

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Molekulaarbioloogia õppetool

Kaspar Reier

Ribosoomivalkude vahetus *Escherichia coli* rakkudes

Magistritöö

(30EAP)

Juhendaja: Ph.D Aivar Liiv

Tartu 2016

Infoleht

Ribosoomivalkude vahetus *Escherichia coli* rakkudes

Kaspar Reier

Ribosoomid viivad läbi valkude sünteesi kõikides elusorganismides. Muutused ribosoomi struktuuris on haruldased ning nende mõjud tema efektiivsusele on tugevad. Valguvahetuse jälgimine *in vivo* tingimustes on vajalik selleks, et mõista selle rolli eluslooduses. Käesoleva töö raames kirjeldatakse meetodit, mille abil näidatakse ribosoomivalkude vahetust erinevates rakkude kasvufaasides *in vivo* tingimustes. Töö põhjal järeldatakse, et enamus ribosoomivalke on võimelised vahetuma ribosoomides.

Märksõnad: ribosoom, valkudevahetus, *in vivo*, mass-spektromeetria, SILAC

CERCS kood: P320; Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Ribosome protein Exchange in *Escherichia coli* cells

Kaspar Reier

Ribosomes catalyze protein synthesis in all living organisms. Changes in ribosome structure are rare and their effect on the ribosome efficiency is strong. Observing protein exchange *in vivo* conditions is necessary, in order to understand its role in life. In this thesis I describe a method, which is used to show protein exchange in different cells growth phases under *in vivo* conditions. I conclude that majority of ribosome protein are able to exchange in ribosomes.

Keywords: Ribosome, Protein exchange, *in vivo*, mass-spectrometry, SILAC

CERCS code: P320; Nucleic acids, protein synthesis

1 SISUKORD

1	SISUKORD	3
2	KASUTATUD LÜHENDID	5
3	SISSEJUHATUS	6
4	VALDKONNA ÜLEVAADE	7
4.1	Ribosoom	7
4.1.1	50S alamühik	8
4.1.2	30S alamühik	11
4.1.3	Ribosomaalsed valgud	12
4.1.4	Ribosoomide biogenees	13
4.1.5	Alamühikute vahelised sillad	13
4.1.6	Ribosoomivalkude vahetus	13
4.2	Proteoomika ja mass-spektromeetria	15
4.2.1	Proteoomika	15
4.2.2	Mass-spektromeetria	16
4.2.3	Valkude analüüs mass-spektromeetrias	17
4.2.4	Kvantitatiivne massi-spektromeetria	19
5	EKSPERIMENTAALNE OSA	23
5.1	Töö eesmärk	23
5.2	Materjal ja meetodika	24
5.2.1	Baktertüved ja plasmiidid	24
5.2.2	Reagendid ning kitid	24
5.2.3	Kontsentraatorid	24
5.2.4	Puhvrid ja lahused	24
5.2.5	Söötmed	25
5.2.6	Seadmed	25
5.2.7	„Raske“ säilituskultuuride tegemine	25
5.2.8	Valkude märgistamine rakkudes	26
5.2.9	70S ribosoomide eraldamine rakkudest	26
5.2.10	70S+tag ribosoomide kromatograafiline puhastamine	26
5.2.11	Proovide ettevalmistamine massi-spektromeetria jaoks	27
5.2.12	Massi-spektromeetria andmete töötlus ning analüüs	27

5.2.13	23S+tag rRNA ekspressiooni ja repressiooni kontroll	27
5.3	Tulemused.....	30
5.3.1	Eksperimendiks vajaliku rakutüve konstrueerimine.....	32
5.3.2	<i>pBAD-t ARA</i> ekspressioonisüsteemi iseloomustamine.....	33
5.3.3	Valkudevahetus ribosoomide eraldamise käigus.....	35
5.3.4	<i>De novo</i> sünteesitud ribosoomivalkude lülitumine vanadesse 70S ribosoomidesse	43
5.3.5	Erineva märkega valkude osakaal proteoomis	50
5.4	Arutelu	57
6	KOKKUVÕTE.....	60
7	SUMMARY	61
8	TÄNUSÕNAD	62
9	KASUTATUD KIRJANDUS	63
10	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks 69	

2 KASUTATUD LÜHENDID

MS – Massi-spektromeetria

RNA – (inglise keeles *ribonucleic acid*) Ribonukleiinhape

rRNA – ribosomaalne ribonukleiinhape

mRNA – (inglise keeles *messenger ribonucleic acid*)

PTC – (inglise keeles *peptidyl transferase center*) Peptidüültransferaasne tseenter

PNK – (inglise keeles *Polynucleotide Kinase*) polinukleotiidi kinaas

NTD – (inglise keeles *N-terminal domain*) N-terminaalne domeen

CTD – (inglise keeles *C-terminal domain*) C-terminaalne domeen

ESI – (inglise keeles *electrospray ionization*) Elektropihustusionisatsioon

EI – Elektron ionisatsioon

LTQ – (inglise keeles *linear trap quadrupole*) Lineaarne kvadrupool-ioonlõks

LC – (inglise keeles *Liquid Chromatography*) Vedelik-kromatograafia

LC-MS – (inglise keeles *Liquid Chromatography Mass spectrometry*)

SILAC (inglise keeles – *Stable Isotope Labeling by Amino acids in a cell Culture*)

UTP – (inglise keeles *Uridine-5'-triphosphate*) Uridiin-5'-trifosfaat

3 SISSEJUHATUS

Ribosoomid on valk-RNA kompleksid, mis esinevad kõigis elusorganismides, kus nad viivad läbi valkude biosünteesi ehk translatsiooni. *Escherichia coli* ribosoom sisaldab endas 3 ribosomaalset RNA-d ning 54 ribosomaalset valku. Ribosoomi struktuur on klassikalise arusaama järgi väga stabiilne ning vähe muutuv. Samas on näidatud, et raku elutingimuste muutumisel on võimalik ribosoomide valgulise koostise muutumine. Valgulise koostise muutus võib endas sisaldada nii valkude modifikatsiooni kui ka valkudevahetust.

Valkudevahetust ribosoomides on uuritud varasemalt nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustel. Nende andmete põhjal on näidatud vahetuse võimalikus, kuid mitte selle mõju ribosoomidele. Sellest tulenevalt on muutunud oluliseks mitte ainult valgudevahetuse jälgimine, vaid ka selle mõju kirjeldamine ribosoomide funktsionaalsusele.

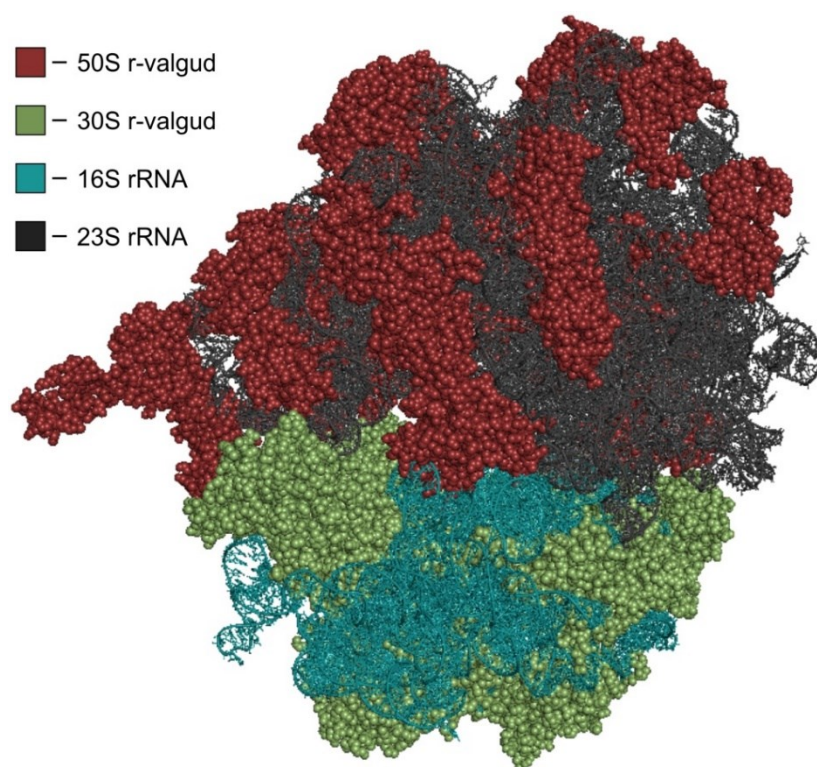
Selle töö teemaks on ribosoomivalkude vahetuse jälgimine ning iseloomustamine *in vivo* tingimustel. Magistritöö eesmärgiks on leida meetod ribosoomivalkude vahetuse jälgimiseks *in vivo* tingimustel ning läbi selle kirjeldada valgudevahetust ribosoomides. Eesmärgi saavutamiseks analüüsitakse ribosoomide valgulise koostise muutusi ajas, erinevates raku kasvufaasides.

Magistritöö kirjanduse ülevaade on jagatud kaheks peatükiks. Töö esimeses peatükis antakse ülevaade ribosoomi struktuuri, funktsioon ning ribosomaalsete valkude omadustest. Teises osas käsitletakse mass-spektromeetriaal põhinevat proteoomikat ning selle eritehnika, SILAC, kasutamist selles töös.

4 VALDKONNA ÜLEVAADE

4.1 Ribosoom

Ribosoom on RNA-valk kompleks, mis viib läbi peptiidahela sünteesi aminohapetest, mRNA järjestuse alusel. (Noller ja Nomura, 1996) *Escherichia coli* ribosoomi läbimõõt on ligikaudu 250 öngstromi (Schuwirth et al., 2005) ning tema molekulmass on 2,5 MDa (Ramakrishnan ja Moore, 2001). Ribosoom koosneb kahest alamühikust: suur alamühik 50S ja väike alamühik 30S, mis koos mRNA, tRNA ning translatsioonifaktoritega, moodustavad funktsionaalse ribosoomi 70S-i (Hennelly et al., 2005; Ramakrishnan, 2002). 30S, 50S ja 70S on svedbergi ühikud, mis iseloomustavad partikli sedimentatsiooni kiirust tsentrifugaaljõuväljas. Prokariootsetes 70S ribosoomides on RNA-valk suhe ligikaudu 2:1-le ja koosneb 3-st RNA molekulist: 5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA ning 55 r-valgust (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wittmann, 1982).

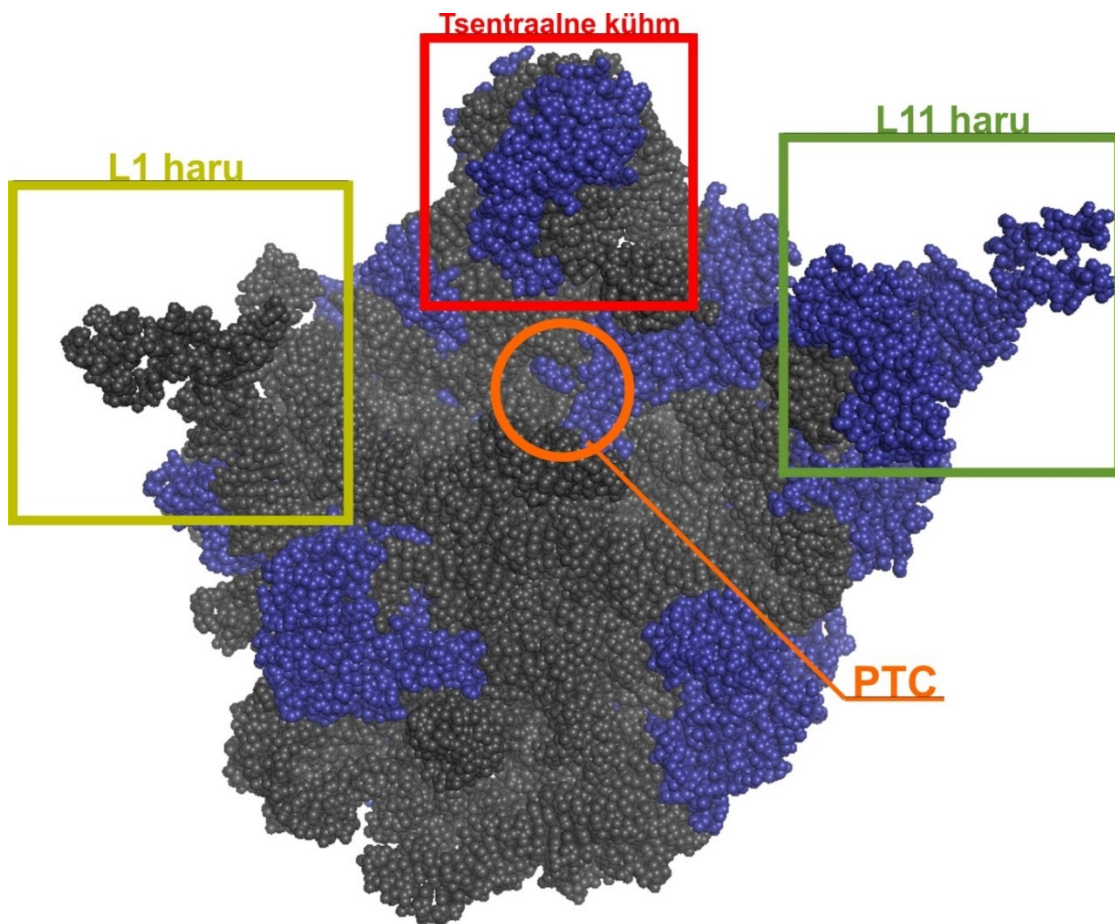


Joonis 1. *Escherichia coli* 70S ribosoomi ruumiline struktuur. Punaselt 50S alamühiku r-valgud, heleroheliselt 30S alamühiku r-valgud, tumeroheliselt 30S alamühiku 16S rRNA ning mustalt 50S alamühiku 23S rRNA. Joonis kohandatud struktuurist (PDB - 4YBB) (Noeske et al., 2015).

4.1.1 50S alamühik

Suur alamühik sisaldab endas 5S ja 23S rRNA-d ning 33 r-valku (Wittmann, 1982). R-valgud koos rRNA-ga on vajalikud 50S tertsiaalstruktuuri moodustumiseks ning selle konformatsiooni stabiliseerimiseks (Klein et al., 2004). 23S rRNA on 2904 nukleotiidi pikkune järjestus (Wittmann, 1982), mis jagatakse sekundaarstruktuuri alusel 6-ks domeeniks. 23S rRNA-s ei ole individuaalsed domeenid jaotunud ühtlaselt üle rRNA järjestuse, vaid moodustuvad ainult ruumilises konformatsioonis (Ban et al., 2000). Lisaks esineb 50S ka 5S rRNA (Wittmann, 1982). 5S rRNA koosneb 120 nukleotiidist ning teda defineeritakse mõnikord kui 50S rRNA 7-nda domeenina (Wittmann, 1982). Ribosoomi suures alamühiku valke nimetatakse L1-L36 (inglise keeles *Large* lüh. L). 50S-is esineb 32 r-valku ühes korduses ning r-valku L7/L12-te neljas korduses (Wilson ja Nierhaus, 2005). Algul defineeriti L8 ja L26 eraldi valkudena, kuid tegelikkuses on L8 sama mis (L7/L12)₄L10 kompleks ning L26 on ribosoomi väikse alamühiku valk S20 (Wittmann, 1974).

50S tertsiaalstruktuuris eristatakse kolme elementi: L1-haru, tsentraalne kühm ning L11-haru. (joonis 2) (Schuwirth et al., 2005; Yusupov et al., 2001). Tsentraalne kühm, mis sisaldab endas 5S rRNA-d ning r-valke L5, L18, L25 ja L31, asub alamühikude kokkupuutepinnalt vaadatuna täpselt 50S peal. Sellest kesksest struktuurist lähtuvalt vasakule jääb L1-haru, mis koosneb L1 valgust ning paremale L11-haru, mis sisaldab valke L11, L10 ning tetrameeri (L7/L12)₄ (Joonis 2) (Selmer et al., 2006; Yusupov et al., 2001).

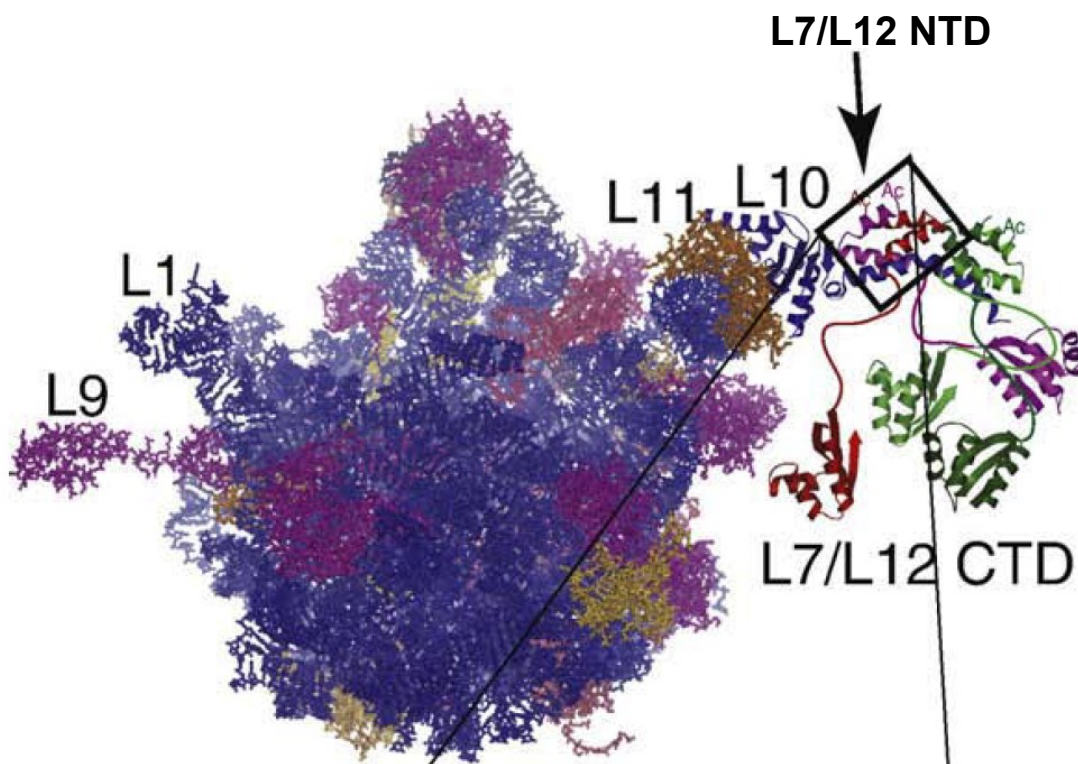


Joonis 2. 50S struktuursed elemendid. *E.coli* 50S alamühik vaatega alamühikute vaheliselt platoolt. Välja toodud struktuursed üksused: L1-haru (kollane), L11-haru (roheline) ja tsentraalne kühm (punane). Joonega näidatud PTC (oranz) paiknemine 50S-is. Joonis kohandatud struktuurist (PDB - 4YBB) (Noeske et al., 2015).

Ribosoomis katalüüsib peptiidsideme moodustumist 50S-is asuv peptidüültransferaasne tsenter (inglise keeles *peptidyltransferase center* lüh. PTC). PTC asub 50S alamühiku keskel (joonis 2). PTC avastamisel arvati, et katalüütilist rolli mängivad valgud ja rRNA on struktuuri stabiliseeriva rolliga. Tänapäeval on arvamus vastupidine: katalüütilist rolli mängib hoopis rRNA ning valkudel on peamiselt struktuurse konformatsiooni hoidmise roll. Selline muutus ribosoomi uurijate seas tulenes katalüütiliste RNA-de avastamisest. (Chambliss et.al, 1980) Samas arvestades kui tihedalt on omavahel seotud RNA ning valgud ribosoomis, on võimatu vaadata kahte täiesti üksteisest eraldi.

