatele metüültransferaasile, nagu näiteks Trm9, Trm11, Mtq2 ja Bud23. (Purushothaman *et al.*, 2005; Heurgue-Hamard *et al.*, 2006; Mazauric *et al.*, 2010; Liger *et al.*, 2011). Trm9-Trm112 kompleks katalüüsib metüülrühma lisamist spetsiifiliste tRNA-de *wobble* positsioonis uridiinidele. See on vajalik translatsiooni elongatsioonil koodonite dekodeerimiseks (Kalhor ja Clarke, 2003; Mazauric *et al.*, 2010). Trm11-Trm112 kompleks metüleerib tRNA 10ndas positsioonis guanosiini (m^2 G10), mõjutades sellega tRNA-de stabiilsust (Purushothaman *et al.*, 2005). Trm112 on vajalik ka Mtq2 katalüütiliseks aktiivsuseks ja tema lahustuvuseks (Heurgue-Hamard *et al.*, 2006; Petry *et al.*, 2005). Mtq2-Trm112 kompleks metüleerib eukarüootide translatsiooni elongatsioonifaktori (eRF1) konserveerunud GGQ motiivi (Heurgue-Hamard *et al.*, 2005; Heurgue-Hamard *et al.*, 2006). Klass I vabanemisfaktorid (RF) katalüüsivad translatsiooni terminatsiooni etappi. RF-ide metülatsioon tagab efektiivse translatsiooni terminatsiooni ja vastsünteesitud peptiidi vabanemise ribosoomidest (Frolova *et al.*, 2000).

Trm112 on oluliseks interaktsioonipartneriks Bud23-le (Figaro *et al.*, 2012). Bud23 ja Trm112 interaktsiooni kristallstruktuur on toodud välja joonisel 1. Trm112 seondub Bud23-e SAM-sõltuvale metüültransferaasile domeenile ning nende valkude interaktsioonipinda iseloomustab suur hüdrofoobne tuum, mille ümber on polaarsed aminohappejäägid, mis osalevad 12 vesiniksideme ja 2 soolasilla moodustumises (Letoquart *et al.*, 2014). Need struktuurid stabiliseerivad Bud23-e ja muudavad valgu lahustuvaks (Figaro *et al.*, 2012).



Joonis 1. Bud23-Trm112 kompleksi kristallstruktuur *Saccharomyces cerevisiae*'s (Letoquart *et al.*, 2014). Trm112 (roheline) omab tsinksõrme domeeni (hall), α -heeliksit ($\alpha 1$), mis on pakitud neljaahelaliste antiparalleelsete β -lehtede ($\beta 1$ - $\beta 4$) vastu ning tsentraalhelikaasset domeeni ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$). Bud23 omab SAM-sõltuvatele metüültransferaasidele omast domeeni, seitset β -lehte ($\beta 1$ - $\beta 7$) ning nelja α -heeliksit (αY , αZ , αA , αB) ühelt pool SAM domeeni ja kahte teiselt pool (αD , αE). Metüülatsiooni käigus ülekantav metüülrühm ($-CH_3$) on esitatud helehalli kerana. Bud23-Trm112 interaktsioon toimub paralleelsete β -lehtede vahel ($\beta 3$ Bud23-l ja $\beta 4$ Trm112-l). Moodustub 11 β -lehest koosnev ahel.

Trm112 deletsiooniga rakud sarnanevad oma fenotüübilt, nii aeglase kasvu kui ribosoomide biogeneesi defekti osas, *bud23* deletsioonimutantidega (Sardana ja Johnson, 2012). Trm112 stabiliseerib Bud23 ning Trm112 valgu puudumisel ei interakteeru Bud23 pre-ribosoomidega täies ulatuses (Figaro *et al.*, 2012). Trm112 deletsioonimutandi aeglase kasvu põhjuseks on Bud23 valgu taseme vähenemine (Sardana ja Johnson, 2012). Sarnaselt *bud23* deletsioonimutantidele, on ka Trm112 valgu puudumisel ribosoomi subühikute tasakaal paigast ära, mida iseloomustab vähenenud 40S ja suurenenud 60S tase (Figaro *et al.*, 2012; Sardana ja Johnson 2012). Trm112 on vajalik Bud23 vahendatud 18S rRNA G1575 metüülatsiooniks, kuna Trm112 valgu puudumisel metüülatsiooni ei

toimunud (Figaro *et al.*, 2012). Figaro *et al.* (2012) katsed näitasid, et Trm112 osaleb oma interaktsioonipartnerite kaudu 40S pre-ribosoomi transpordil tuumast tsütoplasmasse.

Trm112 valk mõjutab ka ribosoomi 60S subühiku biogeneesi (Figaro *et al.*, 2012; Sardana ja Johnson 2012). Lisaks eespool nimetatud metüültransferaasidele on Trm112 interaktsioonipartneriteks ka näiteks Rrp5, Rrp12, Nop2 ja Rcm1 (Figaro *et al.*, 2012; Sardana ja Johnson 2012). Rrp5 ja Rrp12 on trans-faktorid, mis osalevad mõlema ribosoomi subühiku sünteesil (Figaro *et al.*, 2012). Nop2 on tuumavalk, mis on vajalik 60S subühiku biogeneesil 27S pre-RNA protsessinguks (Hong *et al.*, 2001). Nii Nop2 kui ka Rcm1 osalevad 25S rRNA tsüsteiinijääkide metüleerimisel (vastavalt positsioonides m⁵C 2870 ja m⁵C 2278), kuid Trm112 valgu olemasolu nende positsioonide metüleerimist ei mõjuta (Sharma *et al.*, 2013). m⁵C 2278 metülatsioon on vajalik korrektseks ribosoomide biosünteesiks ning m⁵C 2870 metülatsiooni mõjutab anisomütsiini ainevahetust rakkudes (Sharma *et al.*, 2013). Mõlemad valgud on konserveerunud ka inimeses, kuid nende täpne funktsioon pole teada. Rcm1 valgu inimese homoloog on NSUN5 valk ning seda valku kodeeriv geen kuulub samuti Williamsi sündroomi korral deleteerunud 26-28 geeni hulka (Doll ja Grzeschik, 2001).

Trm112 mõjutab rakkude jagunemist: ligikaudu 10% *trm112* deletsioonimutantidest ei läbi mitoosi (Figaro *et al.*, 2012). Rakkude jagunemise eelduseks on piisav kogus funktsionaalseid ribosome, kuid *trm112* deletsiooni korral on häiritud mõlema subühiku süntees. Mutatsioonid ribosoomide sünteesi trans-faktorites viivad pärimi puhul mitoosi start-punktis, kõrgemates eukarüootides vastavalt G1-kontrollpunktis, rakutsükli seiskumiseni (Kawai *et al.*, 2001).

SMO2 (*Small organ 2*) on Trm112 homoloog müürloogas (*Arabidopsis thaliana*). SMO2 ekspressioon on kõrge juures, võsu meristees ja arenevates organites (Hu *et al.*, 2010). SMO2 geeni *knockout* mutantidel on aeglustunud rakkude jagunemine lehtedes ja juurtes (Hu *et al.*, 2010). SMO2 reguleerib organogeneesi ajal rakkude G₂-M faasi progressiooni (Hu *et al.*, 2010). SMO2 geeni *knockout*'i tagajärjel tõusis rakus viie rakutsükli kontrollpunktiga seotud geeni (CYCD3;1, histoon H4, CYCA1;1, CYCB2;3 ja CYCB1;1) ekspressioonitase (Hu *et al.*, 2010). Kõige kõrgem ekspressioonitase oli CYCB1;1 transkriptil, mis erines *wild-type* tüvest 3,8 korda (Hu *et al.*, 2010). Varasematest uuringutest on selgunud, et CYCB1;1 üleekspressioon või inibeerimine takistavad

rakutsükli progressiooni G₂-faasist M-faasi (Weingartner *et al.*, 2004; Perez-Perez *et al.*, 2008).

Imetajatest on Trmt112 uuritud hiires. Gu *et al.* (2012) tuvastasid, et Trmt112 on kõrgelt ekspresseeritud hiire embrüonaalse arengu käigus. Ekspressiooni tase oli kõrge ajus ja närvisüsteemis, aga ka maksas, kopsudes, soolestikus ja neerudes. Trmt112-l võib olla seotud aju ja närvisüsteemi arengu ning morfogeneesiga (Gu *et al.*, 2012).

1.5 WBSR27 valk

Teiseks WBS piirkonnast ekspresseeritavaks metüültransferaasiks, mida antud töö raames uuriti, on WBSR27. WBSR27 suurus on 26,5 kDa ning koosneb 245 aminohappest (*UniprotKB*) ning tema bioloogilist funktsiooni ja patoloogilist seost WBS-iga ei ole praeguseks leitud (Hahn ja Lee, 2005). WBSR27 valk ei oma homoloogi pagaripärmis ning talle on samuti ennustatud seitsmest β -lehest koosneva SAM-sõltuva metüültransferaasse domeeni olemasolu (Micale *et al.*, 2008; Petrossian ja Clarke, 2011). Erinevalt WBSR22-st, lokaliseerub WBSR27 tsütoplasmas, mistõttu võivad neil olla erinevad funktsioonid.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Eesmärgid

WBSCR22 valku on uuritud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Reet Kure tööruhmas juba 2009. aastast. Varasemalt on näidatud WBSCR22 rolli ribosoomi 40S subühiku biogeneesil ning lokaliseerumist rakutuumas (Õunap *et al.*, 2013). Pagaripärmiga tehtud katsetes on selgunud, et inimese WBSCR22 homoloog, Bud23 valk, interakteerub rakus erinevatele metüültransferaasidele kofaktoriks oleva Trm112-ga (Figaro *et al.*, 2012; Letoquart *et al.*, 2014). Meie tööruhma proteoomika analüüs (SILAC- *stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) näitab samuti, et WBSCR22 valk interakteerub rakus TRMT112 valguga (Õunap *et al.*, 2015, under revision). WBSCR22-TRMT112 interaktsiooni näitas ka hiljaaegu ilmunud Zorbas *et al.* (2015) artikkel.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelist interaktsiooni ning iseloomustada selle tähtsust imetaja koekultuurirakkudes.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Plasmiidid

WBSCR22 valgu ekspresseerimiseks kasutati töös pQM-NTag-WBSCR22 plasmidi (Õunap *et al.*, 2013). Antud plasmiidilt ekspresseeritud WBSCR22 valgu N-terminaalses osas on BVP1 E2 valgust pärinev epitoopitag E2Tag, mis võimaldab valgu detekteerimiseks ja koimmunosadestamiseks kasutada E2 epitoop-tag-i vastast antikeha 5E11 (Kurg *et al.*, 1999). Töös kasutati ka Kadri Õunapi poolt konstrueeritud pCG3F12-WBSCR27 (Õunap, 2010) ning pQM-C1Tag-TRMT112 konstrukte (Õunap *et al.*, 2015, *under revision*) ning kontrollidena pEGFP-C1 (*Clontech*) ja pQM-CMV-E2-N/A (*Icosagen*) vektoreid.

2.2.2 Eukarüootsed rakuliinid

Töös kasutati HeLa (inimese emakakaelavähi rakud) ja COS-7 (aafrika rohepärdiku neerurakud) rakuliine, mida kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium, PAA Laboratories*), kuhu lisati 10% veise loote seerumit (*FCS- fetal calf serum*) ning antibiootikume penitsilliini (100 U/ml) ja streptomütsiini (100 µg/ml) (*PAA Laboratories*). Rakke kasvatati 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

2.2.3 Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

70-80% konfluentsusega koekultuuri plaatidelt aspireeriti sööde, rakke pesti 2 ml PBS-iga ning eemaldati plaatidelt trüpsiiniga. Rakususpensioon kanti tsentrifuufituubi, kuhu oli lisatud trüpsiiniga võrdses mahus IMDM söödet. Rakud tsentrifuugiti põhja 1000 rpm 20°C juures 5 minutit (*Eppendorf centrifuge 5810R*), supernatant aspireeriti ning lisati söödet transfektsiooniks vajaminevas koguses, 250 µl ühe poratsiooni kohta. Elektroporatsiooni küvetti kanti 50 µg *salmon sperm carrier* DNA-d, sobivas koguses plasmiidset DNA-d (COS-7 rakuliini 200 ng ja HeLa rakuliinis 500 ng DNA-d) ning 250 µl rakususpensiooni. Seejärel viidi läbi elektroporatsioon, kasutades *Bio Rad Gene Pulser*