50S alamühikus on L11-haru otsas paiknev $(L7/L12)_4L10$ kompleks, mille ülesandeks on siduda ribosoomi ümbritsevast keskkonnast translatsioonifaktoreid. (Helgstrand et al., 2007) Lisaks sellele paikneb selle L11 haru all sartsiin-ritsiin ling, mis osaleb GTPaaside aktivatsioonil translatsiooni käigus (Rodina et al., 2000). *Escherichia coli*-s koosneb

(L7/L12)₄L10 kompleks kahest L7/L12 dimeerist, mis on seotud ribosoomivalgu L10-ga (Österberg ja Sjöberg, 1977). (L7/L12)₄L10 kompleks puhul on näidatud L7/L12 dimeeride vahetumist ribosoomide vahel. (Deroo et al., 2012)

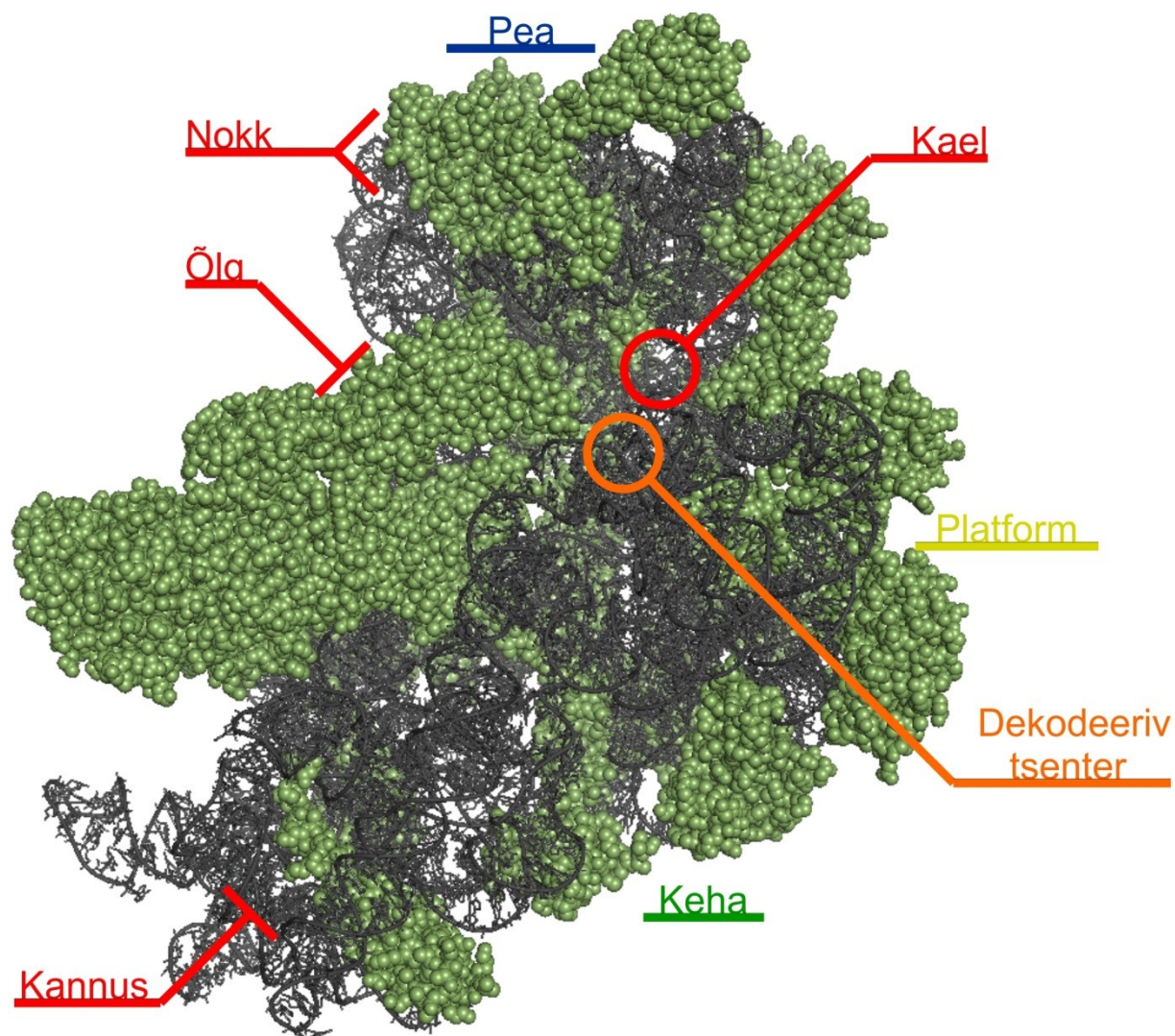


Joonis 3. L7/L12L10 kompleksi hüpoteetiline struktuur. Vaade 50S-le alamühikute kokkupuute pinnalt. Vasakul toodud valgud L1 ja L9, paremal näidatud L11, koos (L7/L12)₄L10 kompleksi modelleeritud paiknemisega. Joonis kohandatud artiklist (Gordiyenko, et al., 2008).

50S alamühikus paikneb PTC algav tunnel, mida mööda sünteesitav peptiidahel ribosoomist väljub. Väljumistunneli pikkus on ligikaudu 100 Å ning läbimõõt 25 Å (Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007). Tunneli seinad sisaldavad nii rRNA-d kui ka r-valke ning on mittekleepuvate omadustega, et võimaldada kõikide peptiidahelate väljumine. Samas, teatud tingimustel, on võimalik peptiidide kinnihoidmine tunnel poolt, et tagada sünteesi regulatsiooni. (Gabashvili et al., 2001; Moore ja Steitz, 2003).

4.1.2 30S alamühik

Väike alamühik sisaldab endas 16S rRNA-d ning 21 r-valku (Wittmann, 1982). 16S rRNA on 1542 nukleotiidi pikk ning jagatakse 30S alamühiku tertsiaalstruktuuri alusel nelja domeeni.



Joonis 4. 30S eristuvad struktuursed elemendid. *E.coli* 30S alamühik vaatega alamühikute vaheliselt platoolt. Joonisel toodud välja morfoloogilisemalt suuremad piirkonnad: keha, platvorm ja pea ning väiksemad struktuursed üksused: kael, kannus, nokk ja õlg. Lisaks sellele on näidatud dekodeeriva tsentri paiknemine 30S alamühikus. Joonis kohandatud struktuurist (PDB - 4YBB) (Noeske et al., 2015).

16S rRNA sekundaarstruktuuri neli domeeni nimetatakse 5', keskmine, 3' mažoorne ja 3' minoorne domeen. Need domeenid omakorda jaotuvad joonisel 4 toodud suuremate struktuursete elementide vahel: 5' ja 3' minoorne domeen moodustavad keha, keskmine

domeen moodustab platvormi ning 3' mažoorne domeen on peas (Wimberly et al., 2000). Lisaks on joonisel 4 toodud ka väiksemad 30S struktuuris eristuvad elemendid: kael, kannus, nokk ja õlg (Wimberly et al., 2000).

30S alamühik täidab ribosoomi töös kahte tähtsat rolli: mRNA sidumine ja korrektse koodon anti-koodon interaktsiooni tagamine (Wimberly et al., 2000; Yusupova et al., 2001). Kodeeritava mRNA seondumine 30S-ile on vahendatud läbi Shine-Dalgarno järjestuse, mis paikneb mRNA 5' UTR-s ning anti-Shine-Dalgarno järjestuse, mis asub 16S rRNA 3'otsas (Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007; Yusupova et al., 2001). mRNA korrektne paigutumine 30S on vajalik õige lugemisraami määramiseks ning initsatsioonikompleksi moodustumiseks translatsioonil. Koodon – antikoodon interaktsiooni kvaliteedikontroll toimub dekodeerimistsentris, mille paiknemine 30S-is on näidatud joonisel 4 (Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007; Selmer et al., 2006). Korrektne koodon – antikoodon seondumine on vajalik valgu õige aminohappelise järjestuse tagamiseks (Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007; Selmer et al., 2006).

4.1.3 Ribosomaalsed valgud

Ribosoomivalkude üheks peamiseks ülesandeks on stabiliseerida ribosoomi tertsiaalstruktuuri. Praeguseks on teada kõikide ribosoomivalkude aminohappeline järjestus ning nende ruumiline paiknemine ribosoomis (Wittmann, 1982; Ban et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Ribosoomivalkude molekulmassid jäävad enamjaolt alla 33kDa ehk tegemist on väikeste valkudega. Erandiks siinjuures on väikese alamühiku valk S1, mille molekulmass on $\approx 61,2\text{kDa}$ (Wilson ja Nierhaus, 2005). Aminohapetest on enim esinevad r-valkudes arginiin ja lüsiin, mis moodustavad 20% kõigist aminohapetest r-valkudes (Noller ja Nomura, 1996). Sellest tulenevalt on enamik ribosoomivalkudest aluselised ja positiivse laenguga. Positiivse laenguga aminohapete rohkus r-valkudes on kooskõlas nende struktuurse funktsiooniga, milleks on negatiivselt laetud rRNA fosfaatselgroo stabiliseerimine. Erandiks on siin juures valgud S1, S6, ja L7/L12, mis on ainsad happelise omadustega ribosomaalsed valgud ning mille primaarjärjestus sisaldab rohkem kui 10% glutamiinhapet (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wittmann, 1982).

Ribosoomi ruumilise konformatsiooni põhjal saab jagada r-valgud kolme rühma: globulaarsed, struktuuritu jätkega globulaarsed ning struktuuritud valgud. Ribosoomivalkude globulaarsed domeenid asuvad peamiselt ribosoomi pinnal ning struktuuritud domeenid paiknevad rRNA vahel, kus nad saavutavad oma lõpliku konformatsiooni, interakteerudes

ning stabiliseerides rRNA fosfaat selgroogu (Ban et al., 2000). Globulaarsed ja struktuuritud domeenid erinevad ka aminohappelises koostises: globulaarsed domeenid sisaldavad glutamiinhapet (9,9%),alaniini (9,8%), valiini (9,5%) ja asparagiinhapet (8,6%) ning struktuuritud domeenid enamjaolt glütsiini (13,7%), arginiini (15,9%) ja lüsiini (12,7%). Siinjuures tuleb mainida, et ka globulaarsetes domeenides leidub arginiini ja lüsiini kokku ligi 12% (Klein et al., 2004).

4.1.4 Ribosoomide biogenees

Ribosoomide biogenees on mitme etapiline protsess, mis hõlmab kolme rRNA ja 54 r-valku, rRNA-de ja valkude modifikatsiooni ja nende assambleerumist korrektses järjekorras. Ribosoomid võtavad enda alla ligikaudu 30% rakkude kuivmassist ja biogenees kasutab umbes 40% raku poolt toodetud energiast. (Liiv, 1998) Prokarüootsete ribosoomide biogeneesiks on vaja 60 biomolekuli koekspressioon ning nende korrektne assambleerumine, mis on reguleeritud mitmete regulatsioonimehhanismidega (Nomura et al., 1984; Zengel ja Lindahl, 1994; Condon et al., 1995). *E.coli*-s on varasemalt näidatud, et ribosoomivalk L24 on vajalik 50S alamühiku biogeneesi initsiatsioonil optimaalsetel temperatuuridel (Herold ja Nierhaus, 1987). Selle deleteerimisel on tugev efekt raku kasvule läbi raskendatud 50S assambleerimise (Herold et al., 1986).

4.1.5 Alamühikute vahelised sillad

Funktsionaalsetes 70S ribosoomides on 50S ja 30S omavahel seotud üksteisega läbi alamühikute vaheliste sildade, mis jagatakse oma interaktsioonide poolest kolme gruppi: RNA-RNA sillad, RNA-valk sillad ning valk-valk sillad (Gao et al., 2003). Kõige jäigema interaktsiooniga on RNA-RNA sillad, mis asuvad peamiselt tsentraalselt alamühikute vahel (Gao et al., 2003) Jäikuselt teisena tulevad RNA-valk sillad, mis paiknevad rohkem perifeersemtalt ning läbivad suuremaid konformatsioonilisi muutusi (Zhang jt., 2009). Kolmandaks sillatüübiks on valk-valk sillad. *E.coli*-i 70S ribosoomides on ainult üks valk-valk sild, mis on vahendatud L31 ning S13 valgu poolt ning asub ribosoomis perifeerselt (Gao jt., 2003).

4.1.6 Ribosoomivalkude vahetus

Escherichia coli proteoomis on suur osakaal ribosoomivalkudel (Ishihama et al., 2008). Individuaalsete ribosoomivalkude kogus rakus on ühesugune, välja arvatud valkude L7/L12 ja L10 puhul. Klassikalise arusaama järgi on ribosoomide koostis rakkudes enamjaolt

muutumatu (Robertson et al., 1977). Samas näidati juba 1977 aastal avaldatud töödes, et osad valgud on võimelised ribosoomide vahel vahetuma *in vivo* (Robertson et al., 1977; Subramanian ja van Duin, 1977). Nende valkude tuvastamise juures oli erinevaid tulemusi: Robertsoni uurimisgrupp leidis, et vahetuvate valkude alla kuuluvad S21, L9 ja L33, Subramaniani grupp, et ainult valk L9 on vahetuv *in vivo* tingimustel. Siinjuures tuleb ära mainida, et mõlemad grupid kasutasid sarnaseid, kuid eristatavaid lähenemisi küsimuse lahendamiseks (Robertson et al., 1977; Subramanian ja van Duin, 1977). Lisaks sellele näidati, et paljud ribosoomivalgud olid nii kergesti vahetuvad, et ribosoomi ei olnud võimalik puhastada rakkudest ilma nende vahetuseta (Robertson et al., 1977; Subramanian ja van Duin, 1977). Nendeks valkudeks defineeriti, kas S1, S2, L7/L12, L10 ja L33, või S1, S2, L7/L12, L10, L11 ning L26 vastavalt uurimisgrupile (Robertson et al., 1977; Subramanian ja van Duin, 1977).

2009 aastal J. Remme ja kolleegide poolt avaldatud töös uuriti ribosoomivalkude vahetust nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustel. *In vivo* katsetes näitasid nad ribosoomi valkudevahetust rakkudes, mis olid kasvatatud sügavasse statsionaarsesse kasvufaasi. Sealt eraldatud rakkudes nägid nad, et valgud L1, L5, L10, L11, L30, L31, S2 ja S5 vahetusid suurel määral ning valgud L9, L13, L15, L16, L17, L19, L22, S4 ja S9 vahetusid vähesel määral (Pulk et al., 2010). Lisaks sellele, vaadeldi samas töös valkudevahetust ka *in vitro* tingimustel. Tulemused nendes katsetes näitasid, et valgud L1, L9, L10, L11, L7/L12, L20, L31 ja L33 vahetusid ribosoomides *in vitro* (Pulk et al., 2010). Lisaks sellele näidati, et r-valkude keemilisel modifitseerimisel sai sellisel moel inaktiveeritud ribosoomide translatsioonilist aktiivsust taastada, lisades puhastatud r-valkude segu ribosoomidele (Pulk et al., 2010).

Valkudevahetust on uuritud ka ribosoomide biogeneesi ajal. 2010 aastal avaldati töö, kus näidati, et ribosoomide biogeneesil kasutati nii *de novo* sünteesitud ribosoomivalke kui ka juba funktsioneerivates ribosoomides paiknevaid ribosoomivalke (Sykes et al., 2010). Töös näidati, et 30S alamühiku biogeneesi vaheproduktis 21S oli rikastatud [¹⁵N] märgitud valkudega, mida leidis ainult eelnevalt assambleeritud alamühikutest (Sykes et al., 2010).

4.2 Proteoomika ja mass-spektromeetria

4.2.1 Proteoomika

Proteoom on kõikide genoomis, rakus, koes või organismis ekspresseeritavate valkude kogum (Wilkins, 1995; Wilkins et al., 1996). Teadusharu, mis tegeleb proteoomide uurimisega, kutsutakse proteoomikaks (Wilkins et al., 1996). Proteoomika alla kuulub valkude struktuuri, lokaliseerimise, modifikatsioonide, kontsentratsioonide ning interaktsioonide uurimine. Üks enim kasutatud uurimismeetodeid proteoomikas on mass-spektromeetria (MS). MS-i abil on võimalik uurida kompleksseid valkude segusid, mis on raskendatud teiste proteoomikas kasutatavate meetodite abil. Tänu sellele on MS kasutamine kogunud populaarsust proteoomikute seas. (Shao and Lam, 2016).

Proteoomikas kasutatakse valkude uurimiseks kahte põhimõtteliselt erinevat lähenemist: *top-down* ja *bottom-up*. *Top-down* lähenemisel uuritakse terviklike valke. (Catherman, 2014) *Bottom-up* proteoomika juhtumil aga lagundatakse valgud proteolüüsi teel peptiidideks, mida kasutatakse edasiseks analüüsis (Han et al., 2008; Walther ja Mann, 2010). Mõlemal lähenemisel on omad eelised ja puudused:

- *top-down* proteoomika:
 - on võimalik uurida väikseid valke, mille proteolüütiline lagundamine ei ole võimalik või mõistlik
 - on raske kasutada komplekssete valgusegude puhul.
 - säilib kogu info modifikatsioonide kohta
 - on kasutatav kuni 30kDa valkude puhul, tingimuste optimeerimisel kuni 60kDa
- *bottom-up* proteoomika
 - sobib paremini keerukate segude uurimiseks *shot-gun* meetodil
 - peptiide on kergem fraktsioneerida ning kromatograafiliselt lahutada kui täispikki valke
 - on täpsem valkude kvantifitseerimisel kui *top-down* proteoomika
 - ei ole võimalik identifitseerida kõiki modifikatsioone valkudes
 - suure tõenäosusega ei ole võimalik saada valgu järjestuse 100% kaetust identifitseeritud peptiididega

4.2.2 Mass-spektromeetria

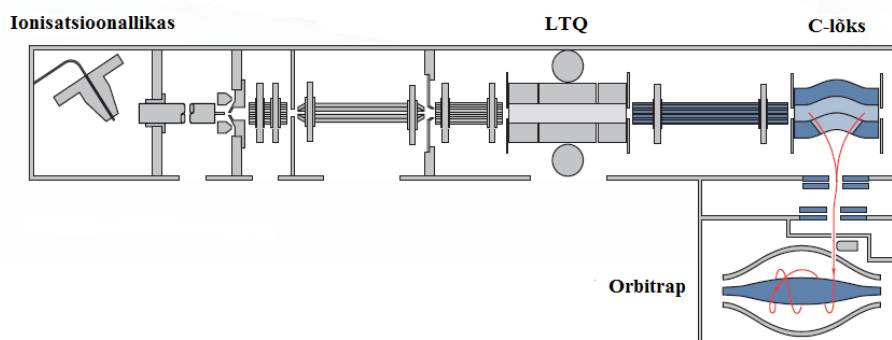
Mass-spektromeetria (MS) on meetod, mille käigus mõõdetakse laenguga osakeste (ioonid) mass/laeng (m/z) väärtus (Sparkman, 2000). MS abil on võimalik eristada osakesi nende m/z väärtuste abil, alustades aatomi isotoopidest ning lõpetades keerukate biomolekulidega. Kuigi MS kasutatakse tänapäeval enamasti kui analüütilise detektorina, on näited ka selle kasutamisest osakeste eraldamiseks üksteistest (Parkins, 2005). MS-i on kasutatud osakeste analüüsiks juba 20 sajandi esimesest poolest, kuid muutus relevantseks bioloogiliste molekulide puhul alles 20 sajand lõpus.

4.2.2.1 Mass-spektromeetri ehitus

Mass-spektromeetri töös on olulised kolm elementi: ionisatsiooniallikas, massianalüsaator ning detektor (joonis 5). Kuna MS instrumendid erinevad paljuski, siis edasises keskendume masina ehitusele, mida kasutati selles töös (joonis 5). Selleks, et osakest oleks võimalik uurida mass-spektromeetria abil, on vajalik osakese ioniseerimine (Sparkman, 2000). Ionisatsiooniallikaid on palju ning jagatakse nende ionisatsioonenergia järgi kaheks: karmid (inglise keeles „hard“) ja pehmed (inglise keeles „soft“). Enim levinud karmiks ionisatsiooniallikaks on elektron ionisatsioon (EI) ning pehmeks elektropihustus-ionisatsioon (inglise keeles *electrospray ionization*, lühendatult ESI) (Edmonds and Smith, 1990). Karmide ioniseerimismeetodite puhul kasutatakse kõrgemaid ionisatsioonenergiasid, millega kaasneb keerukate molekulide fragmentatsioon (Sparkman, 2000). Pehmed ionisatsioonimeetodid rakendavad madalaid ionisatsioonenergiasid, mis aitavad säilitada keerukamate molekulide struktuuri (Edmonds and Smith, 1990). Bioloogilised molekulid on komplekse struktuuri ning kõrge molekulmassiga osakesed, mille tõttu ei ole soovitatav nende uurimiseks kasutada karne ionisatsioonimeetodeid.

Tänapäeval on ESI üks enim kasutatavaid pehme ionisatsioonimeetodidest (Fenn et al., 1989). ESI-t kasutati esimest korda bioloogiliste molekulide ioniseerimiseks 1984. aastal (Yamashita and Fenn, 1984). ESI sobib bioloogiliste molekulide ionisatsiooni meetodiks mitmel põhjusel. Esiteks tekivad ESI käigus enamasti mitmelaengulised ioonid, mis on vajalikud suuremate molekulmassiga osakeste detekteerimiseks MS-i abil (Yamashita and Fenn, 1984). Teiseks on ESI võimeline töötama atmosfääri rõhu juures, mis võimaldab tema abil ühendada otse vedelikkromatograafia ja mass-spektromeetria seadmed. Kolmandaks on ESI abil võimalik ioniseerida lahuses olevaid molekule, mis on täiesti hädavajalik valkude uurimisel MS-i abil,

sest valke on äärmiselt keeruline viia gaasilisse faasi, ilma keemiliste modifikatsioonideta. Kõik need kolm omadust on tähtsad valkude uurimiseks MS-i abil.



Joonis 5. *LTQ-Orbitrap* massispektromeetri ülesehitus. Uuritav aine ioniseeritakse ning suunatakse lineaarsesse kvadrupool-ioonlõksu (LTQ) (massianalüsaator). LTQ-st suunatakse sobiva m/z väärtusega ioonid C-lõksu, kus neid hoiustatakse enne nende suunamist orbitrapi (massianalüsaator/detektor). Joonis kohandatud tootja (*Thermo Scientific*) brošüürist.

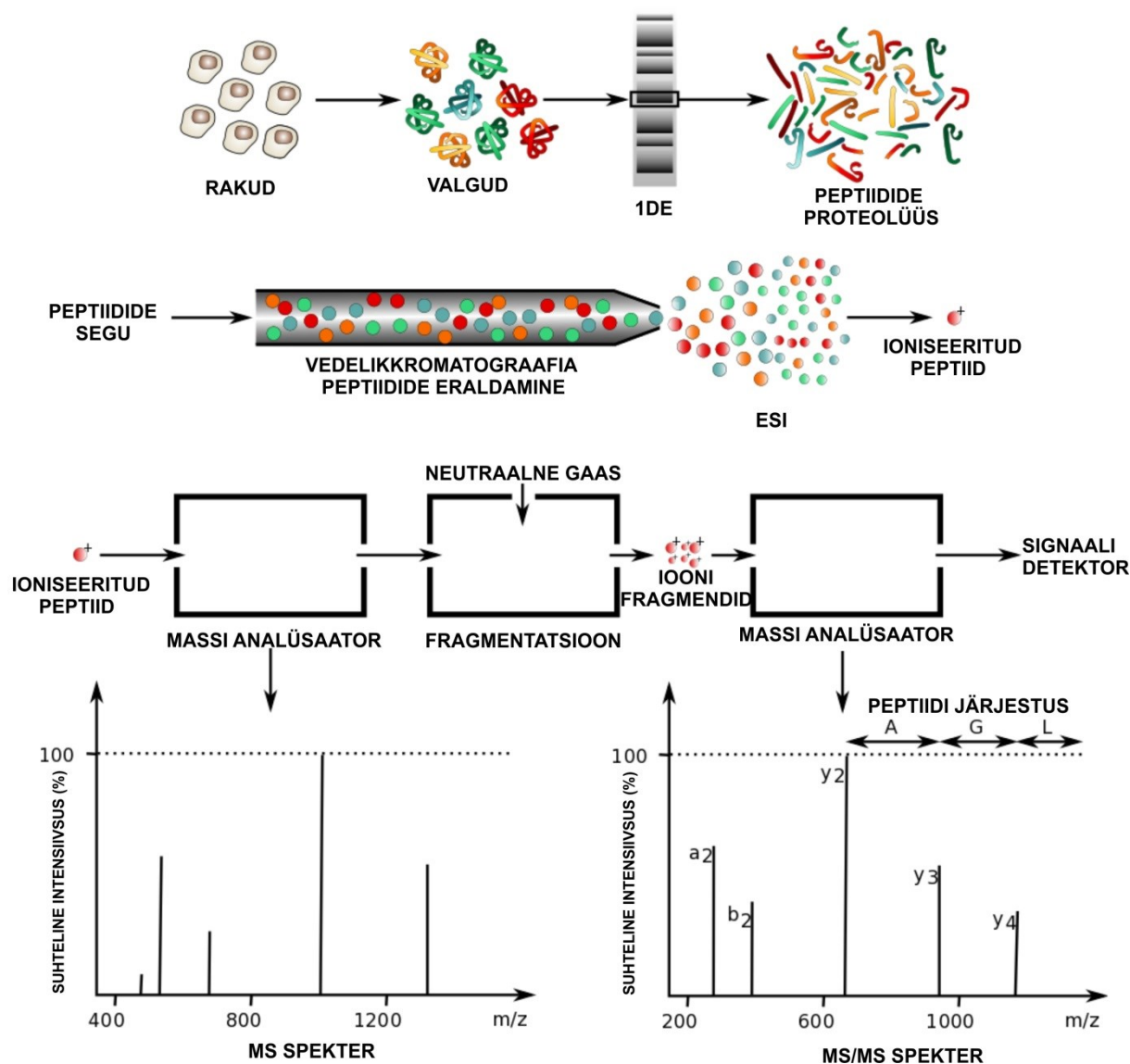
Ionisatsiooniallikast edasi liigub analüüsiv osake massianalüsaatorisse. Massianalüsaatorid on seadmed, mis mõõdavad osakese mass/laeng (m/z) väärtust. Massianalüsaatorid on seadmed, mis rakendavad elektri- või magnetvälja selleks, et detekteerida osakese (m/z) väärtust. Osakese mass ja laeng mõjutavad tema liikumist elektri/magnetväljas. Seega, kui teame väljade parameetreid ning oskame detekteerida muutusi nendes, on võimalik identifitseerida osakeste m/z väärtusi. Selles töös kasutati LTQ (inglise keelest *Linear Trap Quadrupole*) ja Orbitrapi massianalüsaatorid sisaldavat hübriid-instrumenti.

Jooniselt 5 on näha, et ioonid liiguvad peale ioniseerimist kõigepealt LTQ-sse. LTQ on kvadrupool-ioonlõks, kus toimub ionide kogumine, fragmenteerimine ning filtreerimine. Edasi liiguvad ioonid C-lõksu, milles hoiustatakse ioone enne nende ühtselt suunamist orbitrapi. Orbitrap on kõrge lahutusvõimega ja suure massitäpsusega massianalüsaator, kus toimub ionide detekteerimine ning kvantifitseerimine läbi nende võnkesageduse ja amplituudi mõõtmise. Iooni võnkesagedusest ja amplituudist tuletatakse *Fourier* integraalteisenduste abil ionide m/z väärtused ja suhtelised intensiivsused (Makarov et al., 2006).

4.2.3 Valkude analüüs mass-spektrometrias

Valgud on suured biomolekulid, mida on ilma eelneva proteolüütilise töötluseta enamasti raske uurida MS-i abil. Joonisel 6 on toodud üldine tööskem valkude uurimiseks, kasutades

bottom-up lähenemist ning mass-spektromeetriat. Esimeseks etapiks on uuritavast proovist valkude eraldamine. Edasi viiakse läbi valkude proteolüütiline töötlus, mille käigus lõigatakse valgud süstemaatiliselt peptiidideks. Selles etapis on üheks enim kasutatud proteaasiks trüpsiin, kuna ta on kergesti puhastatav ja kõrge spetsiifilisusega, lõigates peptiide ainult aminohapete arginiin ja lüsiin karboksüül-terminaalsest otsast. Samas on kasutatavate proteaaside nimekiri pikem, sõltuvalt nõutud spetsiifikast. (Tsiatsiani and Heck, 2015) Kui valgud on proteolüütiliselt töödeldud, eraldatakse peptiidid üksteisest kasutades pöördfaasvedelik-kromatograafiat. Siinjuures tulevad mängu ESI kasulikud omadused: nimelt on võimalik ühendada ESI vahendusel mass-spektromeeter otse vedelik-kromatograafia kolonni taha, ioniseerida eraldatud peptiidid reaalajas ja suunata edasi koheselt MS-i. Vastavat mass-spektromeetriat nimetatakse LC-MS-iks (inglise keelest *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* lüh. LC-MS). Peptiidide puhul aga esineb koheselt järgnev probleem: peptiid küll ioniseeritakse ning mõõdetakse tema massi ja laengu suhe m/z , aga enamasti ei ole see piisav, et üheselt identifitseerida peptiide kompleksetest segudest. Sellest tulenevalt kasutatakse järjestikulist MS-i (inglise keelest *Tandem-MS*). Järjestikune-MS täiendab tavapärast mass-spektromeetriat nii: esmalt mõõdetakse ioniseeritud peptiidi m/z väärtus (MS_1). seejärel fragmenteeritakse seesama peptiid ning määratakse tekkinud fragmentide m/z suhted ning intensiivsused (MS_2). Selle tulemusena tekib peptiidile spetsiifiline fragmenteerumismuster. MS/MS andmetest peptiidide identifitseerimiseks viiakse läbi andmebaasiotsing saadud fragmenteerumismustri vastu. Valkude uurimisel kasutatakse järjestikust-MS, mitte ainult peptiidide identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks andmebaasiotsingu vahendusel, vaid ka *de novo* sekveneerimiseks (Lu and Chen, 2004).



Joonis 6. MS/MS tööskem valkude uurimiseks. Etapid järgnevalt: (1) Valkude eraldamine rakkudest, (2) valkude lahutamine ja puhastamine 1D elektroforeesi näitel, (3) valkude proteolüütiline lagundamine peptiidideks, (4) peptiidide lahutamine, kasutades vedelik kromatograafiat ning ioniseerimine kasutades ESI-t, (5) ioniseeritud peptiidi m/z väärtuse määramine, (6) peptiidi fragmenteerimine, (7) fragmentide m/z väärtuse määramine, (8) fragmentatsiooni mustrianalüüs peptiidide identifitseerimiseks, võimaldab peptiidi *de novo* sekveneerimist. Joonis kohandatud (E.Barillot, *et al.*, 2012)

4.2.4 Kvantitatiivne massi-spektrometria

Kui valkude identifitseerimine MS-abil on enamasti lihtsasti teostatav, siis valgu koguse määramine proovis on märksa keerulisem. Kvantitatiivse MS-i abil on võimalik mõõta valkude suhtelisi ning absoluutseid koguseid segudes (Nikolov, 2012) Absoluutsel kvantifitseerimisel on tulemuseks valgu täpne kogus proovis (Nikolov, 2012). Selle

saavutamiseks on vajalik sisestandardi ja kalibreerimiskõvera kasutamine. Sisestandardina kasutatakse uuritava peptiide, mis on märgitud sünteetiliste isotoopidega, lisades neid uuritavasse proovi enne LC-MS/MS-i. Selle tulemusena elueeruvad nii märgitud kui ka uuritavas proovis olevad peptiidid ühel ajal ning analüüsitakse koos MS-is. Selleks, et saada uuritava peptiidi absoluutsed kogused proovis, võrreldakse saadud peptiidide intensiivsust sisestandardi omaga. Sellest arvutatakse uuritava peptiidi kogus proovis, kasutades eelnevalt koostatud sisestandardi kalibreerimiskõverat. Samas ei kasutata absoluutset kvantifitseerimist laialdaselt, sest nõuab suuremat täpsust MS-i aparatuurilt, mis ei ole saavutatav keerukamate valgu proovide analüüsiks. Suhtelisel kvantifitseerimisel võrreldakse valke referentsprooviga ning esitatakse uuritava valgu koguse muutus selle suhtes (Ong ja Mann, 2005).

4.2.4.1 Märgisevaba kvantifitseerimine

Märgisevaba kvantifitseerimine mass-spektromeetria abil on kasulik meetod keerukate valgusegude kirjeldamiseks. Üheks märgisevaba kvantifitseerimise eeliseks on selle võimekus analüüsida korraga kümneid erinevaid proove (Mallick ja Kuster, 2010), teiseks on selle lihtsus ning hind võrreldes keerukate ning kallite märgistamisprotokollidega (May et al., 2011). Märgisevaba kvantifitseerimise täpsus sõltub proovide puhastamiseks kasutatud meetodite efektiivsusest, ionisatsiooniefektiivsusest (maatriks-efekt) vms. (Chen, 2008). Arvestades märgisevaba kvantifitseerimise madalat täpsust ja tundlikust sobib ta eelkõige suuremate muutuste uurimiseks (Mallick ja Kuster, 2010).

4.2.4.2 Stabiilse isotoopmärke abil kvantifitseerimine

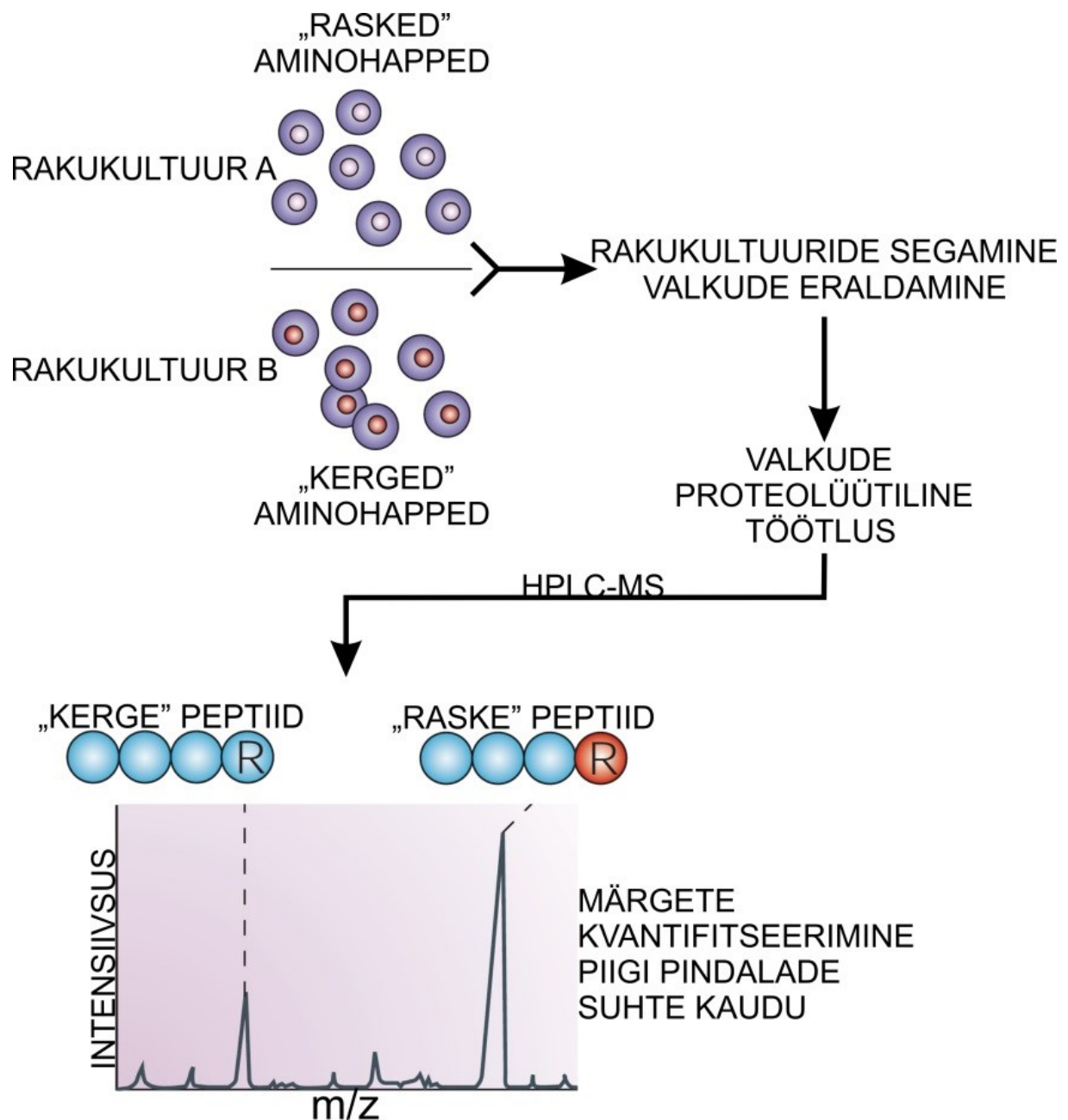
Selleks, et kvantifitseerida valkude koguseid MS-i abil, on enamasti vajalik valkude mass-märgistamine. Enamus valkude märkemeetodeid mass-spektromeetrias kasutavad aatomite stabiilseid isotoope, mille aatommass erineb tavapärasest ning mille esinemissagedus looduses on väike. Peamised valkude märgistamisel kasutatud isotoobid on ^2H , ^{13}C , ^{15}N ja ^{18}O . Isotoopidega märgistamisel luuakse kahest proovist identsete valkude vahel massinihe. Massinihe identsete peptiidide vahel võiks olla vähemalt 4 daltonit, et vältida looduslikest isotoopidest (^{13}C , ^{14}C) tingitud piikide kattumist. (Ong ja Mann, 2005). Stabiilsete isotoopide inkorporeerimiseks on mitmeid viise, kuid üks hõlpsamatest mehhanismidest on märke metaboolne lülitamine proteoomi koosseisu (Ong ja Mann, 2005).

SILAC (inglise keeles – *Stable Isotope Labeling by Amino acids in a cell Culture*) on isotoopmärget kasutav kvantifitseerimismeetod, mida kirjeldati esimest korda 2002 aastal

(Ong et al., 2002). Meetodi põhimõte seisneb stabiilsete isotoopide suhtes rikastatud aminohapete kasutamises, mille tõttu märgitud aminohappe aatommass erineb looduses esinevast. See erinevus on detekteeritav mass-spektromeetrias kui massinihkena, mille tulemusel on võimalik eristada peptiide vastavalt sellele, millise massiga aminohapet nad sisaldavad (joonis 7).

SILAC meetodi eelduseks on teatud aminohapete suhtes auksotroofsete rakutüvede kasutamine, mis on võimelised omistama vastavaid aminohappeid ainult väliskeskkonnast. Selle tulemusel on võimalik inkorporeerida raku valkude koosseisu stabiilseid isotoope sisaldavaid aminohappeid. Aminohapete märkimisel kasutatakse peamiselt ^2H , ^{13}C ja ^{15}N isotoope. SILAC aminohapete puhul on tähtis, et aminohapete vaheline massinihe oleks vähemalt 4 Da, et vältida looduses esineva süsiniku isotoopide piikide kattumist (Ong ja Mann, 2006). SILAC-i juures mängib tähtsat rolli mitte ainult märke lülitumine valkudesse, vaid ka nende ensümaatilise töötlus enne MS-i. Sellest tulenevalt kasutatakse enamasti aminohappeid, mis peale proteolüütilist töötlust oleksid igas peptiidis esindatud vähemalt ühes korduses (Ong et al., 2002).

Klassikaline SILAC katse vajab ülesehituselt rakukultuuri paralleelset kasvatamist kahel söötmel (joonis X). Rakukultuuri A kasvatatakse looduses enam levinud isotoopidega märgitud aminohapete juuresolekul ning rakukultuuri B „raskete“ isotoopidega märgitud aminohapete arginiin ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$) ja lüsiin ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$) juures. Vastavalt uuritavale küsimusele, muudetakse rakukultuuris A kasvutingimusi ja katse lõppfaasis, segatakse rakukultuurid omavahel. Sellise ülesehituse juures on võimalik vältida proovide töötlemisel meetodist tingitud kvantifitseerimise vigu (Ong et al., 2002).



Joonis 7. Klassikaline SILAC katse ülesehitus. Rakukultuuri A inkubeeritakse „kergete“ ($[^{12}\text{C}]$ ja $[^{14}\text{N}]$ isotoope sisaldavaid arginiin ja lüsiin) aminohapetega ning Rakukultuuri B „raskete“ ($[^{13}\text{C}]$ ja $[^{15}\text{N}]$ isotoopidega märgitud arginiin ja lüsiin) aminohapetega söötmes. Proovid segatakse ning vajadusel puhastatakse uuritavad valgud. Valke töödeldakse proteolüütiliselt ning lahutatakse üksteisest HPLC abil. Erinevalt märgitud peptiidid elueeruvad kolonnilt samaaegselt ning on MS-s m/z järgi eristatavad. (joonis kohandatud artiklist Steen and Mann, 2004).

5 EKSPERIMENTAALNE OSA

5.1 Töö eesmärk

Selle magistritöö eesmärkideks on:

1. Leida meetod ribosoomivalkude vahetuse vaatlemiseks funktsionaalsetes ribosoomides *in vivo*
2. Teha kindlaks, kas ja millised ribosoomivalgud vahetuvad ribosoomides, mis on puhastatud elusrakkudest.

Eesmärkide saavutamiseks uuritakse SILAC märke muutust rakkudes aja jooksul, kasutades mass-spektromeetriat.

Töö esimeses pooles kirjeldatakse meetodi:

- Ülesehitust
- Tingimusi
- Meetodi kvantitatiivne ning statistiline kontroll

Töö teises osas vaadeldakse:

- SILAC märke muutust 70S ribosoomides, mis pärinevad defineeritud rakkude kasvufaasist
- Hinnatakse individuaalsete ribosoomivalkude vahetuskiirust läbi märke muutuse ajas

5.2 Materjal ja metoodika

5.2.1 Baktertüved ja plasmiidid

Selles töös kasutati eelnevalt meie laboris konstrueeritud *Escherichia coli* MG1655 SILAC (*F*⁻, λ -, *rph-1*, *ΔlysA*, *ΔargA*) tüve.

Plasmiididest kasutati meie laboris, *pBAD mychisC* põhjal konstrueeritud, *pBAD-t-ARA* (*pBAD* promootor, *araC*, *Amp^R*, *rrnB*)

5.2.2 Reagendid ning kitid

Lüsotsüüm (Applichem); DNAas I (VWR Amresco); Streptavidin sefaroos (streptavidin sefaroose high performance, GE Healthcare); Biotiin (Applichem); β -merkaptotetanool (Calbiochem); QIAquick Nucleotide Removal Kit; AMV revertaas(+ RT-HB puhver) (Promega); PNK-kit (*T4 polynucleotide kinase*) (MBI Fermentas); dNTP (Solis Biodyne); ddNTP (Solis Biodyne); puhver PN (*Qiagen*)

5.2.3 Kontsentraatorid

- Sartorius Vivaspin 500
- Receiver Columns 20 μ m, Macherey-Nagel

5.2.4 Puhvid ja lahused

Lüüsipuhver (20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NH₄Cl; 10 mM Mg(OAc)₂; 0.25 mM EDTA; 6 mM β -Merkaptoetanool; 2 mg/ml Lüsotsüüm; 40 U/ml DNA-aas)

OV-10+ β (20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NH₄Cl; 10 mM Mg(OAc)₂; 6 mM β -Merkaptoetanool)

OV-1+ β (20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NH₄Cl; 1 mM Mg(OAc)₂; 6 mM β -Merkaptoetanool)

OV-10+KCl (20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NH₄Cl; 10 mM Mg(OAc)₂; 6 mM β -Merkaptoetanool; 300 mM KCl)

OV-10+Biotiin (20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NH₄Cl; 10 mM Mg(OAc)₂; 6 mM β -Merkaptoetanool; 50 mM biotiin; pH 7,0[NaOH])

10xTBE (0,9 M Tris; 0,9 M Boorhape; 10 mM EDTA)

5.2.5 Söötmed

Selles töös kasutati modifitseeritud MOPS vedelsöödet: 1x MOPS soolad; 0,2% sorbitool; 1,32 mM K₂HPO₄; 0,2 µg/ml tiamiin (Neidhart et al., 1974) Aminohapped lisati söötmesse individuaalselt, lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. MOPS(H) söötme puhul lisati stabiilsete isotoopidega märgitud arginiin (R10) ([¹³C]₆H₁₄[¹⁵N]₄O₂) ja lüsiin (K8) ([¹³C]₆H₁₄[¹⁵N]₂O₂). MOPS(M) söötmesse lisati stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini (R6) ([¹³C]₆H₁₄N₄O₂) ja lüsiini (K4) (C₆H₁₀[²H]₄N₂O₂). MOPS(L) söötmes olid märketa arginiin (R0) ja lüsiin (K0).

Luria-Bertan (LB) agarsööde (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar) (Bertani, 1951) Resistentse baktertüve kasvatamisel lisatud ampitsiliini lõppkontsentratsioon on 100 µg/ml.

MOPS(H) agarsööde (1x MOPS soolad; 1,32 mM K₂HPO₄; 0,2% sorbitool; 0,2 µg/ml tiamiin; [20x] 0,1 mg/ml aminohapped, arginiin (R10), lüsiin (K8); 1,5% vesiagar)

5.2.6 Seadmed

- Loksuti INFORS HT multitron
- Perkin Elmer Liquid Scintillation analyzer Tri-Carb 2800TR
- Lauatsentrifuug Heraeus Biofuge Fresco
- Lauatsentrifuug Hettich Rotina 420
- Läbivooludetektor Monitor UVis-920
- Ultratsentrifuug Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge

5.2.7 „Raske“ säilituskultuuride tegemine

Escherichia coli MG1655 SILAC ± *pBAD-t ARA* rakud külvati 2 ml MOPS(R) vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C üleöö. Järgmisel hommikul tehti 1000x lahjenduskülv värskesse MOPS(H) vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C juures. Õhtul tehti uus 1000x lahjenduskülv värskesse MOPS(H) vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C juures üleöö. Järgneval hommikul tehti 1000x lahjenduskülv värskesse MOPS(H) vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C juures üleöö. Õhtul plaaditi rakukultuurid MOPS(H) agarsöötmele ning kasvatati 37 °C juures üleöö. Järgneval hommikul tehti agarsöötmele külv värskesse MOPS(H) vedelsöötmesse ning kasvatati kuni OD₆₀₀≈1,0. Rakukultuurid segati 1:1 50% glütserooliga, külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures.