Xcell elektroporaatorit. HeLa rakuliini puhul kasutati pinget 220 V ja mahtuvust 975 μ F. COS-7 rakkude puhul rakendati pinget 180 V, mahtuvuseks 975 μ F. Pärast poratsiooni kanti rakud küvetist tsentrifuugitopsi, milles oli 3 ml söödet ning tsentrifuugiti 1000 rpm 20°C 5 minutit (*Eppendorf centrifuge 5810R*). Rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes ning kanti 100 mm või 60 mm koekultuuri plaatidele. Transfektsiooni järgselt kasvatati rakke 37°C ning 5% CO₂ sisalduse juures 24h.

2.2.4 Koimmunosadestamine

Koimmunosadestamise katseteks transfekkeeriti COS-7 rakkudesse elektroporatsiooni teel pQM-CM-E2-N/A, pQM-Ntag-WBSCR22 ja pCG3F12-WBSCR27 plasmiidid ning 24 tunni möödudes rakud koguti ja lüüsi. Selleks pesti rakud PBS-ga, eemaldati plaadilt 2 ml PBS/3mM EDTA-ga ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 4000 rpm 5 minutit 4°C juures (*MicroCl 21R centrifuge*). Supernatant aspireeriti, rakke pesti 1 ml PBS-ga ja tsentrifuugiti 4000 rpm 5 minutit 4°C juures. Rakud koguti 200 μ l IP puhvrts (0,1 M KCl; 20 mM Tris pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 10% glütserool; 0,1% Tween-20; 0,5 mM DTT; proteaasi inhibiitorid), lõhuti sonikeerides 5 \times 30 sekundit (*Biorupter UCD-200*), inkubeeriti jääl 15 minutit ja tsentrifuugiti 10 min 13 000 rpm 4°C juures. Supernatandist eemaldati 10 μ l ning sellele lisati võrdses koguses 2xLaemmli puhvrit (4% SDS, 20% glütserool, 120 mM Tris pH 6,8; 0,01% broomfenoolsinine, 100 mM DTT) (*Input*). Ülejäänud supernatandile lisati 1 ml IP puhvrit ja 1 μ g E2Tag-i vastast antikeha 5E11 (*Icosagen*) ning inkubeeriti 4°C juures 1h. Lüsadile lisati 20 μ l Sepharose G *beads*'e, inkubeeriti 1 h 4°C juures ja tsentrifuugiti lüsadi 13 000 rpm 1 min 4°C. *Beads*'e pesti neli korda 200 μ l IP puhvriga, resuspendeeriti 20 μ l 2xLaemmli puhvrts ning kuumutati 10 minutit 100°C juures. Proovide analüüsimiseks kasutati Western blot meetodit.

2.2.5 Western Blot

Rakkude lüüsimiseks pesti rakke PBS-iga ja koguti PBS/ 3mM EDTA puhvriga. Rakke tsentrifuugiti 4000 rpm-i 5 minutit (*Sigma 1-14Microfuge*), supernatant aspireeriti ning rakkude resuspendeeriti PBS-sis. Rakud koguti tsentrifuugides eelnevalt kirjeldatud

tingimustel. Rakusade suspendeeriti 50 µl PBS-is ning lisati 2xLaemmli puhvrit. Valgulüsaatide denatureerimiseks kuumutati proove 10 minutit 100°C juures.

Valgulüsaadid lahutati SDS polüakrüülamiid geelelektroforeesil (*SDS-page*), kasutades 15% polüakrüülamiidgeeli ning 1x SDS jooksupuhvrit (125 mM Tris; 960 mM glütsiin; 0,5% SDS). Elektroforeesi järgselt kanti valgud geelist 0,45 µm PVDF membraanile (*Immobilon-P, Millipore Corporation*). Enne ülekannet märjati membraan metanoolis, inkubeeriti *semy-dry* puhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037% SDS; 20% etanool) ja viidi läbi ülekannepingel 15 V 30 minutit (*Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad Manufacturing*).

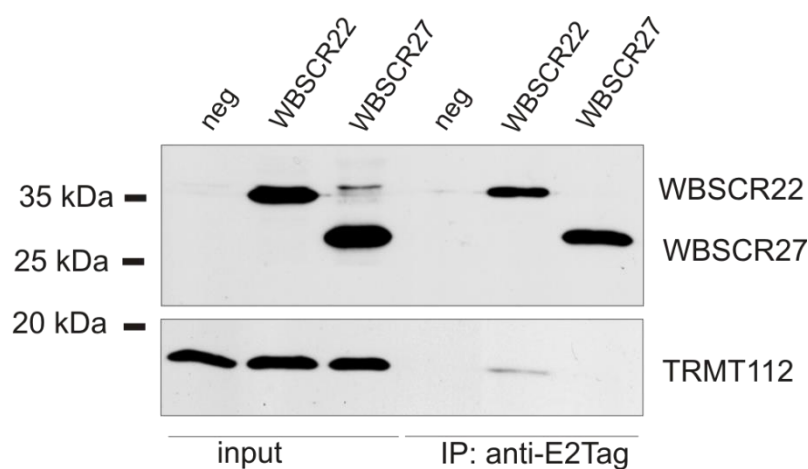
Ülekande järgselt blokeeriti membraani üleöö 4°C juures (1xTBS; 0,05% Tween 20; 5% lõssipulbrit). Järgmisel päeval inkubeeriti membraani 1 tund primaarset antikeha sisaldavas lahuses (1xTBS; 0,05% Tween 20; 2% lõssipulbrit). Kasutati hiire toodetud E2Tag-i vastast antikeha 5E11 või 5E11-HRP (lahjendusega 1:10000; *Icosagen*), α -tubuliini vastast antikeha lahjendusega 1:10000 (T6074, Sigma Aldrich) ja küülikus toodetud TRMT112 vastast antikeha lahjendusega 1:3500 (*HPA040006*, Sigma Aldrich). Seejärel pesti membraani 3 korda 5 minutit Westerni pesulahusega (100 mM Tris pH 7,5; 170 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud *goat anti-rabbit HRP* ja *goat-anti-mouse HRP* antikehasid lahjendusega 1:10000 (*LabAs AS*). Membraani pesti uuesti 3 korda 10 minutit ning valgud visualiseeriti *ECL kit*’iga (*GE Healthcare*), kasutades tootjapoolset protokollit ja ilmutati röntgenfilmile.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 WBSCR22 interakteerub TRMT112-ga