5.2.8 Valkude märgistamine rakkudes

E.coli MG1655 SILAC+pBAD-t ARA rakud külvati 2 ml MOPS(H) vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C juures üleöö. Järgmisel hommikul tehti lahjenduskülv 800 ml MOPS(H) söötmesse nii, et algne OD₆₀₀≈0,02. Rakke kasvatati 37 °C juures kuni OD₆₀₀≈0,2. Rakud koguti tsentrifuugides (4757 g/12 minutit), eemaldati supernatant ning rakusade suspendeeriti 800 ml värskes MOPS(L) söötmes (ampitsiliin c_{lõpp}=0,1 mg/ml; glükoos c_{lõpp}=0,2%) rakukultuur jagati 200 ml kaupa alikvootideks ning kasvatati 37 °C juures. 40, 80, 120 ja 720 minuti möödudes võeti üks alikvootidest, mõõdeti OD₆₀₀ ning koguti rakud tsentrifuugides (4754 g/20 min). Rakusade külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80°C juures.

5.2.9 70S ribosoomide eraldamine rakkudest

Rakud suspendeeriti lüüsipuhvris, hoiti 4 °C juures 30 minutit ning lüüsi precellysis homogenisaatoriga (6000 rpm x 60 sek x3). Lüsaat klaariti tsentrifuugides 16060 g/20 minutit, mõõdeti OD₂₆₀ ning fraktsioneeriti 10-25% sahharoosigradiendil.

Gradiendilt koguti 70S fraktsioon, mõõdeti fraktsiooni ruumala ja OD₂₆₀. 70S fraktsioonist sadestati 70S ribosoomid tsentrifuugides Ti50 rootoriga tingimustel: $w^2t = 1,2 \cdot 10^{12}$, Ribosoomi sade lahustati üles 1xOV-10+β puhvris. Puhvri kogus valiti nii, et lõppkontsentratsioon oleks ligikaudu 0,5 U/μl. Mõõdeti OD₂₆₀ ribosoomilahuses ning hoiustati -80 °C juures.

5.2.10 70S+tag ribosoomide kromatograafiline puhastamine

70S+tag ribosoomide eraldamine viidi läbi kolonni hoidikutes (Macherey-Nagel Receiver Columns 20 μm). 70S ribosoomid segati 3:1 suhtes streptavidiin-sefaroos kolonnile. Segu hoiti over-end segajal 4 tundi 4 °C juures. Peale seda pesti kolonni 5 korda 0,5 ml OV-10+β puhvriga. Kolonnile lisati 0,4 ml OV10+biotiin puhvrit, hoiti over-end segajal 30 minutit. Kolonnilt elueeriti 70S+tag ribosoomid ning mõõdeti OD₂₆₀. Saadud eluendil viidi läbi puhvrivahetus (vivaspin 500, Sartorius) tsentrifugaalfiltril järgnevalt:

1. 23S+tag ribosoomide lahuse ruumala viidi 0,5 ml-ni 1xOV10+KCl puhvriga, kanti tsentrifugaalfiltrile ning tsentrifuugiti (16060 g/25 min) kuni retendanti filtril ≈50 μl.
2. Retendandile tehti 10 kordne lahjendus (V_{lõpp}≈500 μl) OV10+KCl puhvriga ning tsentrifuugiti (16060 g/25 min) kuni retendanti filtril ≈50 μl.

Etappi 2 korrati kolm korda ning peale viimast tsentrifugimist, tõsteti retendant uude *protein lobind* eppendorfi ja mõõdeti lahuse OD₂₆₀.

5.2.11 Proovide ettevalmistamine massi-spektromeetria jaoks

Segati kokku 1:1-le suhtes 0,5 U 70S+tag ribosoomi ja 0,5 U „keskmise“ märega valke sisaldavaid 70S ribosoomi. Seejärel lisati proovidesse TCA-d, lõppkontsentratsiooniga 10% ning hoiti 4 °C juures üleöö. Proove tsentrifugiti 16060 g/45 minutit, eemaldati supernatant ning pesti sadet 2 korda 0,5 ml 70% atsetooniga. Peale igat pesu tsentrifugiti proove 16060 g/45 minutit. Pärast viimast pesu, kuivatati ribosoomi sadet 37 °C juures 5 minutit ning hoiustati -20 °C juures.

5.2.12 Massi-spektromeetria andmete töötlus ning analüüs

MS/MS andmetest peptiidide identifitseerimiseks kasutati parameetreid: identifitseeritava peptiidi m/z hälve - ± 7 ppm; peptiidi maksimaalne laeng - 2+; lubatud vahelejäädud lõigete arv - 1, enšüüm - trüpsiin; fikseeritud modifikatsioonid - karbamido-metüül (C); varieeruvad modifikatsioonid - oksüdeerumine (M), aminohapped arginiin [¹³C]₆[¹⁵N]₄, lüsiin [¹³C]₆[¹⁵N]₂, arginiin [¹³C]₆, lüsiin [²H]₄; MS/MS hälve - 0,02 Da. Otsing viidi läbi andmebaaside *UniprotKB E.coli MG1655 K-12*, mis sisaldas kõiki tüves leiduvate valkude järjestusi (alla laetud 27.03.2012) ning *contaminants*, mis sisaldas MS-is enimlevinud kontaminantide järjestusi. Otsingu läbi viimisel kasutati ka *Decoy* andmebaasi. MS/MS andmete töötlus viidi läbi vabavara programmis *Skyline V.3.1.0.7316*-s. Töötlusel kasutati parameetreid: lubatud mitte-lõikamiste arv - 0; lubatud peptiidide pikkuste vahemik - 5-25 aminohapet. Töötlusel jäeti välja ka peptiidid, mis sisaldasid tsüsteiini ja/või metioniini. Peptiidid, mis sisaldasid arginiini (C₆H₁₄N₄O₂) või lüsiini (C₆H₁₄N₄O₂) tähistati tähega L (inglise keelest: *Light* - „kerge“). Peptiidid, mis sisaldasid arginiini ([¹³C]₆H₁₄[¹⁵N]₄O₂) või lüsiini ([¹³C]₆H₁₄[¹⁵N]₂O₂), tähistati tähega H ning lõpuks peptiidid, mis sisaldasid arginiini ([¹³C]₆H₁₄N₄O₂) või lüsiini (C₆H₁₀[²H]₄N₂O₂), tähistati tähega M. Andmetest saadud peptiidide intensiivsuste põhjal arvutati peptiidide L/M ja H/M suhted.

5.2.13 23S+tag rRNA ekspressiooni ja repressiooni kontroll

5.2.13.1 Rakkude kasvatamine

E.coli MG1655 SILAC +pBAD-t ARA rakke kasvatati MOPS(L) söötmes, kuhu lisati ampitsiliini (c_{lõpp}=0,1 mg/ml) ja arabiinooosi (c_{lõpp}=0,2%). Optilise tiheduse OD₆₀₀≈0,5 juures

tseentrifuugiti rakud põhja 4757 g/12 min ning suspendeeriti MOPS(L) söötmes (ampitsiliin [$c_{\text{lõpp}}=0,1$ mg/ml], glükoos [$c_{\text{lõpp}}=0,2\%$]). Rakke koguti 0, 2 ja 24 h peale söötmevahetust. Rakud tseentrifuugiti põhja 4757 g/20 min ning rakusade külmutati -80 °C juures.

5.2.13.2 Ribosoomide eraldamine

Rakusade suspendeeriti lüüsipuhvris, lüüsiiti *precellysis homogenizator*-iga (6000 rpm x 60 sek x3) ning mõõdeti OD_{260} . Lüsaaat kanti 10-25% sahharoosigradiendile 100 U kaupa ning tseentrifuugiti Beckmann SW-28 rootoris tingimustel: $w^2t - 3,4 \cdot 10^{11}$ ja 21000 rpm-i .

Gradiendist koguti 70S ribosoomide fraktsioon, mõõdeti ruumala ja OD_{260} . 70S fraktsioonist sadestati 70S ribosoomid, tseentrifuugides Ti50 rootoris tingimustel: $w^2t - 1,2 \cdot 10^{12}$, kiirusel 36000 rpm. Ribosoomisade lahustati üles 1xOV-10+ β puhvris. Puhvri kogus valiti nii, et lõpp-kontsentratsioon oleks ligikaudu 0,5 U/ μ l. Mõõdeti ribosoomilahuse OD_{260} , külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures.

5.2.13.3 rRNA eraldamine 70S ribosoomidest

Võeti 1-2 U eelnevalt eraldatud 70S ribosoomide, lahjendati 1xOV-10+ β puhvris kuni $V_{\text{lõpp}}=200$ μ l. Lahjendusele lisati 800 μ l puhvrit PN(Qiagen), segati 20 minutit, peale mida lisati 20 μ l 50% räni suspensiooni. Lahust segati 10 minutit ning tseentrifuugiti 16060 g/5 minutit. Supernatant aspireeriti ja sadet pesti 2 korda 70% etanooliga. Peale viimast pesu lisati sademele 40 μ l H₂O-d (MQ) ning hoiti toatemperatuuril 5 minutit. Segu tseentrifuugiti 16060 g/5 minutit, supernatant tõsteti uude tuubi ning mõõdeti OD_{260} .

5.2.13.4 Praimeri märgistamine

Valmistati reaktsioonisegu (50 μ l) 23S+tag rRNA spetsiifilise praimeri (5' CAAAAGGTACGCAGT 3') märgistamiseks ³²P-CTP-ga.

Tabel 1. praimer 5' märgistamine alfa-³²P-tsütosiiniga

Reagent	Varulahus	$C_{\text{lõpp}}$ (50 μ l)
Praimer	15 pmol/ μ l	2 pmol/ μ l
³² P-CTP	10 μ Ci/ μ l	2 μ Ci/ μ l
PNK puhver	10 kordne	1 kordne
PNK	10 U/ μ l	0,8 U/ μ l

Reaktsioonisegu inkubeeriti 37°C juures 90 minutit, pärast mida eraldati segust praimer kasutades *QIAquick Nucleotide Removal Kit*-i.

5.2.13.5 minisekventsi reaktsioon

Reaktsiooni läbi viimiseks segati kõigepealt kokku An (*annealing*) – reaktsioonisegu (10 µl) – kineeritud praimer ($c_{lõpp}=0,05$ pmol/µl), rRNA ($c_{lõpp}=0,1$ pmol/µl), revertaasi puhver ($c_{lõpp}=1$ kordne). Segu kuumutati 93 °C-ni ning siis jahutati aeglaselt 37 °C-ni. Jahtumise ajal segati kokku E (*extension*) segu (9 µl): revertaasi puhver ($c_{lõpp}=1$ kordne) ning AMV revertaas ($c_{lõpp}=0,44$ U/µl). Järgmiseks segati kokku 2 reaktsioonisegu:

ddATP reaktsioonisegu		ddGTP reaktsioonisegu	
Reagent	Kogus(10 µl)	Reagent	Kogus (10 µl)
An segu	5 µl	An segu	5 µl
E segu	4 µl	E segu	4 µl
dATP	0,625 mM	dGTP	0,625 mM
ddATP	0,125 mM	ddGTP	0,125 mM

Reaktsioonisegusi inkubeeriti 42 °C juures 30 minutit. 30 minuti möödudes peatati reaktsioon lisades 120 µl STOP lahust (etanol [$c_{lõpp}=72\%$], NaOAc [$c_{lõpp}=0,33$ M]), segati ning pandi -20 °C juurde üleöö. Valmistati 12% UPAAG (akrüülamiid-bis-akrüülamiid segu [19:1] [$c_{lõpp}=12\%$], urea [$c_{lõpp}=6$ M], 1 kordses TBE puhvis). 12% UPAAG-ile lisati Temed (10 µl, 100 ml geeli kohta) ning valati vormi. Geelil lastud polümeriseeruda üleöö. Järgmisel päeval tehti geelile preforees (2000 V/1 h) ning pesti geelihambaid. Proovid võeti -20 °C juurest, tsentrifuugiti DNA põhja (16060 g/15 minutit), eemaldati supernatant ning lahustati sade üles 10 µl formamiid STOP lahuses (80 % deioniseeritud formamiid, 10 mM EDTA, 0,25% broomfenool sinine). igat proovi kanti geelile 1 µl ning viidi läbi elektroforees (2000 V/4 h). DNA fragmendid visualiseeriti phosphoimageriga (*Typhoon trio*) ja analüüsiti *ImageQuant* programmiga

5.3 Tulemused

Enne töö alustamist püstitati kaks eesmärki:

1. Leida meetod ribosoomivalkude vahetumise jälgimiseks ribosoomides *in vivo* tingimustel
2. Teha kindlaks, kas ja millised ribosoomivalgud vahetuvad ribosoomides, mis on puhastatud elusrakkudest

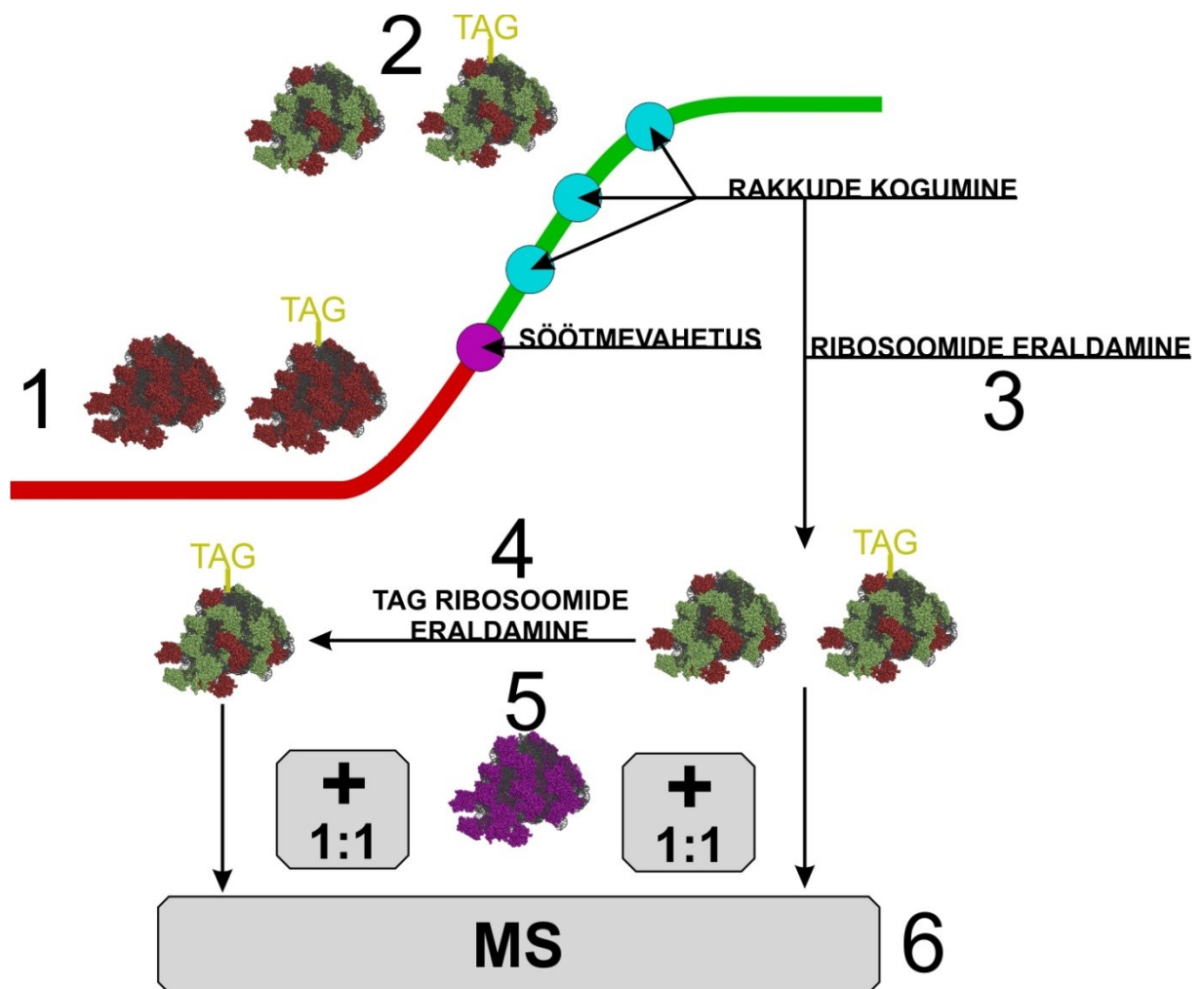
Töö eksperimentaalse osa skeem eesmärkide saavutamiseks on toodud joonisel 8. Esmalt kasvatati *E.coli* MG1655 *SILAC+pBAD-t ARA* rakke MOPS(H) („raske“) söötmes, kuni optilise tiheduseni 0.2, kui uuriti valkudevahetust eksponentsiaalses, või 0.8, kui statsionaarses kasvufaasis. MOPS(H) sööde sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$). Selleks, et indutseerida plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisati MOPS(H) söötmesse arabinoosi (0,2%). Selle tulemusena assambleeriti 50S alamühikud, mis sisaldasid streptavidiini spetsiifilist „tag“-i. Seejärel tehti söötmevahetus värske MOPS(L) („kerge“) söötme vastu, mis sisaldas ilma isotoopmärgeta arginiini ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$). Selleks, et repressseerida plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisati MOPS(L) söötmesse lisarepressoriks glükoosi (0,2%). Söötmevahetuse mõtteks oli saavutada olukord, kus kõik enne söötmevahetust sünteesitud ribosoomivalgud sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ja lüsiini ning kõik 23S+tag rRNA-d sisaldavad ribosoomid pärineksid enne söötmevahetust. Rakke kasvatati, erinevate perioodide vältel peale söötmevahetust, koguti valitud ajapunktides ning eraldati 70S ribosoomid saharoosigradiendil. 70S ribosoomide fraktsioonist puhastati 10 mM magneesiumi juures afiinsuskromatograafia abil streptavidiini spetsiifilist tag-i omavad 70S ribosoomid (70S+tag).

Kuna töö eesmärgi täitmiseks oli vaja võrrelda omavahel erinevates ajapunktides eraldatud ribosoomide isotoopmärgete sisaldust, siis oli vajalik sisemise standardi olemasolu proovides. Selleks kasvatati *E.coli* MG1655 *SILAC* rakke MOPS(M) („keskmise“) söötmes kuni $\text{OD}_{600} \approx 4,0$. Rakud koguti ning eraldati 70S ribosoomid, mida kasutati sisemise standardina kõikides MS-i katsetes. MOPS(M) sööde sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($\text{C}_6\text{H}_{10}[^2\text{H}]_4\text{N}_2\text{O}_2$), mis erinesid oma molekulmassi poolest MOPS(H) kasutatud arginiinist ja lüsiinist. Selle tulemuseks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid ainult "keskmise" märkega ribosoomivalke ning olid eristavad ülejäänud ribosoomivalkudest mass-spektromeetria abil.

E.coli MG1655 SILAC + *pBAD-t ARA* (MOPS(H) ja MOPS(L) söötmes kasvatatud) tüvest eraldatud 70S ja 70S+tag ribosoomidele lisati 1:1 suhtes sisemist standardit. Järgnevalt tehti proteolüütiline töötlus ribosoomide segule, kasutades peptidaasi trüpsiin. Trüpsiin lõikab valke iga arginiini või lüsiini tagant ehk kõik korrektselt lõigatud peptiidid sisaldavad ainult ühte arginiini või lüsiini. Peptiidid lahutati HLPC-ga ning ioniseeriti ESI abil. Ioniseeritud peptiidid identifitseeriti ning kvantifitseeriti kasutades järjestikust mass-spektromeetriat (tandem-MS). MS andmete abil arvutati valkude L/M ja H/M suhted, kus L (*inglise keeles – light*) tähistab „kerget“ märget, H (*inglise keeles – heavy*) „rasket“ märget ning M (*inglise keeles medium*) „keskmist“ märget sisaldavate peptiide suhtelisi intensiivsusi. Sellest tulenevalt kirjeldavad vastavad suhted märgitud valkude koguseid „keskmise“ märkega valkude suhtes.

Kuna 70S+tag ribosoomid moodustavad väikese osa 70S ribosoomide populatsioonist, siis oli vajalik kontrollida, kas 70S+tag ribosoomides esinevad „kerge“ ja „raske“ märkega valkude suhtelised kogused on samad, mis ülejäänud 70S ribosoomides. Selleks oligi vajalik proov, kus oli segatud kokku 1:1 suhtes 70S ribosoomid enne eraldamise etappi streptavidiin-sefaroos kolonnil ning „keskmise“ märkega r-valke sisaldavad 70S ribosoomid. Selles proovis analüüsiti samamoodi märkega r-valkude suhtelisi koguseid, mida võrreldi 70S+tag ribosoomide proovis saadud andmetega. Selle tulemusena kontrolliti, kas 70S+tag ribosoomidest saadud andmete põhjal saab teha järeldusi kogu 70S ribosoomides toimunud muutuste kohta.

Töö eksperimentaalseks väljundiks oli vaadelda „kerge“ ja „raske“ märke sisalduse muutust ribosoomivalkudes, mida kirjeldasid väärtused L/M ja H/M. Kuna igasse proovi lisati konstantne kogus „keskmise“ (M) märkega 70S ribosoomi, siis oli võimalik võrrelda märke koguse muutust valkudes selle suhtes. Suhete L/M ja H/M abil arvutati märgete osakaalud erinevates r-valkudes. Kuna rRNA spetsiifiline tag esines ainult 23S rRNA-s, siis uuriti selle töö raames ainult suure alamühiku valke.



Joonis 8. Töö eksperimentaalne skeem. Etapp 1 – rakke kasvatati MOPS(H) söötmes, kus sünteesiti 23S+tag rRNA-d ning ainult „raske“ märkega valke, kuni söötmevahetuseni MOPS(L) söötmesse, milles oli 23S+tag rRNA süntees plasmiidilt repressseeritud ning sünteesiti ainult „kerge“ märkega valke. Etapp 2 – rakke kasvatati MOPS(L) söötmes ning rakud koguti valitud ajapunktidel. Etapp 3 – rakkudest eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. Etapp 4 - 70S ribosoomidest eraldati streptavidiini spetsiifilise tag-iga 70S+tag ribosoomid. Etapp 5 - 70S+tag ja 70S ribosoomid segati kokku 1:1 suhtes „keskmist“ märgelt sisaldavate ribosoomidega. Etapp 6 – valmistatud segudes analüüsiti isotoopmärgete suhteid ribosoomivalkudes HPLC-MS/MS teel.

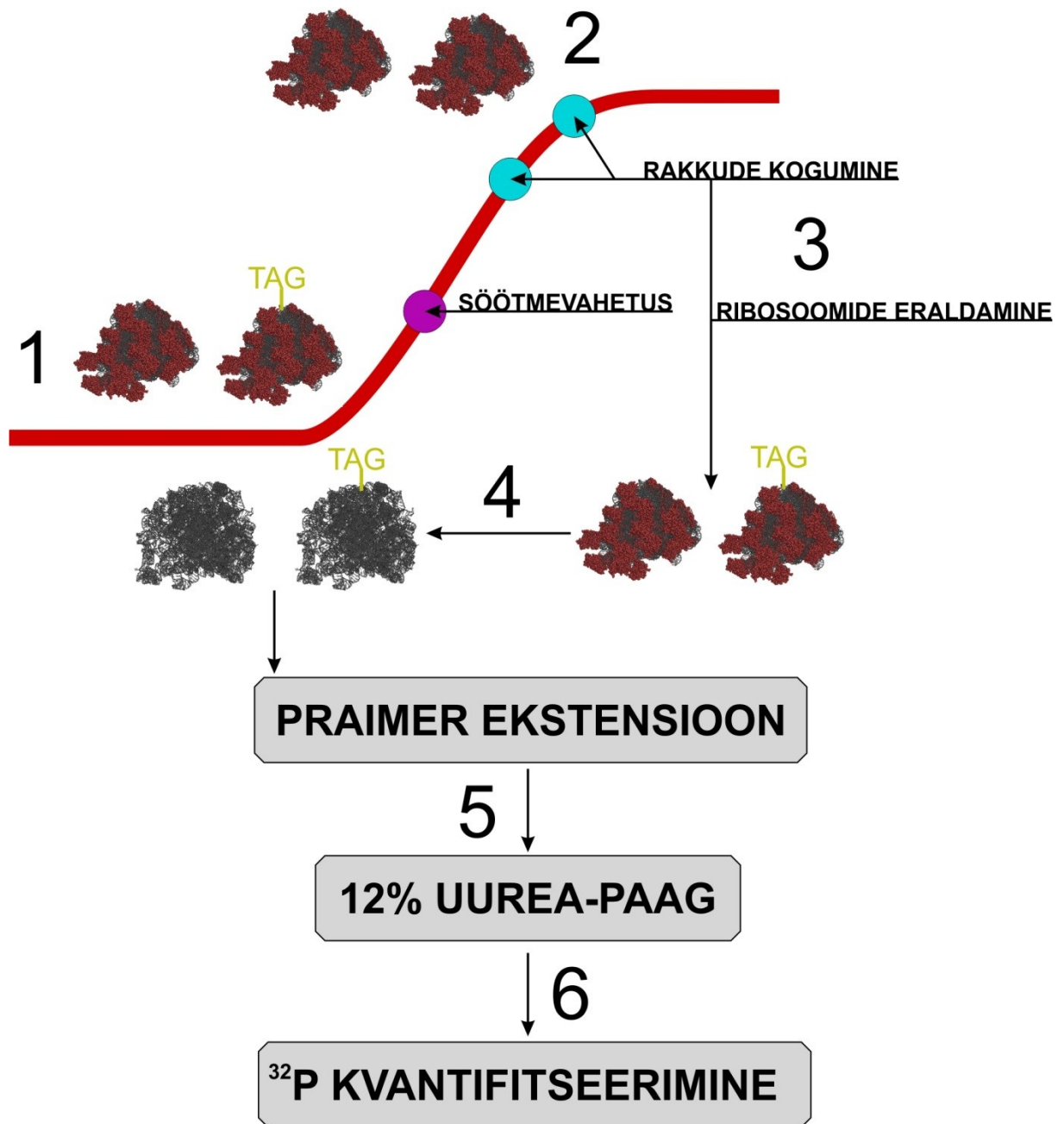
5.3.1 Eksperimendiks vajaliku rakutüve konstrueerimine

Meetodi välja töötamisel kasutati eelnevalt meie laboris konstrueeritud *E.coli* MG1655 SILAC tüve. Tüves oli deleteeritud genoomist geenid *lysA* ja *argA*, mis oli vajalik selleks, et vältida aminohapete arginiin ja lüsiin *de novo* sünteesi rakkudes. Lisaks sellele oli vajalik 23S+tag rRNA kontrollitud ekspressioon plasmiidilt. Selleks transformeeriti *E.coli* MG1655 SILAC

tüve *pBAD-t ARA* plasmiidiga. *pBAD-t ARA* oli *pBAD mychisC* plasmiidist konstrueeritud variant, mis sisaldas endas arabinoos indutseeritavat promootorit, ampitsiliini resistentsusgeeni ning mutantset *rrnB* operoni. *RrnB* operon sisaldas endas 23S rRNA geeni, kuhu oli mutageneesi abil sisse viidud streptavidiini spetsiifiline tag. Selle abil oli võimalik puhastada tag-i sisaldavaid ribosoomide teistest ribosoomidest.

5.3.2 *pBAD-t ARA* ekspressioonisüsteemi iseloomustamine

Selleks, et läbi viia ribosoomivalkude vahetuskatset, on vajalik kontrollida 23S+tag rRNA sünteesi repressiooni ja ekspressiooni. Analüüsiks piisava koguse 23S+tag rRNA saamiseks oli vajalik kõrge ekspressiooni tase, samas valkude lülitamise analüüs on võimalik juhtumil kui 23S+tag süntees on repressseeritud. Ekspressiooni ja repressiooni efektiivsuse kontrollkatse skeem on toodud joonisel 9 ning tulemused tabelis 2. *E.coli MG1655 SILAC + pBAD-t ARA* rakke kasvatati MOPS(L) söötmes, kuhu oli lisatud arabinoosi (0,2%) selleks, et indutseerida plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees. Rakke kasvatati kuni $OD_{600} \approx 0,5$ ning viidi läbi söötmevahetus värske MOPS(L) söötme vastu, kust puudus arabinoos ning kuhu oli lisatud glükoosi (0,2%) selleks, et repressseerida plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees. Seega toimus enne söötmevahetust 23S+tag rRNA süntees ning peale vahetust selle repressioon. Rakud koguti 0, 2 ning 24 h peale söötmevahetust, lüüsi ning eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. 70S ribosoomidest eraldati rRNA ning viidi läbi 23S/23S+tag rRNA spetsiifiline praimer-ekstensiooni reaktsioon α - ^{32}P -CTP abil märgitud praimeriga. Reaktsioonisegu produktid eraldati 12% urea-PAAG elektriforeesi teel ning kvantifitseeriti 23S ja 23S+tag rRNA spetsiifiliste produktide osakaal. Selle tulemusena oli võimalik jälgida 23S+tag rRNA koguse suhtelist muutust võrreldes 23S rRNA-ga. Seega, kui 23S+tag rRNA spetsiifiliste produktide osakaal alguses on liiga madal ($n < 5\%$), siis tähendab see, et ekspressioon on liiga nõrk. Kui 23S+tag rRNA spetsiifiliste produktide osakaal väheneb ajas peale söötmevahetust, siis toimib repressioon hästi, kui osakaal aga tõuseb, siis tähendab see promootori lekkimist.



Joonis 9. *pBAD-t ARA* ekspressioonisüsteemi iseloomustamise katse skeem. Etapp 1 – kasvatati rakke MOPS(L) söötmes, kus indutseeriti plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees (punane). $OD_{600} \approx 0,5$ juures viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) vastu, kus represseriti 23S+tag rRNA süntees plasmiidilt (roheline). Etapp 3 – rakud koguti 0h, 2h ja 24h peale söötmevahetust ning eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. Etapp 4 – 70S ribosoomidest eraldati rRNA ning viidi läbi 23S/23S+tag spetsiifiline praimer-ekstensiooni reaktsioon, koos α - ^{32}P -CTP abil märgitud praimeriga. Etapp 5 – Reaktsioonisegu produktid

lahutati 12% urea-PAAG elektrofooresil. Etapp 6 – urea-PAAG geelil kvantifitseeriti [³²P] kogus 23S rRNA ja 23S+tag rRNA spetsiifilistes produktides.

Tabel 2. 23S rRNA+tag sisaldus ribosoomides peale repressiooni

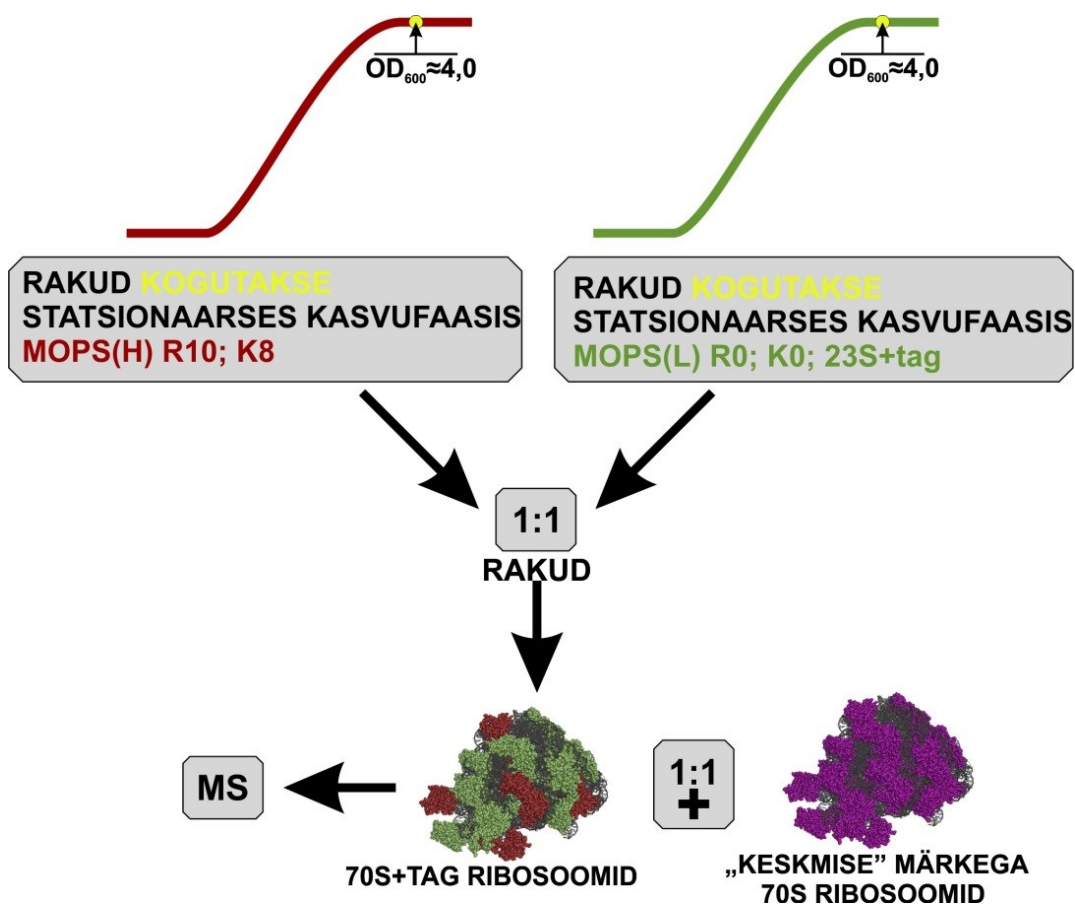
rRNA	0h	2h	24h
23S+tag	25.89%	20.23%	32.80%
23S-tag	74.12%	79.78%	67.20%

Tabelis 2 on toodud 23S rRNA ja 23S+tag rRNA osakaal 70S ribosoomides 0h, 2h ja 24h peale söötmevahetust. 0h ($OD_{600} \approx 0,5$) punktis on 23S+tag rRNA sisaldavate 70S ribosoomide osakaal $\approx 26\%$ ehk 23S+tag rRNA süntees on piisav +tag ribosoomide eraldamiseks. 2h ($OD_{600} \approx 2,3$) peale söötmevahetust on 23S+tag rRNA osakaal 70S ribosoomide populatsioonis $\approx 20\%$. 24h ($OD_{600} \approx 3,4$) peale söötmevahetust on 23S+tag rRNA osakaal 70S ribosoomides $\approx 30\%$. Kahe viimase ajapunkti väärtuste lahti mõtestamise juures on tähtis mõista – kui plasmiidilt ei leki 23S+tag rRNA-d, siis selle kogus ei tohiks rakkudes suureneda. Samas toimub peale repressiooni edasi 23S rRNA süntees, mille tõttu peaks 23S+tag rRNA osakaal 70S ribosoomides vähenema. Tabelis toodud andmetest on näha, et 23S+tag ribosoomide hulk tõuseb 24h punktis, aga 2h punktis on langenud $\approx 5\%$ võrra. Sellest tulenevalt saab järeldada, et *pBAD-t ARA* plasmiidilt lekitab *rrnB* operon rakkude jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi. Kahjuks ei ole võimalik selle katse andmetest järeldada, kas plasmiid lekitab rakkude eksponentsiaalses kasvufaasis.

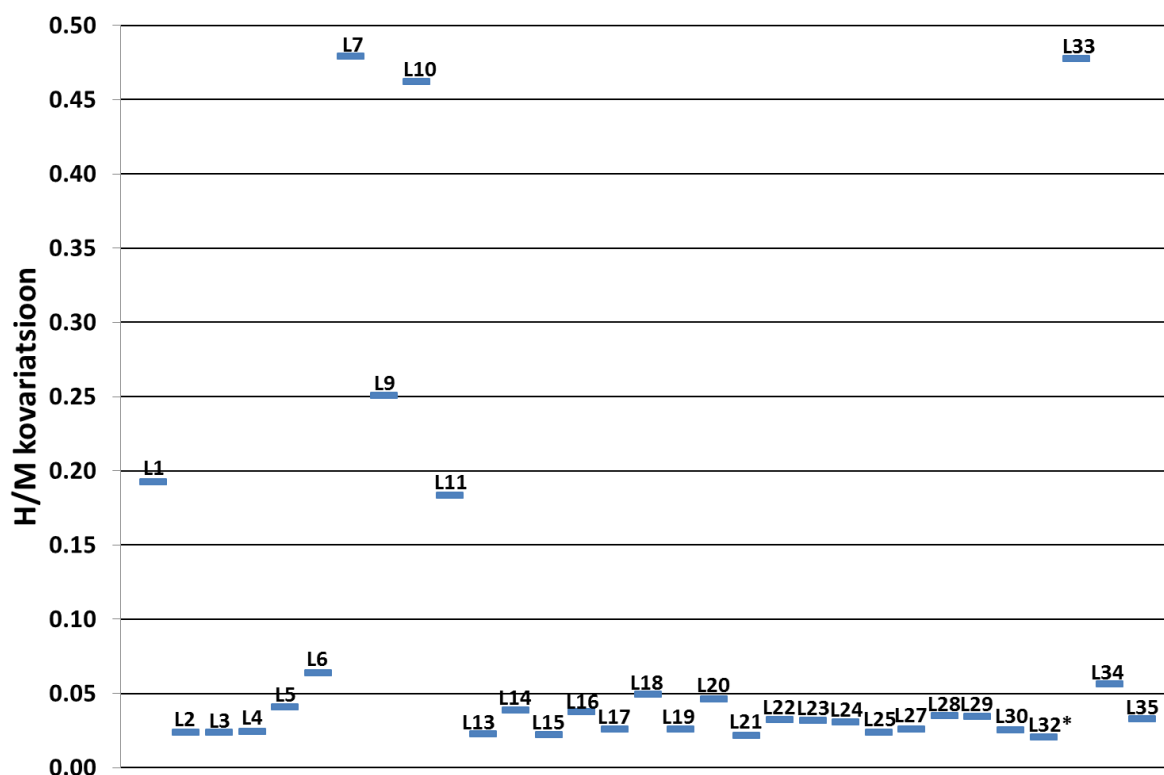
5.3.3 Valkudevahetus ribosoomide eraldamise käigus

Ribosoomide eraldamine lüsaadist on ajakulukas meetod, mis võttis siin töös toodud meetodite abil aega ligikaudu 48 tundi. Eraldamise meetod hõlmab endas: rakkude lüüsimine (1 h), sahharoosigradiendil eraldamine (≈ 17 h), ribosoomide sadestamise (≈ 21 h), ribosoomide lahustamine puhvris (≈ 4 h) ning lõpuks 70S+tag ribosoomide eraldamine streptavidiin-sefaroos kolonnil (≈ 5 h). Seega oli vaja kontrollida, kas ja missugused ribosoomivalgud vahetuvad ribosoomide eraldamise käigus. Juhtumil, kui valgud vahetuvad ribosoomide puhastamise protsessi käigus, ei ole võimalik analüüsida nende vahetust *in vivo* tingimustel. Selleks kasvatati *E.coli MG1655 SILAC* ja *E.coli MG1655 SILAC+pBAD-t ARA* rakke vastavalt MOPS(H) ja MOPS(L) söötmes. Sellest tulenevalt oli *E.coli MG1655 SILAC* rakkudes ainult „raske“ märkega valgud ning *E.coli MG1655 SILAC+pBAD-t ARA* rakkudes ainult „kerge“ märkega valgud. Lisaks sellele ekspresseeriti *E.coli MG1655 SILAC+pBAD-t ARA* rakkudes plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisades MOPS(H) söötmesse arabinoosi (0,2%). Mõlemaid kultuure kasvatati paralleelselt kuni optilise tiheduseni $\approx 2,0$. Rakud koguti,

segati kokku 1:1 suhtes ning eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. 70S ribosoomidest puhastati streptavidiin-sefaroos kolonnil 70S+tag ribosoomid. 70S+tag ribosoomid segati omakorda kokku 1:1 suhtes „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega ning analüüsiti HPLC-MS/MS abil. MS andmetest arvutati märgete suhted H/M ja L/M, mis iseloomustavad „raske“ (inglise keeles „Heavy“ – H) ja „kerge“ (inglise keeles „Light“ - L) märkega valkude suhtelist kogust „keskmise“ (inglise keeles „medium“ – M) märkega valkude suhtes. Suhete L/M ja H/M abil arvutati H/M kovariatsioon iga individuaalse r-valgu jaoks: $\frac{H}{M} \text{ kovariatsioon} = \frac{\frac{H}{M}}{\frac{H}{M} + \frac{L}{M}}$. H/M kovariatsioon näitab „raske“ märkega valkude suhtelist osakaalu „kerge“ ja „raske“ märkega valkude seas. Kuna 70S+tag ribosoomid pärinesid *MG1655 SILAC+pBAD-t* tüvest, kus sünteesiti ainult „kerge“ märkega valke, siis oli „raske“ märke esinemine nendes ribosoomides võimalik ainult siis, kui ribosoomivalgud vahetuvad eraldamise käigus. Valkudevahetust kirjeldati läbi märke osakaalu muutuse ribosoomides. Valgud, mille „raske“ märke osakaal oli üle 0.1 70S+tag ribosoomides, loeti vahetuvaks. Eksperimendi skeem toodud joonisel 10 ning tulemused joonisel 11.



Joonis 10. Katse skeem – valguvahetus ribosoomide eraldamise käigus rakkudest. Rakke kasvatati paralleelselt MOPS(L) (arginiin ($C_6H_{14}N_4O_2$), lüsiin ($C_6H_{14}N_4O_2$) – „kerget“ märked) (roheline) ja MOPS(H) (arginiin ($[^{13}C]_6H_{14}[^{15}N]_4O_2$), lüsiin ($[^{13}C]_6H_{14}[^{15}N]_2O_2$) – „rasket“ märked) söötmes (punane) kuni optilise tiheduseni $\approx 2,0$. „Rasket“ märget sisaldavad valgud illustreeritud joonisel roheliselt ning „kerget“ märget sisaldavad punaselt. Rakud koguti, mõõdeti optiline tihedus ning segati OD₆₀₀ väärtuste põhjal kokku 1:1 suhtes. Rakud lüüsi ja eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. 70S fraktsioonist puhastati 70S+tag ribosoomid ning mõõdeti OD₂₆₀. 70S+tag ribosoomid segati OD₂₆₀ väärtuste põhjal 1:1 suhtes kokku „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega (lilla) ning analüüsiti HPLC-MS/MS abil.