Lähiaastatel on ilmunud mitmeid artikleid, mis kirjeldavad inimese WBSCR22 ja TRMT112 homoloogide (vastavalt Bud23 ja Trm112) interaktsiooni pärmis (Sardana ja Johnson, 2012; Figaro *et al.*, 2012; Letoquart *et al.*, 2014). Meie uurimisgrupi proteoomika analüüsi katsed ja hiljutine Zorbas *et al.* (2015) artikkel näitavad, et samasugune interaktsioon toimub ka imetajarakuliinides (Õunap *et al.*, 2015, under revision). WBSCR22 ja TRMT112 interaktsiooni analüüsimiseks viidi läbi valkude koimmunosadestamine. Lisaks WBSCR22-le, uuriti antud töö raames, kas TRMT112

interakteerub ka teise WBS lookusest ekspresseeritava metüültransferaasi WBSCR27-ga. Selleks transfekeeriti COS-7 rakkudesse 200 ng WBSCR22 ja WBSCR27 valku kodeerivaid plasmide. Negatiivse kontrollproovina kasutati tühja pQM-CMV-E2-N/A vektorit. Järgmisel päeval koguti 24 h kasvanud rakud koekultuuriplaatidelt ning lüüsiiti. Koimmunosadestamiseks kasutati E2 epitoop-tag-i vastast antikeha 5E11. Valkude tuvastamiseks ja visualiseerimiseks analüüsiti lüsaate Western blot meetodil. Katse tulemus on toodud välja joonisel 2.



Joonis 2. WBSCR22 ja TRMT112 interaktsioon COS-7 rakuliinis. COS-7 rakke transfekeeriti plasmiididega, mis kodeerisid vastavalt WBSCR22 ja WBSCR27 valke. Kontrollina kasutati tühja vektorit. 24 h pärast transfektsiooni valgud koimmunosadestati kasutades E2Tag-i vastast antikeha. Western blot'il kasutati E2Tag-i ja TRMT112 valgu vastaseid antikehasid. Katset korrati 3 korda, milledest samasuguse tulemuseni jõuti kõigil 3 korral.

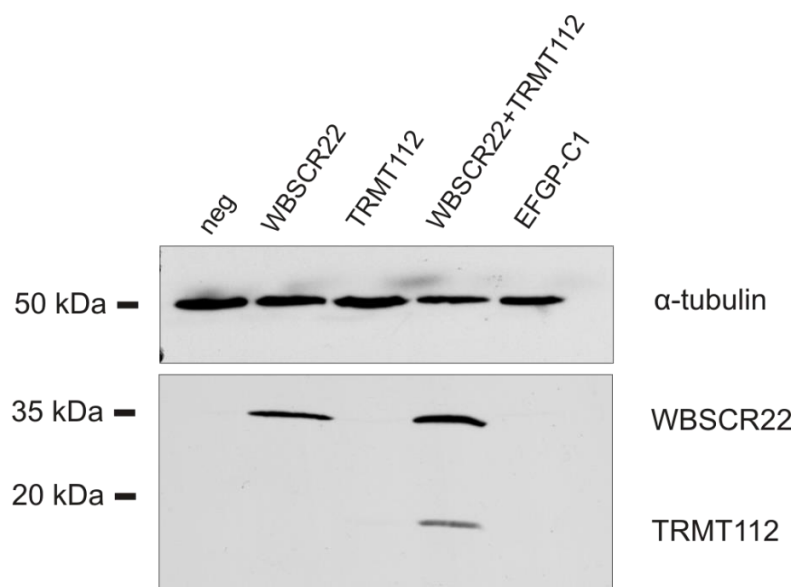
Tulemused joonis 2 ülemisel paneelil näitavad, et WBSCR22 ja WBSCR27 valkude ekspressioonitase COS-7 rakkudes oli sarnane ning meil õnnestus koimmunosadestada mõlemad uuritavad valgud. Joonis 2 alumiselt paneelilt on näha, et vaid WBSCR22 interakteerub TRMT112-ga. Kuigi varasemalt on pagaripärmis näidatud, et Trm112 interakteerub paljude metüültransferaasidega, siis meie tulemused WBSCR27 ja TRMT112 vahelist interaktsiooni ei näidanud (Figaro *et al.*, 2012; Sardana ja Johnson 2012; Purushothaman *et al.*, 2005; Heurgue-Hamard *et al.*, 2006; Mazauric *et al.*, 2010;

Liger *et al.*, 2011). Samas WBSCR27 ja TRMT112 ei pruugi rakus moodustada stabiilset kompleksi või puuduvad nende interaktsiooniks vajalikud kofaktorid ja natiivsed tingimused. Katse tulemustest võib järeldada, et sarnaselt Bud23-Trm112 interaktsiooni olulisusele pärmi ribosoomide biogeneesis, on ühtlasi ka imetajarakkudes ribosoomide korrektseks biogeneesiks vajalik WBSCR22-TRMT112 heterodimeerse kompleksi moodustumine.