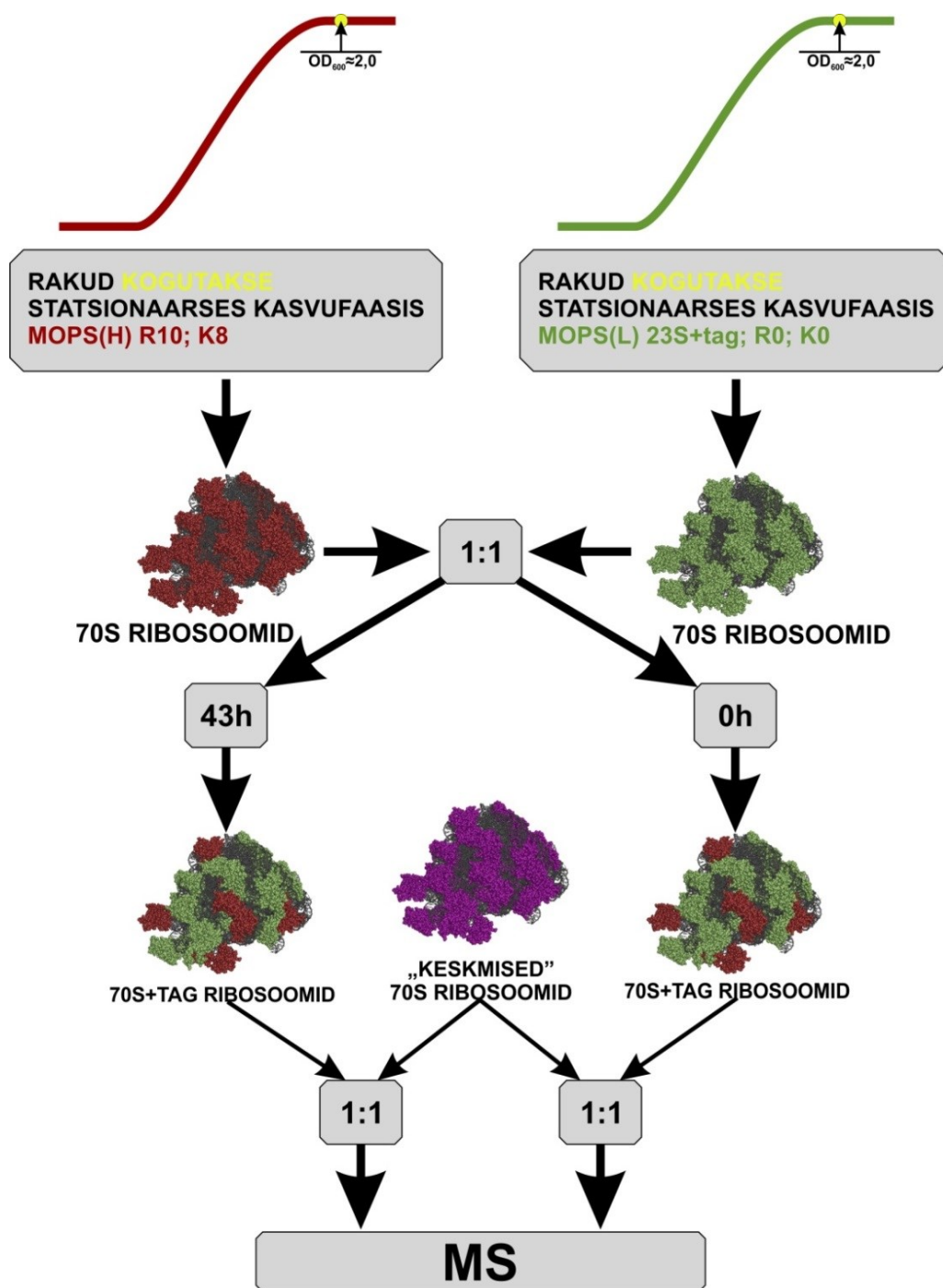


Joonis 11. Valkudevahetus ribosoomide eraldamise käigus. Joonisel on näidatud andmed katsest, kus segati kokku erineva märkega valke sisaldavad rakud, eraldati 70S+tag ribosoomid ning analüüsiti marke osakaalu muutust nendes. Y-teljel on toodud MS andmete põhjal arvatud H/M kovariatsioon, mis näitab „rasket“ märget omavate valkude osakaalu 70S+tag ribosoomides. *-tähistatud valkude puhul esines osakaalude arutamiseks ainult üks peptiid. 70S+tag ribosoomid sisaldasid enne kokku segamist ainult „kerge“ märkega valke, seega oli „raske“ marke osakaal nendes 0. Sellest tulenevalt loeti kõik valgud, mille H/M kovariatsioon jäi alla 0.1, mittevahetuvateks ning kõik valgud mille H/M kovariatsioon oli üle 0.1, vahetuvateks.

Joonisel 11 on näidatud „raske“ märkega valkude osakaal 70S+tag ribosoomides. Jooniselt on näha, et enamuse ribosoomivalkude „raske“ marke osakaal jäi alla 0,1. Samas oli 6 valku, mille „raske“ marke osakaal oli üle 0,1 – L1, L7/L12, L9, L10, L11 ja L33. Sellest tulenevalt loeti need valgud vahetuvateks ribosoomide eraldamise käigus. Kuna need valgud vahetuvad ribosoomide eraldamise käigus, siis ei ole võimalik eristada vahetust, mis toimub ribosoomides *in vivo* ning vahetust, mis toimub eraldamise käigus nende puhul.

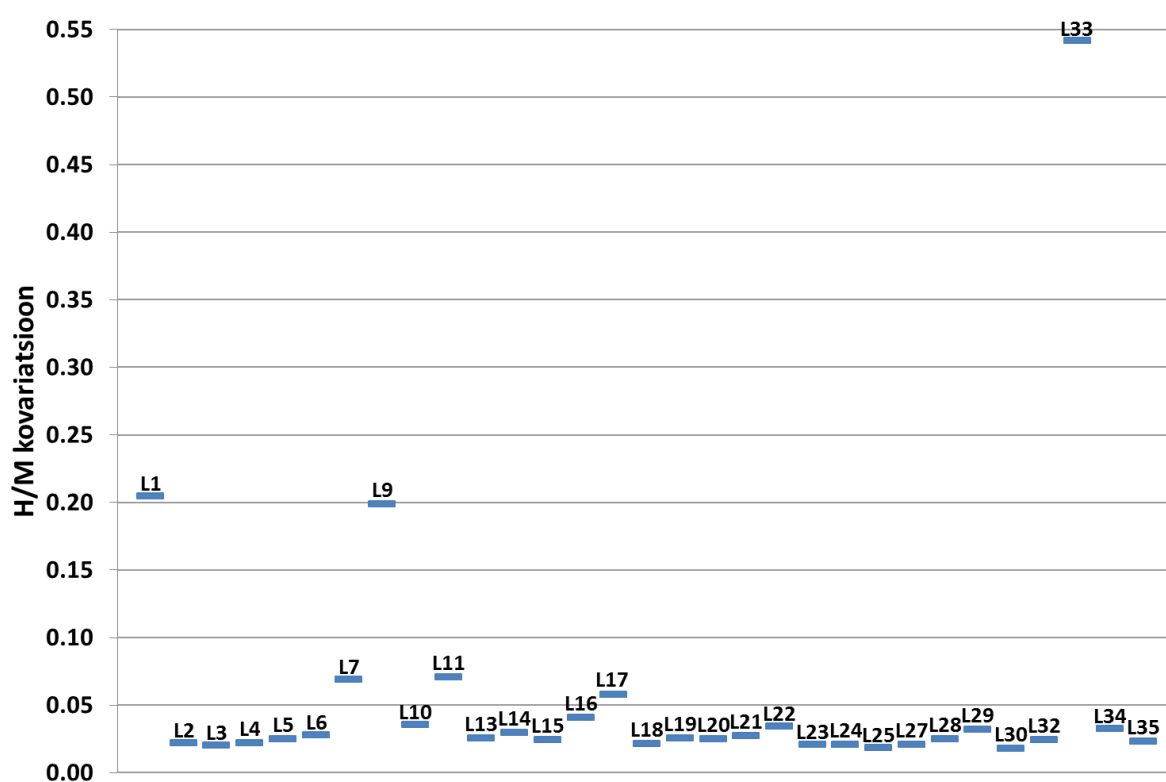
Ribosoomid on puhastamise protsessi käigus erinevates keskkondades: algul lüsaadis, siis sahharoosigradiendil ning lõpuks streptavidiin-sefaroos kolonnil. Selleks, et kindlaks teha mis valgud, millises puhastamise etapis vahetuvad, viidi läbi kontrollkatse. Katses kasutati

eelnevalt puhastatud ribosome, mis olid homogeenised „kerge“ või „raske“ märke suhtes. Selleks kasvatati *E.coli* MG1655 SILAC ja *E.coli* MG1655 SILAC+pBAD-t ARA rakke vastavalt MOPS(H) ja MOPS(L) söötmes. Selle tulemusena oli *E.coli* MG1655 SILAC rakkudes ainult „raske“ märkega valgud ning *E.coli* MG1655 SILAC+pBAD-t ARA rakkudes ainult „kerge“ märkega valgud. Lisaks sellele indutseeriti *E.coli* MG1655 SILAC+pBAD-t ARA rakkudes plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisades söötmesse arabinoosi (0,2%). Mõlemaid kultuure kasvatati paralleelselt kuni optilise tiheduseni $\approx 2,0$. Rakud koguti ning eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. Järgnevalt jagunes katse kaheks: esmalt segati puhastatud ribosoomid 1:1 suhtes kokku ning hoiti 4°C juures 43h, peale seda segati eelnevalt puhastatud ribosoomid uuesti 1:1 suhtes kokku ning viidi koheselt läbi 70S+tag ribosoomide puhastamine mõlemas segus. 70S+tag ribosoomide eraldamisel hoitakse ribosome 5h streptavidiin sefaroos kolonnil. Esimest segu hoiti 43h 4°C juures selleks, et imiteerida aega mis kulub 70S ribosoomide eraldamiseks sahharoosigradiendil. Teine segu oli kontrolliks 70S+tag ribosoomide eraldamise etapile streptavidiin-sefaroos kolonnil. Eraldatud 70S+tag ribosoomid segati omakorda 1:1 kokku „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega ning analüüsiti HPLC-MS/MS-iga. MS andmete töötlus viidi läbi analoogselt eelneva katsega. Katse skeem on toodud joonisel 12 ning tulemused joonisel 13.

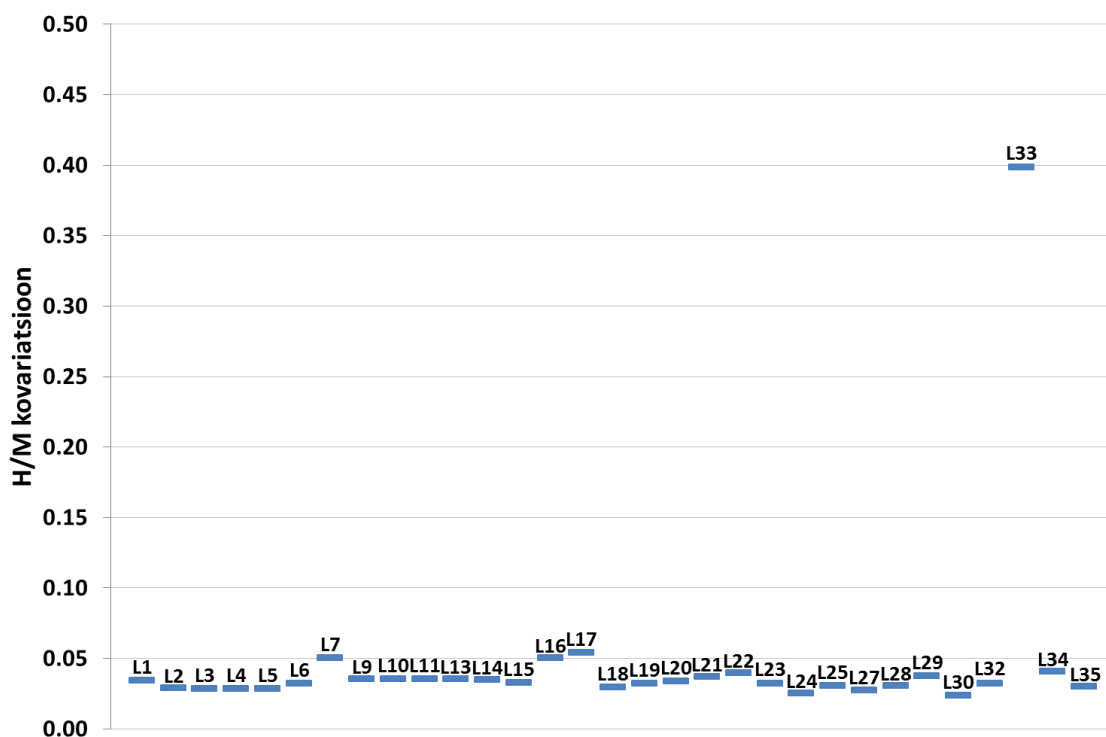


Joonis 12. Eksperimendi skeem. Valkudevahetus ribosoomide puhastamise protsessi käigus. Rakke kasvatati paralleelselt MOPS (H) (arginiin ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$) ja lüsiin ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$) – „rasket“ märged) (punane) ja MOPS (L) (arginiin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) ja lüsiin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) – „kerget“ märged) (roheline) söötmetes kuni optilise tiheduseni $\approx 2,0$. „Rasket“ märged sisaldavad valgud illustreeritud joonisel roheliselt ning „kerget“ märged sisaldavad punaselt. Rakud lüüsiiti, eraldati 70S ribosoomid, mis segati 1:1 suhtes kokku ning hoiti 43 tundi 4°C juures (43 h) või segati kokku vahetult enne 70S+tag ribosoomide eraldust (0 h). Segudest puhastati 70S+tag ribosoomid, mis segati omakorda kokku 1:1 suhtes „keskmise“ märgedega valke sisaldavate ribosoomidega (lilla) ning analüüsiti HPLC-MS/MS-iga.

Joonisel 13 on toodud andmed katsest, kus uuriti valkudevahetust ribosoomide puhastamise protsessi käigus 48 h (43 h + 5 h) jooksul. Joonisel on näidatud „raske“ märkega valkude osakaalu muutus (H/M kovariatsioon) 70S+tag ribosoomides. Sellelt on näha, et valgu L33 H/M kovariatsioon on ligikaudu 0,5 – see tähendab, et vaadeldud L33 valkudest pooled sisaldasid „rasket“ märget ning ülejäänud pooled „kerget“ märget. Sellist olukorda nimetatakse tasakaalu seisundiks, mille puhul edasist vahetust ei ole enam võimalik jälgida. Valkude L1 ja L9 puhul on H/M kovariatsioon 0.2, seega ei olnud need valgud veel jõudnud tasakaalu seisundisse 48h jooksul. Kuna „raske“ märke osakaalu muutus aja jooksul ei kirjelda ainult vahetumist, vaid ka selle kiirust, siis saab järeldada, et valgud L1 ja L9 vahetuvad aeglasemalt kui L33 puhastatud ribosoomide vahel 48h jooksul.



Joonis 13. Valkudevahetus puhastatud ribosoomides 48 h (43+5) jooksul. Joonisel on näidatud andmed katsest, kus segati kokku erineva märkega valke sisaldavad ribosoomid, hoiti 4°C juures 43 h, eraldati 70S+tag ribosoomid (5 h) ning analüüsiti märke osakaalu muutust nendes. Y-teljel on toodud MS andmete põhjal arvutatud H/M kovariatsioon, mis näitab „rasket“ märget omavate valkude osakaalu 70S+tag ribosoomides. 70S+tag ribosoomid sisaldasid enne kokku segamist ainult „kerge“ märkega valke, seega oli „raske“ märke osakaal nendes 0. Sellest tulenevalt loeti kõik valgud, mille H/M kovariatsioon jäi alla 0.1, mittevahetuvateks ning kõik valgud mille H/M kovariatsioon oli üle 0.1, vahetuvateks.



Joonis 14. Valkudevahetus puhastatud ribosoomides 5 h jooksul. Joonisel on näidatud andmed katsest, kus segati kokku erineva märkega valke sisaldavad ribosoomid, puhastati 70S+tag ribosoomid ning analüüsiti märke osakaalu muutust nendes. Y-teljel on toodud MS andmete põhjal arvatud H/M kovariatsioon, mis näitab „rasket“ märget omavate valkude osakaalu 70S+tag ribosoomides. 70S+tag ribosoomid sisaldasid enne kokku segamist ainult „kerge“ märkega valke, seega oli „raske“ märke osakaal nendes 0. Sellest tulenevalt loeti kõik valgud, mille H/M kovariatsioon jäi alla 0.1, mittevahetuvateks ning kõik valgud mille H/M kovariatsioon oli üle 0.1, vahetuvateks.

Joonisel 14 on toodud andmed katsest, kus uuriti valkudevahetust ribosoomide puhastamise protsessi käigus 5 h jooksul. graafikul on näidatud „raske“ märkega valkude osakaalu muutus (H/M kovariatsioon) 70S+tag ribosoomides. Sellelt on näha, et L33 on ainuke valk, mille „raske“ märke osakaal on üle 0,1. H/M kovariatsioon on ligikaudu 0,4 valgu L33 jaoks, mis tähendab et 5h jooksul ei ole ta jõudnud veel tasakaalu seisundisse, aga on suurel määral juba vahetunud. See tähendab, et puhastatud ribosoomides, 5 h jooksul, vahetub ainult valk L33.

Tänu sellele, et mõlemas eksperimendis kasutati „keskmise“ märkega valke sisaldavaid ribosoomide, kui sisemise standardina, oli võimalik võrrelda joonisel 11, 13 ja 14 toodud andmeid üksteisega. Jooniste 11, 13 ja 14 võrdlusest oli näha, et valgud L7/L12, L10 ja L11 vahetuvad ribosoomides eraldamise käigus lüsaatidest, kuid mitte puhastatud ribosoomides 48 või 5 h jooksul. Sellest saab järeldada, et raku lüsaatides on midagi, mis vahendab või viib

läbi valkude L7/L12, L10 ja L11 vahetumist ribosoomides. Valgud L1 ja L9 vahetusid sarnaselt ribosoomide eraldamise katses ja puhastatud ribosoomide katses 48 h jooksul. Samas ei vahetunud nad puhastatud ribosoomides 5 h jooksul. Seega vahetuvad ribosoomivalgud L1 ja L9 sõltumata sellest, kas and on lüsaadis või puhvril. Ainuke valk, mis käitus ühtemoodi kõikides katsetes, oli L33. L33 puhul saab järeldada, et tema vahetus ribosoomides toimub kiiresti olenemata kas ta viibib lüsaatidest eraldamise proovides või puhastatud ribosoomide proovides.

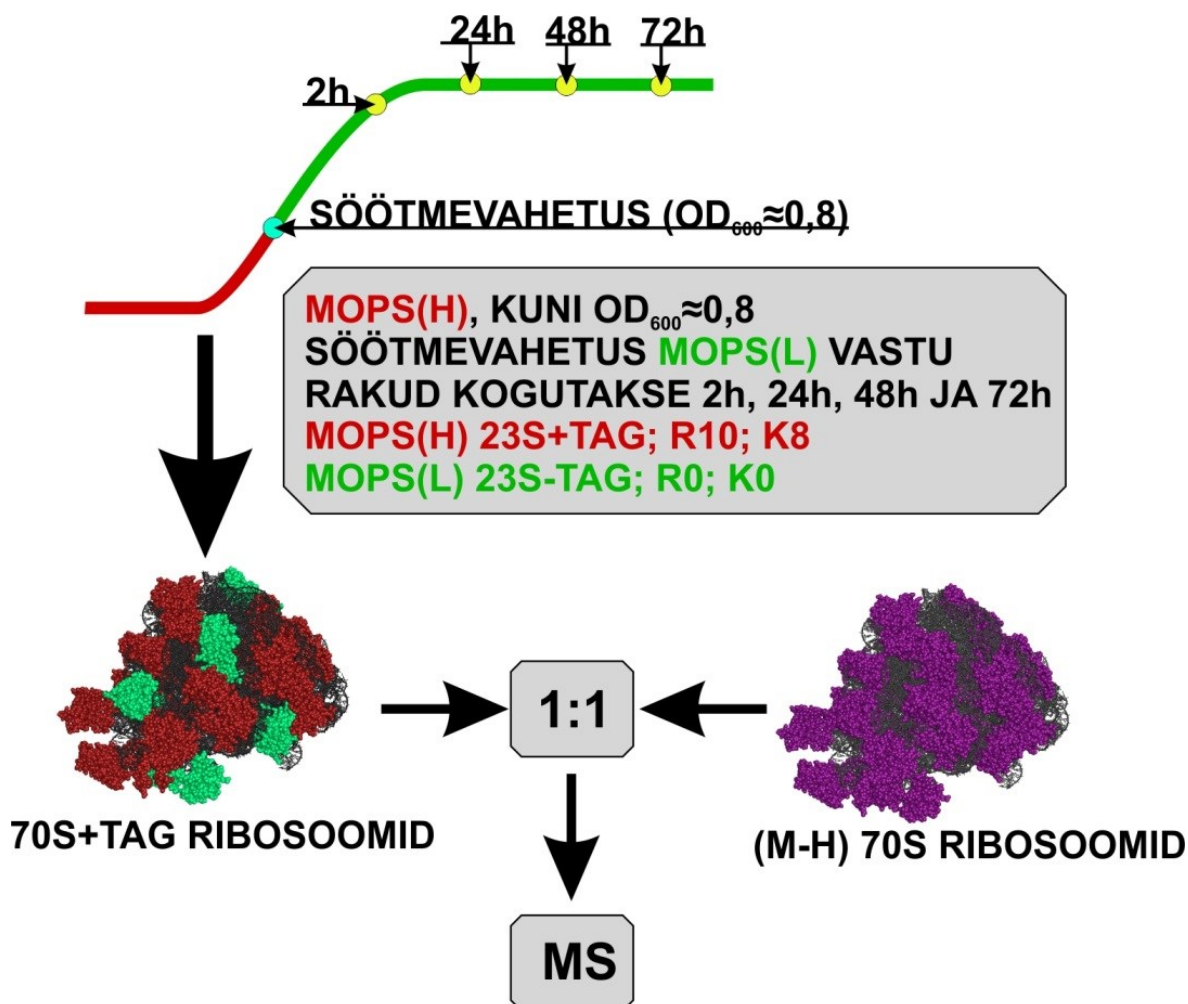
5.3.4 *De novo* sünteesitud ribosoomivalkude lülitumine vanadesse 70S ribosoomidesse

Selleks, et jälgida äsja sünteesitud ribosoomivalkude vahetumist, juba assambleeritud 70S ribosoomidesse rakukultuuri erinevates kasvufaasides, viidi läbi kaks valguvahetuse katset: *de novo* sünteesitud valkudevahetus statsionaarses ning eksponentsiaalses kasvufaasis.

5.3.4.1 *Valkudevahetus statsionaarses kasvufaasis*

Valguvahetuse uurimiseks statsionaarses kasvufaasis kasvatati *E.coli* MG1655 *SILAC*+*pBAD-t ARA* rakke MOPS(H) söötmes, kus indutseeriti plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisades söötmesse arabiinose (0,2%). Kuna MOPS(H) sööde sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$), siis kõik rakud sünteesisid ainult „raske“ märkega valke. Lisaks sellele toimus MOPS(H) söötmes ka 70S+tag ribosoomide assambleerimine. Optilise tiheduse $\approx 0,8$ juures viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) söötme vastu, kus represseriti plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, asendades arabiinose lisarepressori glükoosiga (0,2%). Tänu söötmevahetusele, ei olnud enam võimalik „raske“ märkega valkude süntees, vaid sünteesiti ainult „kerge“ märkega valke. Teoorias ei toimunud enam ka 70S+tag ribosoomide assambleerimist, samas arvestades eelnevalt läbi viidud kontrollkatset, oli teada et *pBAD-t ARA* plasmiid lekitab rakukultuuri jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi. Rakud koguti 0, 2, 24, 48, 72 tundi peale söötmevahetust ning nendest eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. 70S ribosoomidest puhastati 70S+tag ribosoomid streptavidiin-sefaroos kolonnil. 70S+tag ribosoomid segati 1:1-le kokku „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega ning analüüsiti märke sisaldust r-valkudes HPLC-MS/MS-iga. MS andmete põhjal arvutati r-valkude L/M ja H/M suhted, millest omakorda arvutati „kerge“ märkega valkude osakaal vaadeldud valkudes: „kerge“ osakaal = $\frac{L/M}{L/M+H/M}$. Saadud väärtus iseloomustab „kerge“ märkega valkude suhtelist osakaalu 70S+tag ribosoomides. Enne söötmevahetust sisaldasid kõik 70S+tag ribosoomid ainult „raske“ märkega ribosoomivalke. Seega juhtumil, kui 70S+tag

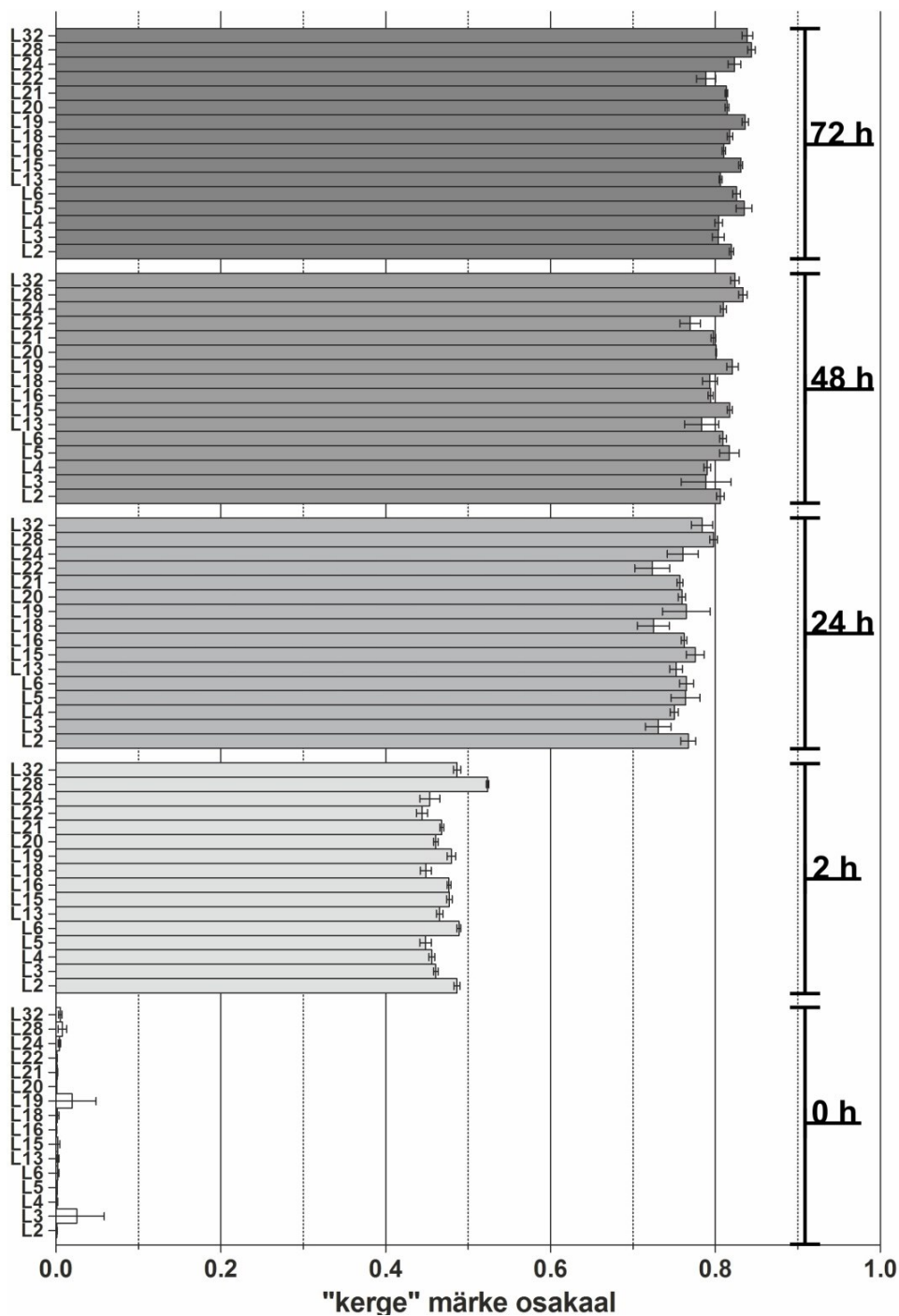
ribosoomides esineb „kerget“ märgat sisaldavaid ribosoomivalke, on toimunud valguvahetus. Samas tuli arvesse võtta, et *pBAD-t ARA* plasmiid lekib rakkude statsionaarses kasvufaasis. Osakaalude juures tuli arvestada, et kui valkude osakaal jõuab väärtuseni 0.5, siis ei ole enam võimalik valguvahetust jälgida, sest sellisel juhtumil ei Katse skeem on toodud joonisel 15 ja tulemused joonisel 16.



Joonis 15. *De novo* sünteesitud ribosoomivalkude lülitumine vanadesse 70S ribosoomidesse statsionaarses kasvufaasis – katseskeem. Rakke kasvatati MOPS(H) söötmes (punane), mis sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ja lüsiini, kuni optilise tiheduseni $\approx 0,8$. Söötmevahetus viidi läbi MOPS(L) söötme vastu (roheline), mis sisaldas ilma isotoop märketa arginiini ja lüsiini. „Rasket“ märgat sisaldavad valgud illustreeritud joonisel roheliselt ning „kerget“ märgat sisaldavad punaselt. Rakud koguti 0, 2, 24, 48 ja 72h peale söötmevahetust, eraldati 70S ribosoomid, millest puhastati 70S+tag ribosoomid. 70S+tag ribosoomid segati kokku 1:1 suhtes „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega (lilla) ning analüüsiti HPLC-MS/MS-s. 70S+tag ribosoomid sisaldasid enne söötmevahetust

ainult „raske“ mäkega r-valke ehk peale söötmevahetust mõõdeti „kerge“ mäkega r-valkude sisalduse muutust 70S+tag ribosoomides.

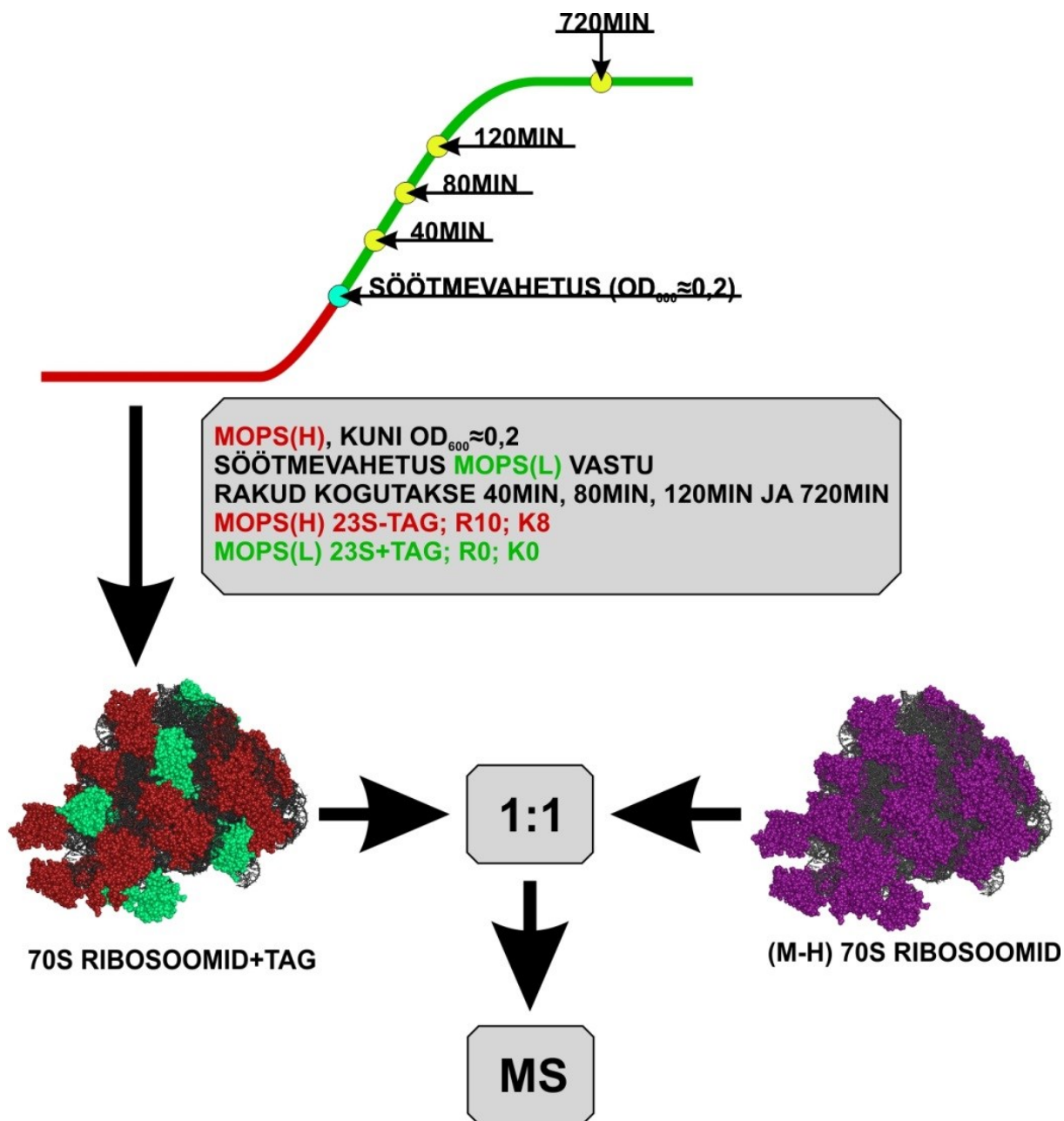
Joonisel 16 on toodud *de novo* sünteesitud ribosoomivalkude lülitumine 70S+tag ribosoomidesse statsionaarses kasvufaasis. Jooniselt puuduvad ribosoomivalgud L1, L7, L9, L10, L11 ja L33, sest need valgud vahetuvad ribosoomide eraldamise käigus (vt. peatükk 5.3.3) ning valgud L14, L17, L23, L25, L27, L29, L30, L31A, L31B, L34, L35, L36A ja L36B, sest nende puhul oli MS andmetes identifitseeritavate peptiidide arv liiga väike ($n \leq 1$). Graafiku X-teljel on toodud „kerge“ mäke osakaal 70S+tag ribosoomide valkudes. *pBAD-t ARA* plasmiid lekib statsionaarses kasvufaasis, seega on seletatav ajapunktides 24, 48 ja 72 h kõikide ribosoomivalkude „kerge“ mäke osakaalu tõus. Kuna promootori lekkimine mõjutab kõiki r-valke ühesuguselt, siis on võimalik vaadata osakaalu muutuse kiirust, et tuletada ribosoomivalkude vahetumist. Esimeses ajapunktis (0h) on näha, et „kerge“ mäke osakaal on ribosoomivalkudes 0. See tähendab, et vahetult peale söötmevahetust olid 70S+tag ribosoomides ainult „raske“ mäkega r-valgud. Ajapunktis 2 h on näha kõikide vaadeldud valkude „kerge“ mäke osakaalu tõusu. See tähendab, et enne statsionaarset kasvufaasi võib toimuda valkudevahetus ribosoomides *in vivo* tingimustel.



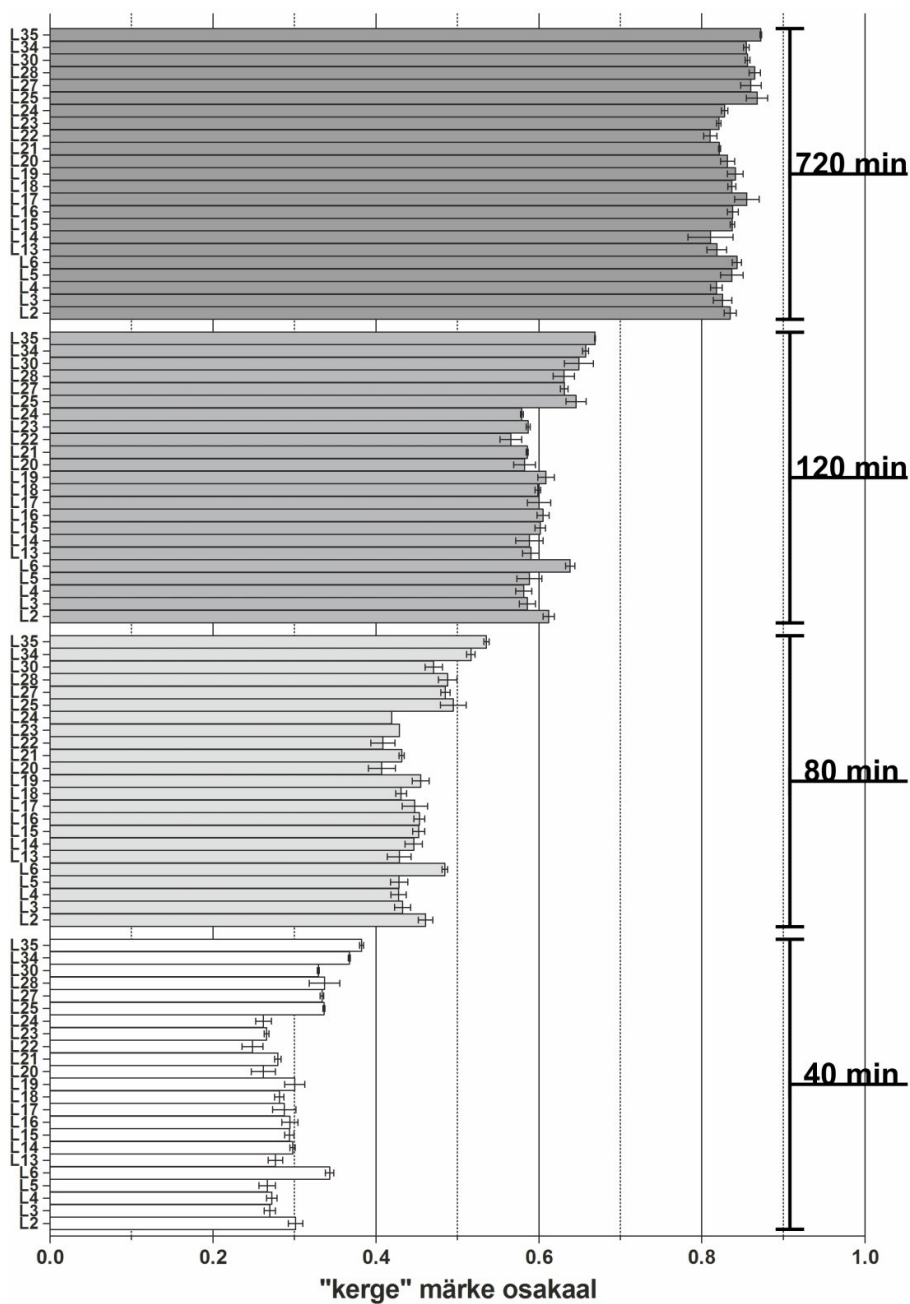
Joonis 16. Ribosoomi valkudevahetus statsionaarses kasvufaasis. Graafikul on toodud andmed katsest, kus kasvatati rakke MOPS(H) söötmes, milles sünteesiti 70S+tag ribosome, kuni $OD_{600} \approx 0,8$ -ni, viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) vastu, kus represseeriti 70S+tag ribosoomide süntees. Rakud koguti valitud ajapunktides ning puhastati 70S+tag ribosoomid. Katses vaadati „kerge“ märkega r-valkude osakaalu muutust 70S+tag ribosoomides statsionaarses kasvufaasis. Joonisel on näidatud individuaalsete ribosoomivalkude „kerge“ märke osakaal 70S+tag ribosoomides 0, 2, 24, 48 ja 72 h peale söötmevahetust. Y-teljel on toodud r-valgud, mis grupeeritud ajapunktide kaupa. Muutused märke osakaalus kirjeldavad valkudevahetust 70S+tag ribosoomidesse.

5.3.4.2 Valkudevahetus eksponentsiaalses kasvufaasis

Järgmiseks vaadeldi valgudevahetust eksponentsiaalses kasvufaasis. Katse skeem on toodud joonisel 17 ja tulemused joonisel 18. Selleks kasvatati *E.coli* MG1655 *SILAC+pBAD-t ARA* rakke MOPS(H) söötmes, kus indutseeriti plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisades söötmesse arabinoosi (0,2%). Kuna MOPS(H) sööde sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$), siis kõik rakud sünteesisid ainult „raske“ märkega valke. Lisaks sellele toimus MOPS(H) söötmes ka 70S+tag ribosoomide assambleerimine. Optilise tiheduse $\approx 0,2$ juures viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) söötme vastu, kus represseriti plasmiidilt 23S+tag rRNA süntees, lisades söötmesse lisarepressorit glükoosi(0,2%). Tänu söötmevahetusele, ei olnud enam võimalik „raske“ märkega valkude süntees, vaid sünteesiti ainult „kerge“ märkega valke. Teoorias ei toimunud enam ka 70S+tag ribosoomide assambleerimist, samas arvestades eelnevalt läbi viidud kontrollkatseid, oli teada et *pBAD-t ARA* plasmiid lekib rakkude jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi. Rakud koguti 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust ning nendest eraldati 70S ribosoomid sahharoosigradiendil. 70S ribosoomidest puhastati 70S+tag ribosoomid streptavidiin-sefaroos kolonnil. 70S+tag ribosoomid segati 1:1-le kokku „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomidega ning analüüsiti HPLC-MS/MS-iga. MS andmete põhjal arvutati r-valkude L/M ja H/M suhted, millest omakorda arvutati „kerge“ märkega valkude osakaal vaadeldud valkudes „kerge“ osakaal $= \frac{L/M}{L/M+H/M}$. Saadud väärtus iseloomustab „kerge“ märkega valkude suhtelist osakaalu 70S+tag ribosoomides. Enne söötmevahetust sisaldasid kõik 70S+tag ribosoomid ainult „raske“ märkega ribosoomivalke. Seega juhtumil, kui 70S+tag ribosoomides esineb „kerget“ märgat sisaldavaid ribosoomivalke, on toimunud valgudevahetus. Samas tuli arvesse võtta, et puudusid andmed *pBAD-t ARA* plasmidi repressiooni efektiivsuse kohta rakkude eksponentsiaalses kasvufaasis.



Joonis 17. *De novo* sünteesitud ribosoomivalkude lülitumine vanadesse 70S ribosoomidesse eksponentsiaalses kasvufaasis. Rakke kasvatati MOPS(H) söötmes (punane), mis sisaldas stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ja lüsiini, kuni optilise tiheduseni $\approx 0,2$. Söötmevahetus viidi läbi MOPS(L) söötme vastu (roheline), mis sisaldas ilma isotoopmärgeta arginiini ja lüsiini. „Rasket“ märges sisaldavad valgud illustreeritud joonisel roheliselt ning „kerget“ märges sisaldavad punaselt. Rakud koguti 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust, eraldati 70S ribosoomid, millest omakorda puhastati 70S+tag ribosoomid. 70S+tag ribosoomid segati kokku 1:1 suhtes „keskmise“ märgesga valke sisaldavate 70S ribosoomidega (lilla) ning analüüsiti HPLC-MS/MS-s.



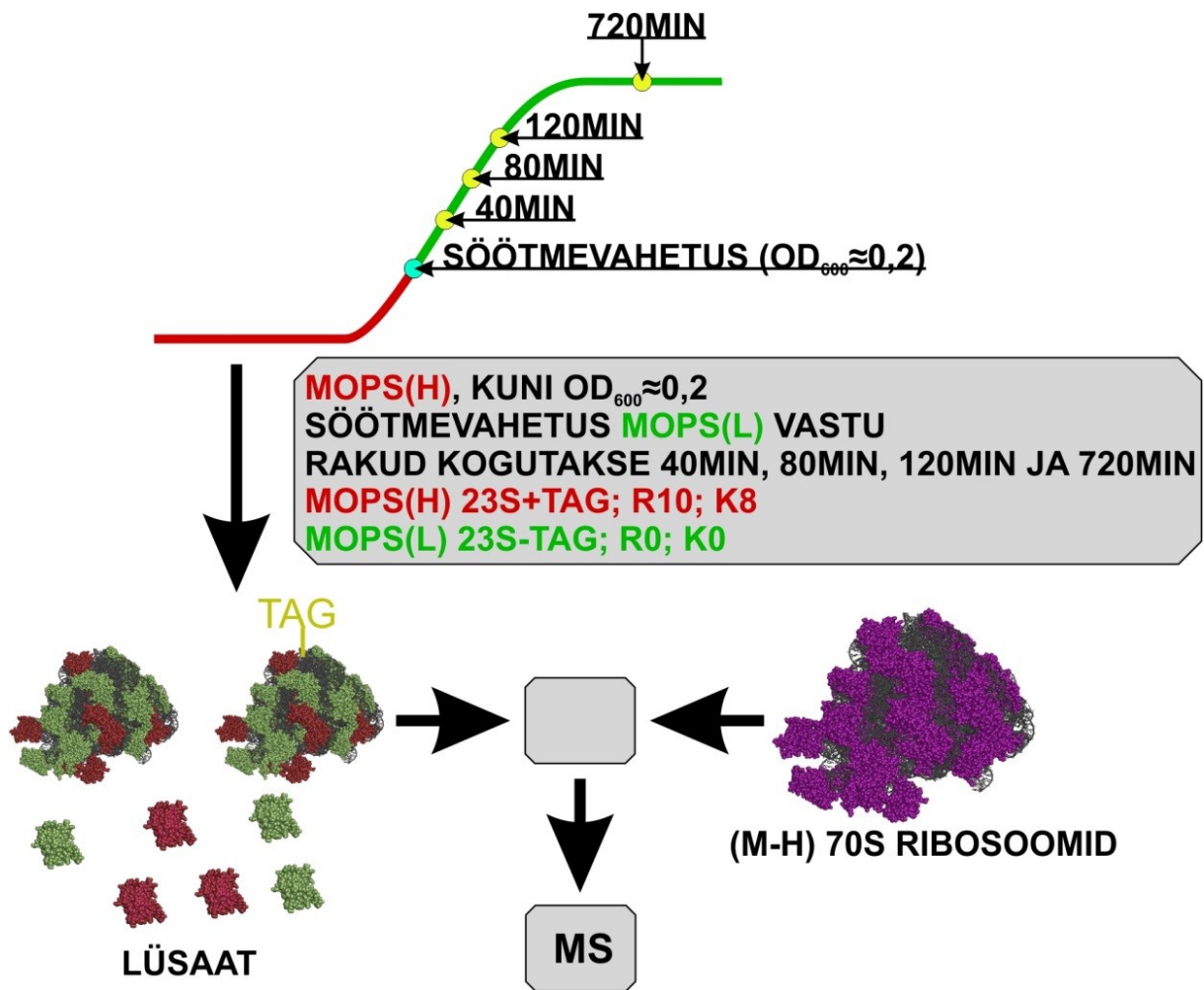
Joonis 18. Ribosoomi valkudevahetus eksponentsiaalses kasvufaasis. Graafikul on toodud andmed katsest, kus kasvatati rakke MOPS(H) söötmes, milles sünteesiti 70S+tag ribosome, kuni $OD_{600} \approx 0,2$ -ni, viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) vastu, kus represseeriti 70S+tag ribosoomide süntees. Rakud koguti valitud ajapunktides ning puhastati 70S+tag ribosoomid. Katses vaadati „kerge“ märkega r-valkude osakaalu muutust 70S+tag ribosoomides eksponentsiaalses kasvufaasis. Joonisel on näidatud individuaalsete ribosoomivalkude „kerge“ märke osakaal 70S+tag ribosoomides 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust. Y-teljel on toodud r-valgud, mis grupeeritud ajapunktide kaupa. Muutused märke osakaalus kirjeldavad valkude lülitumist 70S+tag ribosoomidesse.