2.3.2 TRMT112-l on WBSCR22 valgule stabiliseeriv efekt

WBSCR22 ja TRMT112 interaktsiooni olulisuse uurimiseks transfekteriti HeLa rakkudesse WBSCR22 ja TRMT112 valke kodeerivad plasmiidid, järgmisel päeval rakud lüüsi ning valgulüsaate analüüsi Western blot meetodil. Antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud E2Tag-i vastast antikeha 5E11-HRP ning laadimiskontrollina α -tubulini vastast antikeha. Katse tulemus on esitatud joonisel 3. Tulemustest on näha, et TRMT112 stabiliseerib imetaja koekultuurirakkudes WBSCR22 valku, kuna WBSCR22 ja TRMT112 koos ekspresseerimisel suurenes WBSCR22 ekspressioonitase. Samas näitab joonis 3 ka vastupidist TRMT112 stabiliseerimist WBSCR22 poolt, TRMT112 ekspressioonitaseme tõusu WBSCR22-ga koos ekspresseerides. WBSCR22-TRMT112 valkude interaktsiooni kristallstruktuuri kohta info puudub, sellepärast lähtutakse antud töös WBSCR22 ja TRMT112 heterodimeeri iseloomustamisel nende valkude homoloogidest pagaripärmis. Bud23 nagu ka WBSCR22 on suhteliselt halvasti lahustuv valk, mis muudab valgu ebastabiilsemaks. Trm112-Bud23 interaktsioonil peidetakse hüdrofoobne tuum heterodimeerse kompleksi keskele, lisaks moodustuvad vesiniksidemed ja soolasillad. Antud struktuurid parandavad valgu lahustuvust, mis omakorda mõjub valkudele stabiliseerivalt. Valgu funktsioon on otseselt seotud tema kolmedimensionaalse struktuuriga. Seetõttu on valgu stabiliseerimine vajalik, et kaitsta valku degradeerimise või inaktivatsiooni eest, mis võib viia organismis mõne olulise funktsiooni häirumiseni. Katsed pagaripärmis on näidanud et *trm112* deletsioonimutantidel on häiritud Bud23 funktsioon rakus. Meie labori katsetulemused viitavad, et samasugune efekt on ka inimese rakkudes. TRMT112 ekspressiooni mahasurumisel siRNA-dega, vähenes ka WBSCR22 ekspressioonitase. Lisaks sellele,

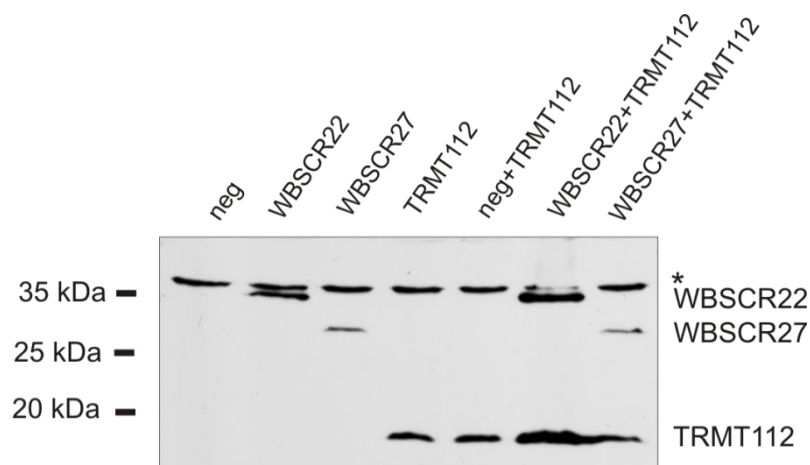
WBSCR22 valgumutant, mille TRMT112 seondumissait oli defektne, lagundati rakkudest kiiremini kui metsiktüüpi WBSCR22 valg (Õunap *et al.*, 2015, under revision). Lisaks väheneb WBSCR22 ja TRMT112 deletsioonimutantidel 18S rRNA hulk, mis viitab, et WBSCR22 on rakus interaktsioonis TRMT112 valguga, mis ühtlasi kontrollib WBSCR22 valgu taset (Zorbas *et al.*, 2015). Meie labori tulemused on näidanud, et ebastabiilse oleku tõttu on WBSCR22 valgu puhastamisel lüsaatidest komplitseeritud, sest bakteris ekspresseerides on lahustuva valgu hulk väga madal. Antud katse tulemustest lähtuvalt arvestatakse edaspidi WBSCR22 valgu puhastamisel ka TRMT112 valgu koekspressiooniga, mis oluliselt stabiliseerib meid huvitavat valku ning võimaldab WBSCR22 lahustuvust suurendada.



Joonis 3. Interaktsioon TRMT112 valguga stabiliseerib WBSCR22-te. WBSCR22 ja TRMT112 ekspressioonitaset HeLa rakkudes analüüsiti Western blot meetodil. Valkude signaal detekteeriti peroksüdaasiga konjugeeritud anti-E2Tag vastase antikehaga (5E11-HRP), laadimiskontrollina kasutati α -tubulini vastast antikeha, katset korrati kolm korda.

Pärmimudelites on näidatud, et Trm112 seondub paljudele erinevatele metüültransferaasidele, nende seas ka Bud23 SAM-sõltuvale metüültransferaassele domeenile. Sellest lähtuvalt uuriti, kas TRMT112 valgul on stabiliseeriv efekt metüültransferaasidele laiemalt. Et uurida TRMT112 võimet metüültransferaase

stabiliseerida transfekeeriti HeLa rakkudesse 500 ng plasmiidset DNA-d, millelt kodeeriti WBSCR22, TRMT112 ja WBSCR27 valke. Ööpäeva möödudes loeti rakkude arv, rakud lüüsi ning valgulüsaadid lahutati elektroforeetiliselt (ühele rajale kanti umbes 100000 rakulüsaat). Valgud tuvastati 5E11 antikehaga Western blot meetodil. Katse tulemused on toodud joonisel 4. Kuigi rakkudesse viidi võrdses koguses DNA-d, on näha, et 6. rajal olevad WBSCR22 ja TRMT112 annavad tugevama signaali. See kinnitab eelmise katses ilmenud TRMT112 stabiliseerivat efekti WBSCR22 valgule ning ka vastupidist, TRMT112 stabiliseerimist WBSCR22 poolt. Kuigi WBSCR22 ja WBSCR27 jagavad 38% ulatuses sama aminohappelist järjestust ning mõlemad on SAM-sõltuvad metüültransferaasid domeeni omavad valgud (Petrossian ja Clarke, 2011), ei stabiliseeri TRMT112 WBSCR27-t, seega võib järeldada, et TRMT112 valgul puudub üldine stabiliseeriv mõju metüültransferaasidele. TRMT112 valgu stabiliseeriv efekt on WBSCR22 spetsiifiline. See viitab, et WBSCR22-TRMT112 heterodimeerne kompleks on imetajarakkudes vajalik WBSCR22 efektiivsuseks. Seniste teadaolevate andmete põhjal võib eeldada, et see on seotud just ribosoomide biogeneesiga.



Joonis 4. TRMT112 reguleerib rakus WBSCR22 stabiilsust, kuid stabiliseeriv efekt WBSCR27 valgule puudub. HeLa rakke transfekeeriti elektroporatsiooni teel 500 ng WBSCR22, WBSCR27 ja TRMT112 valke kodeerivate plasmiididega. Ööpäeva möödudes loeti rakud ning 10^5 rakulüsaat kanti geelile. Proove analüüsiti E2Tag-i vastase antikehaga 5E11 Western blot meetodil. Tärniga on märgitud ebaspetsiifiline signaal. Katset viidi läbi kaks korda.

Töö meie uurimisgrupis WBSCR22 valguga jätkub. Pärnis on kirjeldatud Trm112 valgul palju erinevaid interaktsioonipartnereid, seetõttu oleks oluline välja selgitada, kas WBSCR22-TRMT112 heterodimeerses kompleksis osaleb seda interaktsiooni mõjutavaid lisavalke. Pikemas perspektiivis püütakse välja selgitada, kuidas WBSCR22 mõjutab WBS patsientide fenotüübi kujunemist, mis aitaks leida seost WBSCR22 ja Williams-Beureni sündroomile iseloomuliku fenotüübi kujunemisel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli näidata ning iseloomustada WBSCR22 ja TRMT112 valkude vahelist interaktsiooni imetaja koekultuurirakkudes. Töö esimeses pooles anti kirjanduse põhjal ülevaade WBSCR22 ja TRMT112 valkudest. WBSCR22 on inimese 18S rRNA metüültransferaas, millel on roll ribosoomi 40S subühiku biogeneesil. TRMT112 on inimese homoloog pärmi Trm112 valgule. Trm112 on pagaripärmis kofaktoriks erinevatele metüültransferaasidele, osaledes seeläbi mõlema ribosoomi subühiku biogeneesil.

Antud bakalaureusetöö ekperimentaalses osas uuriti ning iseloomustati TRMT112 ja WBSCR22 interaktsiooni imetaja koekultuurirakkudes. Koimmunsadestamise katsed näitasid, et selline interaktsioon tõepoolest toimub sarnaselt pärmile ka imetajarakkudes. Edasiste analüüside eesmärk oli saada põhjalikumaid teadmisi WBSCR22-TRMT112 interaktsioonist. Selgus, et TRMT112 valgul on inimese WBSCR22 stabiliseeriv efekt, mis tuleneb valkude heterodimeerse kompleksi lahustuvuse suurenemisest. Lisaks viitavad hiljuti avaldatud uurimistöö andmed, et TRMT112 valgu puudumine või seondumisaidi defektsus mõjutavad 40S ribosoomi subühiku biogeneesi, mis viitab, et korrektseks ribosoomide biogeneesiks on vajalik just heterodimeerne kompleks. Järgmiseks teostati katse, et uurida, kas TRMT112 stabiliseeriv efekt laieneb ka teistele metüültransferaasidele. Eksperimendist järeldus, et stabiliseeriv mõju teisele metüültransferaasile, WBSCR27-le, puudub ning efekt on ainult WBSCR22 spetsiifiline.

WBSCR22 funktsiooni välja selgitamiseks inimeses jätkuvad nii meie töörühmas kui ka teistes laborites.

Investigating rRNA methyltransferase WBSCR22 and TRMT112 interaction in mammalian cells

Heilike Toming

Summary

WBSCR22 is one of the ~26 genes that is deleted in Williams-Beuren syndrome (WBS). Williams-Beuren syndrome is a rare neurodevelopmental disorder, which is caused by the deletion of 26-28 genes from the genomic region of 7q11.23. WBS patients have mild to moderate intellectual disability, distinctive facial features, gastrointestinal and cardiovascular problems. WBSCR22 protein methylates 18S rRNA and is involved in ribosome 40S subunit biogenesis. Furthermore, WBSCR22 has been shown to be upregulated in different cancers. In budding yeast, WBSCR22 homologue Bud23 interacts with Trm112 protein. Trm112 is involved in biosynthesis of small and large ribosome subunits through its interaction partners. Less is known about Trm112 human homologue TRMT112.

The aim of this paper was to study the interaction between WBSCR22 and TRMT112 in mammalian cells. Co-immunoprecipitation analysis confirmed that WBSCR22-TRMT112 interaction does also take place in mammalian cells, suggesting that this interaction is conserved between mammals and yeast. In addition, the results of this work show that TRMT112 binding stabilizes WBSCR22 protein. The stabilizing effect of TRMT112 is specific to WBSCR22 and do not expand to all methyltransferases. Additional studies to investigate the role of WBSCR22 in cells and also in Williams-Beuren syndrome needs to be conducted.

Tänuõnad

Teemavaliku, idee teostamise, hea juhendamise ning abivalmiduse eest soovin tänada oma juhendajaid Kadri Õunapit ja Reet Kurge. Siinkohal soovin tänada oma perekonda suure toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Berg, J. S., Brunetti-Pierri, N., Peters, S. U., Kang, S. H. L., Fong, C. T., Salamone, J., Freedenberg, D., Hannig, V. L., Prock, L. A., Miller, D. T., et al. (2007). Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genetics in Medicine* 9, 427-441.

Bellugi, U., Lichtenberger, L., Mills, D., Galaburda, A., Korenberg, J. R. (1999) Bridging cognition the brain and molecular genetics: evidence from Williams syndrome. *Trens. Neurosci.* 22, 197-207

Davies, M., Udwin, O., Howlin, P. (1998). Adults with Williams syndrome: preliminary study of social, emotional and behavioural difficulties. *Br. J. Psychiatry* 172, 273-276.

Doll, A., Grzeschik, K.H. (2001). Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenetics and Cell Genetics* 95, 20-27.

Ewart, A.K., Morris, C. A., Atkinson, D., Jin, W., Sternes, K., Spallone, P., Stock, A.D., Leppert, M., Keating, M.T. (1993). Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genetics* 5, 11-16.

Fiddler, I. J. (1995). Melanoma metastasis. *Cancer Control* 2, 398-404.

Figaro, S., Wacheul, L., Scillewaert, S., Graille, M., Huvelle, E., Mongeard, R., Zorbas, C., Lafontaine, D. L. J., Heurgue-Hamard, V. (2012) Trm112 is required for Bud23-mediated methylation of the 18S rRNA at position G1575. *Molecular and Cellular Biology* 32, 2254-2267.

Frolova, L. Y., Merkulova, T. I., Kisselev, L. L. (2000) Translation termination in eukaryotes: polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *RNA*, 6, 381-390.

Fusco, C., Micale, L., Augello, B., Pellico, M. T., Menghini, D., Alfieri, P., Digilio, M. C., Mandriani, B., Carella, M., Palumbo, O., Vicari, S., Merla, G. (2014) Smaller and larger deletions of the Williams Beuren syndrome region implicate genes involved in mild facial phenotype, epilepsy and autistic traits. *European Journal of Human Genetics* 22, 64–70.

- Gu, T., He, H., Zhang, Y., Han, Z., Hou, G., Zeng, T., Liu, Q., Wu, Q. (2012) Trmt112 gene expression in mouse embryonic development. *Acta Histochem. Cytochem.* 45, 113-119.
- Haag, S., Kretschmer, J., Bohnsack, T, M. (2015) WBSCR22/MERM1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N⁷-methylation of G1639 in human 18S rRNA. *RNA* 21, 180-187.
- Hahn, Y., Lee, B. (2005) Identification of nine human-specific frameshift mutations by comparative analysis of the human and the chimpanzee genome sequences. *Bioinformatics* 21, 186-194.
- Heurgue-Hamard, V., Graille, M., Scrima, N., Ulryck, N., Champ, S., van Tilbeurgh, H., Buckingham, R. H. (2006) The zinc finger protein ynr046w is plurifunctional and component of the erf1 methyltransferase in yeast. *J. Biol. Chem.* 281, 36140-36148.
- Hong, B., Wu, K., Brockenbrough, J. S., Wu, P., Aris, J. P. (2001). Temperature sensitive Nop2 alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 29, 2927-2937.
- Hoogenraad, C. C., Koekkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, H., Dortland, B., Miedema, M., van Alphen, A., Kistler, W. M., Jaegle, M., Koutsourakis, M., Van Camp, N., Verhoye, M., van der Linden, A., Kaverina, I., Grosveld, F., De Zeeuw, C. I., Galjart, N. (2002). Targeted mutation of *Cyln2* in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat. Genet.* 32, 116-127.
- Hu, Z., Qin, Z., Wang, M., Xu, C., Feng, G., Liu, J., Meng, Z., Hu, Y. (2010) The *Arabidopsis* SMO2, a homologue of yeast TRM112, modulates progression of cell division during organ growth. *Plant Journal* 61, 600-610.
- Jangani, M., Poolman, T. M., Matthews, L., Yang, N., Farrow, S. N., Berry, A., Hanley, N., Williamson, A. J., Whetton, A. D., Donn, R., Ray, D. W. (2014) The methyltransferase WBSCR22/Merm1 enhances glucocorticoid receptor function and is regulated in lung inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 289, 8931-8946.
- Kalhour, H. R., Clarke, S. (2003) Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9283-9292.

- Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., *et al.* (2001). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* 409, 685-690.
- Kurg, R., Parik, J., Juronen, E., Sedman, T., Abroi, A., Liiv, I., Langel, U., Ustav, M. (1999) Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *Journal of Virology*, 73, 4670-4677.
- Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine- Related Cancer*. 13, 1033-67.
- Lee, I., Li, Z., Marcotte, E. M. (2007) An improved, bias-reduced probabilistic functional gene network of baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 2:e988.
- Letoquart, J., Huvelle, E., Wacheul, L., Bourgeois, G., Zorbas, C., Graille, M., Heurgue-Hamard, V., Lafontaine, D. L. J. (2014) Structural and functional studies of Bud23-Trm112 reveal 18S rRNA N⁷-G1575 methylation occurs on late 40S precursor ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5518-26.
- Liger, D., Mora, L., Lazar, N., Figaro, S., Henri, J., Scrima, N., Buckingham, R. H., van Tilbeurgh, H., Heurgué-Hamard, V., Graille, M. (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 hub protein. *Nucleic Acids Res.* 39, 6249-6259.
- Martens, M. A., Wilson S. J., Reutens, D. C. (2008). Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype. *J. Child Psychol. Psychiatry* 49, 576-608.
- Martin, J. L., McMillian, F. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 783-793.
- Matsumoto, N., Kitani, R., Kalinec, F. (2011) Linking LIMK1 deficiency to hyperacusis and progressive hearing loss in individuals with Williams syndrome. *Commun. Integr. Biol.* 4, 208-210.
- Mazauric, M. H., Dirick, L., Purushothaman, S. K., Bjork, G. R., Lapeye, B. (2010) Trm112p is a 15-kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferase in yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 18505-18515.

- Merla, G., Ucla, C., Guipponi, M., Reymond, A. (2002) Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Human Genetics*, 110, 429-38.
- Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Micale, L., and Fusco, C. (2010). Copy number variants at Williams–Beuren syndrome 7q11.23 region. *Human Genetics* 128, 3-26.
- Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Micale, L., Fusco, C. (2010). Copy number variants at Williams–Beuren syndrome 7q11.23 region. *Human Genetics*. 28, 3-26.
- Mervis, C. B., Klein-Tasman, B. P. (2000). Williams syndrome: Cognition, personality, and adaptive behavior. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 6, 148-158.
- Meyer-Lindenberg, A., Mervis, C. B., Berman, K. F. (2006). Neural mechanisms in Williams syndrome: a unique window to genetic influences on cognition and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 380-93.
- Metcalfe, K., Simeonov, E., Beckett, W., Donnai, D., and Tassabehji, M. (2005). Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clinical Dysmorphology* 14, 61-65.
- Micale, L., Fusco, C., Augello, B., Napolitano, L.M.R., Dermitzakis, E.T., Meroni, G., Merla, G., and Reymond, A. (2008). Williams-Beuren syndrome TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase. *European Journal of Human Genetics* 16, 1038-1049.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., Massagué, J. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.
- Morris, C. A., Thomas, I. T., Greenberg, F. (1993). Williams syndrome: Autosomal dominant inheritance. *American Journal of Medical Genetics* 47, 478-481.
- Morris, C. A. (2010). Introduction: Williams Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 154C, 203-208.
- Nakazawa, Y., Arai, H., Fujita, N. (2011) The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis. *Cancer Res*; 71, 1146–55

- Ohbayashi, I., Konishi, M., Ebine, K., Sugiyama, M. (2011) Genetic identification of Arabidopsis RID2 as an essential factor involved in pre-RNA processing. *Plant Journal* 67, 49-60.
- Perez-Perez, J. M., Serralbo, O., Vanstraelen, M., Gonzalez, C., Criqui, M. C., Genschik, P., Kondorosi, E., Scheres, B. (2008) Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* 53, 78-89.
- Petrossian, C. T., Clarke, G. S. (2011). Uncovering the Human Methyltransferasome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, M110.000976.
- Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V. 4th, Dunham, C. M., Selmer, M., Tarry, M. J., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors rf1 and rf2 bound to a cognate atop codon. *Cell* 123, 1255-1266
- Pober, B.R. (2010). Medical progress: Williams-Beuren syndrome. *New England Journal of Medicine* 362, 239-252.
- Purushothaman, S., Bujnicki, J., Grosjean, H., Lapeyre, B. (2005) Trm11p and Trm112p Are both Required for the Formation of 2-Methylguanosine at Position 10 in Yeast tRNA. *Mol. Cell Biol.* 25, 4359-4370.
- Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet.* 374, 324-339.
- Sardana, R., Johnson, A. W. (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4313-4322.
- Schubert, C. (2009). The genomic basis of the Williams - Beuren syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 1178-1197.
- Sardana, R., Johnson, A. W. (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Mol. Biol. Cell*, 23, 4313-4322.
- Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K. D. (2013). Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic Acids Res.* 41, 9062-9076.

Stefanska, B., Cheishvili, D., Suderman, M., Arakelian, A., Huang, J., Hallett, M., Han, Z. G., Al-Mahtab, M., Akbar, S. M., Khan, W. A., Raqib, R., Tanvir, I., Khan, H. A., Rabbani, S. A., Szyf, M. (2014) Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in patients with liver cancer unravels. *Clinical Cancer Research* 20, 3118-3132.

Strømme, P., Bjørnstad, P.G., Ramstad, K. (2002). Prevalence estimation of Williams syndrome. *Journal of Child Neurology* 17, 269-271.

Zorbas, C., Nicolas, E., Wacheul, L., Huvelle, E., Heurgue-Hamard, V., Lafontaine, D. L. J. (2015) The human 18S rRNA base methyltransferase DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell*, ahead of print. pii: mbc.E15-02-0073.

Tassabehji, M., Hammond, P., Karmiloff-Smith, A., Thompson, P., Thorgeirsson, S. S., Durkin, M. E., Popescu, N. C., Hutton, T., Metcalfe, K., Rucka, A., Stewart, H., Read, A. P., Maconochie, M., Donnai, D. (2005) GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. *Science*, 310, 1184-1187.

Tiedemann, R., Zhu, Y., Schmidt, J., Shi, C., Sereduk, C., Yin, H., Mousses, S., Stewart, A. K. (2012) Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNAi lethality screening of the druggable genome. *Cancer Res.* 72, 757-768.

Todorovski, Z., Asrar, S., Liu, J., Saw, N. M., Joshi, K., Cortez, M. A., Snead, O. C., Xie, W., Jia, Z. (2015). LIMK1 regulates long-term memory and synaptic plasticity via the transcriptional factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1316-1328.

Wang, Y. K., Samos, C. H., Peoples, R., Perez-Jurado, L. A., Nusse, R., Francke, U. (1997). A novel human homologue of the *Drosophila* frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Human Molecular Genetics* 6, 465-472.

Weingartner, M., Criqui, M. C., Meszaros, T., Binarova, P., Schmit, A. C., Helfer, A., Dervier, A., Erhardt, M., Bögre, L., Genschik, P. (2004) Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* 16, 643-657.

White, J., Li, Z., Sardana, R., Bujnicki, M, J., Marcotte, M, E., Johnson, W, A. (2008) Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Mol. Cell Biol.* 28, 3151-3161.

Õunap, K., Käsper, L., Kurg, A., Kurg, R. (2013) The Human WBSCR22 Protein Is Involved in the Biogenesis of the 40S Ribosomal Subunits in Mammalian Cells. *PLoS ONE* 8(9): e75686.

Õunap, K., Leetsi, L., Matsoo, M., Kurg, R. (2015) The stability of ribosome biogenesis factor WBSCR22 is regulated by interaction with TRMT112 via ubiquitin-proteasome pathway. Under revision.

Young, E. J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S. J., Bechard, A. R., Chambers, J., Mount, H. T., Fletcher, P. J., Roder, J. C., Osborne, L. R. (2008) Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in *Gtf2ird1*-targeted mice. *Genes Brain Behav.* 7, 224-34.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/5486> Külastatud 13.05. 2015

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Wbscr22> Külastatud 10.05.2015

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2107> Külastatud 11.05.2015

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N6F8> Külastatud 12.05.2015

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Külastatud 12.05.2015

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Heilike Toming

(sünnikuupäev: 05.08.1993)

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

„rRNA metüültransferaas WBSCR22 ja TRMT112 interaktsiooni uurimine imetaja rakkudes“, mille juhendaja on *MSc* Kadri Õunap ning *PhD* Reet Kurg

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2016** autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 25.mai 2015