Joonisel 18 on „kerge“ märkega r-valkude osakaalu muutus 70S+tag ribosoomides 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust. Järjekordselt puuduvad jooniselt r-valgud L1, L7/L12, L10, L11 ja L33, sest need valgud vahetuvad ribosoomide eraldamise käigus. Lisaks sellele puuduvad graafikult r-valgud L29, L31A, L31B, L32, L36A ja L36B, sest nende puhul ei olnud piisavalt kvantifitseeritavaid peptiide MS andmete analüüsiks ($n \leq 1$).

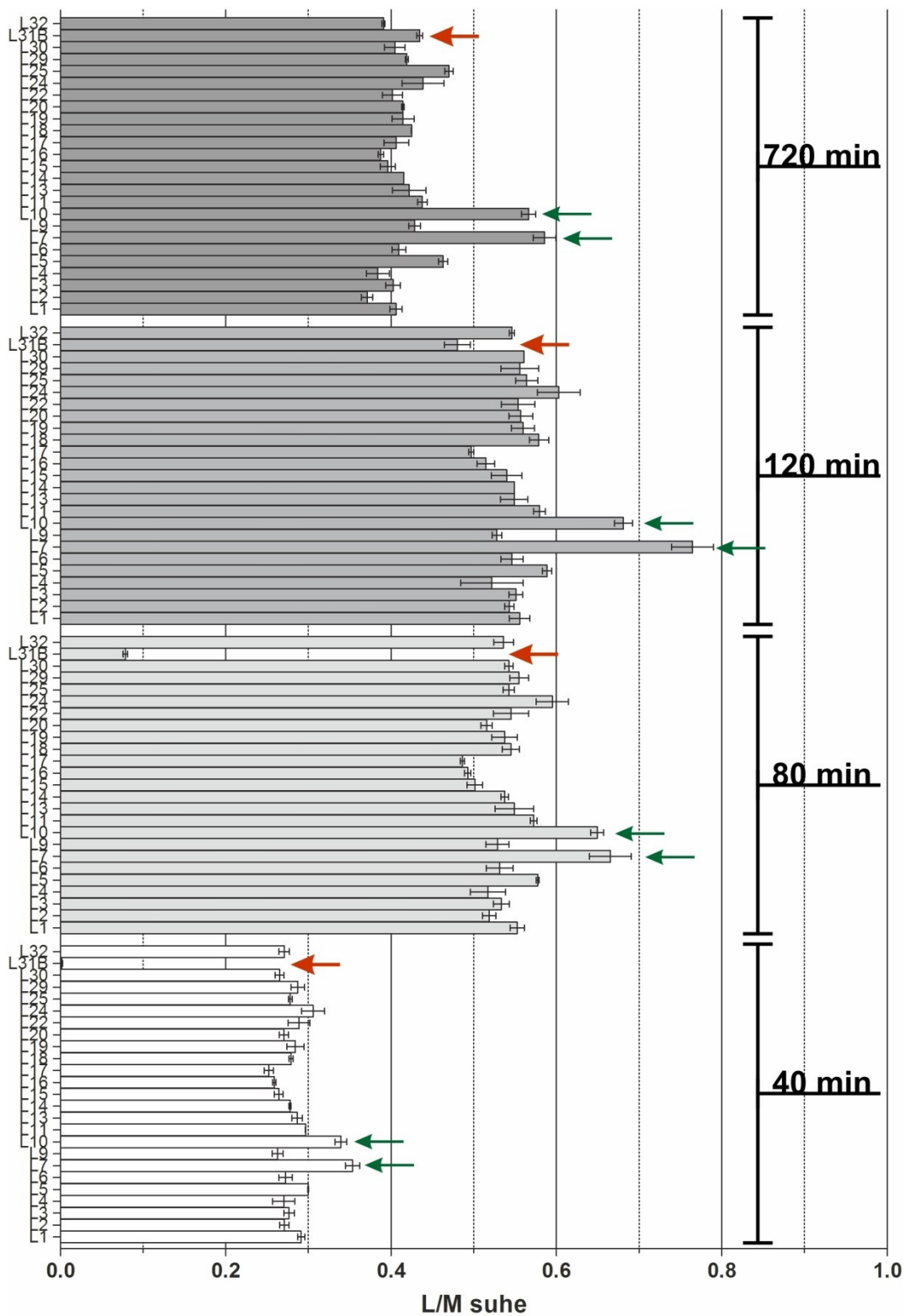
Graafiku 18 X-teljel on toodud „kerge“ märke osakaal 70S+tag ribosoomivalkudes. Jooniselt on näha, et 40, 80, 120 ja 720 minuti ajapunktides tõuseb valkude L2, L3, L4, L5, L6, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L27, L28, L30, L34 ja L35 „kerge“ märke osakaal. Sellest saab järeldada, et kõik need valgud vahetuvad ribosoomides sarnase kiirusega. Samas eelnevatest katsetest on teada, et *pBAD-t ARA* plasmidid lekib rakkude jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi, mille tõttu on vajalik kontrollida *pBAD-t ARA* plasmidi repressiooni eksponentsiaalses kasvufaasis, selleks, et kinnitada siin toodud järeldusi.

5.3.5 Erineva märkega valkude osakaal proteoomis

Valguvahetuse eksperimendis toimub söötmevahetus, mille käigus lõpetatakse „raske“ märkega valkude süntees ning alustatakse „kerge“ märkega valkude sünteesiga. See tähendab, et vahetult peale söötmevahetust on rakkudes ülekaalus „raske“ märkega valgud, kuid aja möödudes suureneb „kerge“ märkega valkude hulk. Selline märke jaotuse muutus proteoomis mõjutab märkespetsiifilist valkudevahetust. Selleks, et vaadelda märgete jaotumist ribosoomivalkudes, oli vajalik kindlaks määrata märgete osakaal r-valkude proteoomis. Selleks võeti proovid rakukultuuridest, mida kasutati ribosoomivalkude vahetuse jälgimiseks eksponentsiaalses kasvufaasis (vt. peatükk 5.3.1). Rakud koguti ajapunktides 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust. Rakud lüüsi, mõõdeti valgusisaldus (OD_{280}) igas proovis, võeti vastavalt valgusisaldusele sama kogus lüsaati ning lisati 45,8ng „keskmise“ märkega valke sisaldavaid 70S ribosome. Proove analüüsiti HPLC-MS/MS-iga. Katse skeem toodud joonisel 19 ning tulemused joonisel 20 ja 21.



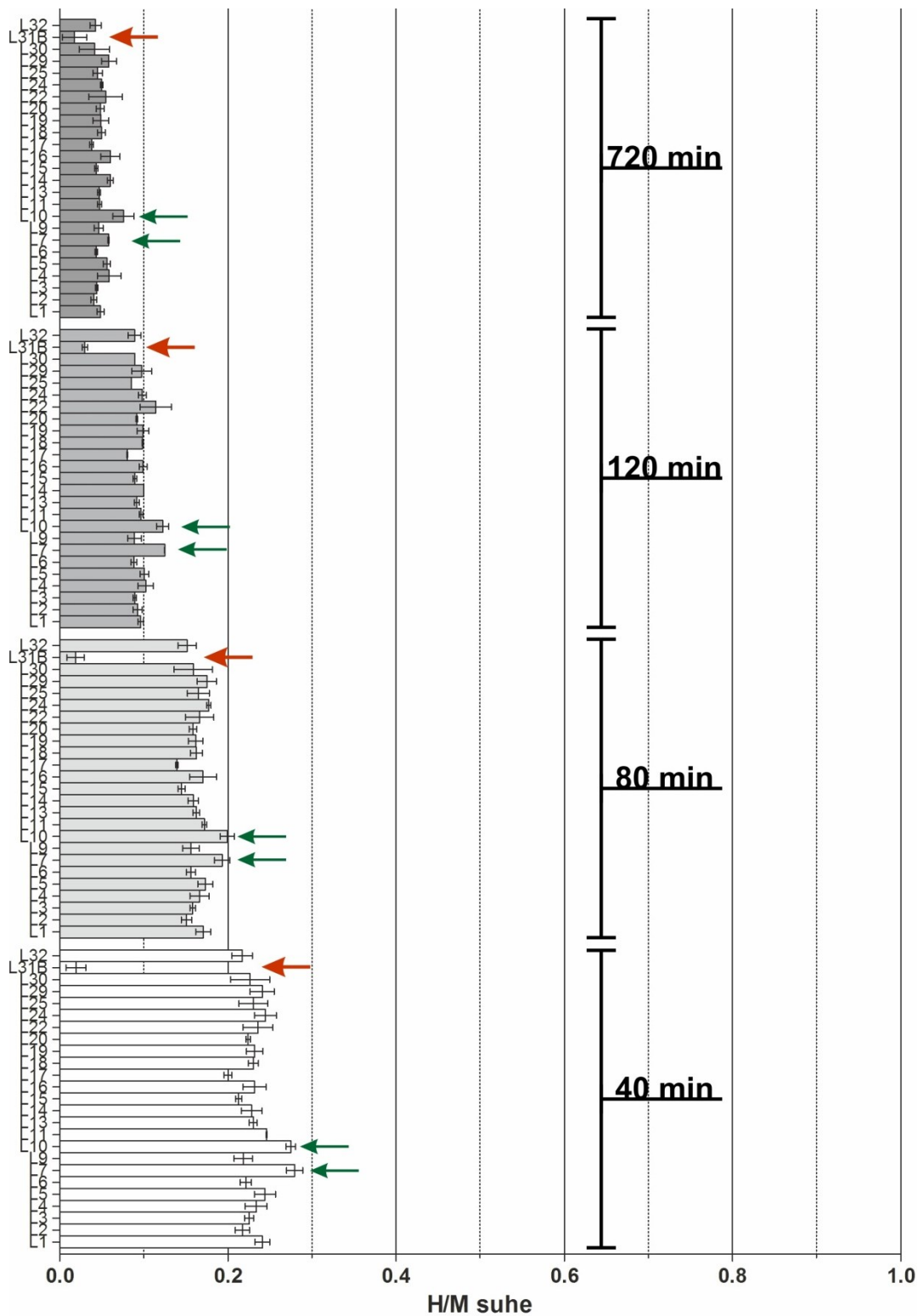
Joonis 19. Erineva märkega valkude osakaal proteoomis – katse skeem. Rakke kasvatati MOPS(H) söötmes (punane), mis sisaldas „stabiilsete isotoopidega märgitud arginiini ja lüsiini ning kus indutseeriti 23S+tag rRNA süntees, kuni optilise tiheduseni $\approx 0,2$. Viidi läbi Söötmevahetus MOPS(L) söötme (roheline) vastu, mis sisaldas ilma isotoopmärketa arginiini ja lüsiini ning kus repressseeriti 23S+tag rRNA süntees. Selle tulemusel oli rakkude proteoomis nii „raske“ märkega valgud (punane) ja „kerge“ märkega valgud (roheline). Rakud koguti 40, 80, 120 ja 720 minutit peale söötmevahetust, lüüsiiti ning mõõdeti lüsaatide valgusisaldus. Vastavalt valgusisaldusele segati lüsaatidesse (45,8 ng/1 μ g kohta) „keskmise“ märkega valke sisaldavaid ribosome (lilla) ning analüüsiti HPLC-MS/MS abil.



Joonis 20. „Kerge“ märega ribosoomivalkude koguse muutus proteoomis. Graafikul on toodud andmed katsest, kus rakke kasvatati rakke MOPS(H) söötmes, viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) vastu, koguti rakud ning mõõdeti „kerge“ märke suhtelist kogust ning selle muutust rakkudes. Graafikul X-teljel on toodud L/M suhe, mis näitab „kerge“ märke kogust „keskmise“ märega valke sisaldavate 70S ribosoomide suhtes. Punase noolega on toodud välja L31B tulbad ning rohelise joonega L7/L12 ja L10 tulbad.

Joonisel 20 on toodud ribosoomivalkude kerge märke koguse muutus „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomide suhtes, mis on esitatud L/M suhtena. Joonisel ei ole ribosoomivalke L21, L23, L27, L28, L31A, L33, L34, L35, L36A ja L36B-d, sest nende puhul oli liiga vähe identifitseeritavaid peptiide ($n \leq 1$) MS analüüsiks. Proovid on võetud peale söötmevahetust ehk olukorras, kus „raske“ märkega valkude süntees ei ole võimalik ning sünteesitakse ainult „kerge“ märkega valke. Seega kirjeldab L/M suhe peale söötmevahetust sünteesitud valkude suhtelisi koguseid proteoomis.

Jooniselt 20 näha, et enamike ribosoomivalkude kogused, ajapunktide raames, on ühesugused. Erandiks on ribosoomivalgud L7/L12 ja L10, mille kogused on võrreldes teiste r-valkudega kõrgemad, ning L31B, mille kogus rakkudes tõuseb aja möödudes. Jooniselt näha kõikide vaadeldud valkude koguse muutus aja jooksul. Valgu koguste muutus on siinjuures märkespetsiifiline ja graafikult on näha, et „kerge“ märkega r-valkude kogus jõuab 80 minutit peale söötmevahetust platoole. See tähendab, et sellest ajapunktist edasi „kerge“ märkega ribosoomivalkude kogus proteoomis enam ei suurene. Erandiks on siinjuures valk L31B, mille kogus tõuseb rakkude liikumisel statsionaarsesse kasvufaasi. 720 minuti punktis on näha, et „kerge“ märkega ribosoomivalkude tase proteoomis väheneb. See tähendab, et rakkude jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi lagundatakse r-valke teatud määral.

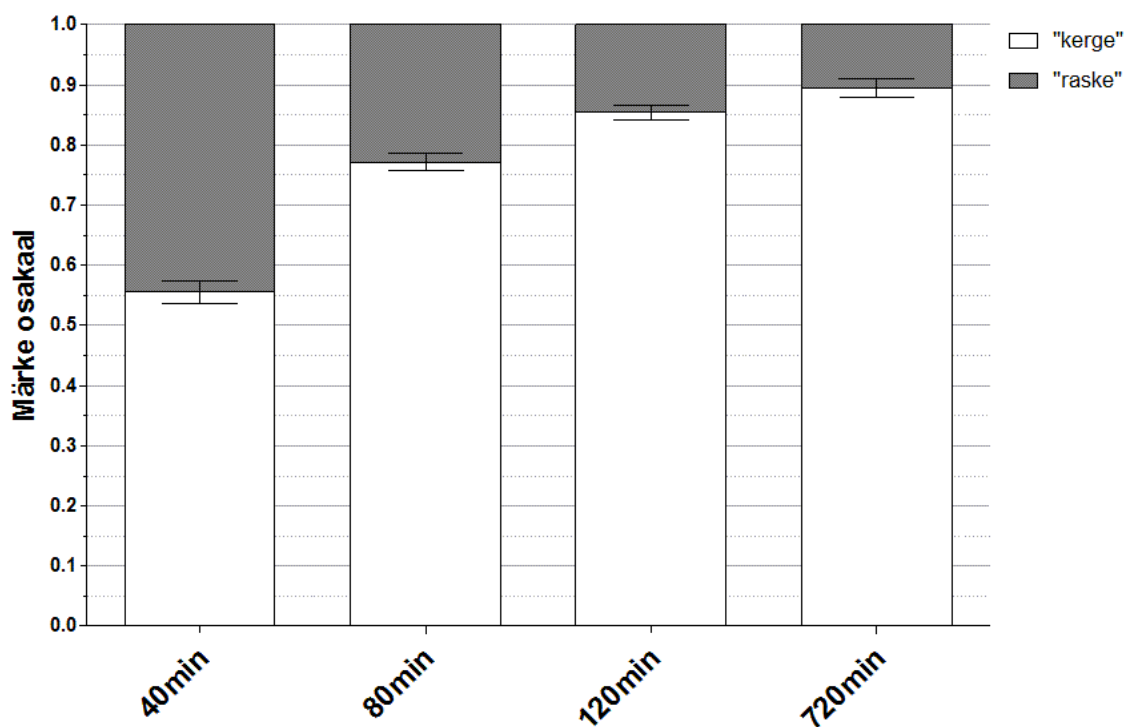


Joonis 21. "raske" märkega ribosoomivalkude taseme muutus rakkudes. Graafikul on toodud andmed katsest, kus rakke kasvatati rakke MOPS(H) söötmes, viidi läbi söötmevahetus MOPS(L) vastu, koguti rakud ning mõõdeti „raske“ märke suhtelist kogust rakkudes. Graafikul X-teljel on toodud H/M suhe, mis näitab „raske“ märke kogust „keskmise“ märkega valke sisaldavate 70S ribosoomide suhtes. Punase noolega on toodud välja L31B tulbad ning rohelise joonega L7/L12 ja L10 tulbad.

Joonisel 21 on toodud „raske“ märke muutus ribosoomivalkude proteoomis. Sarnaselt joonis 20-ga, ei ole joonisel 21 toodud ribosoomivalke L21, L23, L27, L28, L31A, L33, L34, L35, L36A ja L36B-d, sest nende puhul oli liiga vähe identifitseeritavaid peptiide ($n \leq 1$) MS analüüsiks. Proovid on võetud peale söötmevahetust ehk olukorras, kus „raske“ märkega valke ei ole enam võimalik juurde sünteesida ning sünteesitakse ainult „kerge“ märkega valke. Sellest tulenevalt kirjeldab H/M suhe „raske“ märkega ribosoomivalkude kadumist rakkudest. Jooniselt 21 on näha, et sarnaselt „kerget“ märget sisaldavate valkudega, on kõikide „raske“ märkega ribosoomivalkude tase rakkudes, ajapunktide raames, ühesugune. Järjekordselt on erandiks valgud L7/L12 ja L10, mida on 40, 80 ja 120 minuti ajapunktides rohkem kui teisi r-valke. Samuti on näha, et kõikide „raske“ märkega ribosoomivalkude kogus väheneb ühesuguselt ning jõuab 720 minuti punktis ühtlasele tasemele.

Erandiks siin on valk L31B, mille „raske“ märke kogus ajas ei muutu. Siin tuleb aga arvesse võtta kahte tingimust: eelnevalt on näidatud, et L31B ei sünteesita enne rakukultuuri jõudmist statsionaarsesse kasvufaasi ning söötmevahetuse hetkel olid rakud varajases eksponentsiaalses kasvufaasis. Selletõttu on „raske“ märkega L31B valgu kogus siin katses muutumatu ning MS andmete põhjal, võib näidatud kogust lugeda detektsiooni veapiiriks. Arvestades, et kõikide valkude suhtelised kogused on 720 minuti ajapunktis samad, siis saab järeldada, et selles ajapunktis ei ole enam rakkudes „raske“ märkega ribosoomivalke.

R-valkude märke osakaalu muutus rakkudes



Joonis 22. Ribosoomivalkude märke osakaalu muutus rakkudes. Graafikul kasutatud andmeid jooniselt 20 ja 21, selleks et arvutada märgete osakaal ribosoomivalkudes. Y-teljel toodud märke osakaal ribosoomivalkude proteoomis. X-teljel ajapunktid peale söötmevahetust, kus võeti proovid rakukultuurist. Joonisel halliga „raske“ märke osakaal ning valgega „kerge“ märke osakaal.

Kasutades andmeid joonistelt 20 ja 21, on võimalik arvutada märgete osakaal kõigis ribosoomivalkudes. Märgete kogusest tulenevalt on võimalik hinnata valguvahetuse kallutatust „kergelt“ või „raskelt“ märgitud valkude suhtes. Joonisel 22 on toodud märgete osakaal kõikides mõõdetud ajapunktides. Siinjuures on tulpade kõrgused defineeritud kui L/M suhte osakaal L/M ja H/M suhete summast ning veapiirid kirjeldavad erinevate ribosoomivalkude varieeruvust selle suhtes. Jooniselt on näha, et 40 minutiks on „kerge“ märke osakaal ligikaudu pool – see tähendab, et „kerge“ ja „raske“ märkega ribosoomivalke on 40 minutiks võrdselt. 80 minutit peale söötmevahetust on „kerget“ märget juba 4 korda rohkem kui „rasket“, millest tulenevalt toimub valguvahetus ribosoomides suunatult juba „kerget“ märget sisaldavate valkude poole. 720 minuti punktis on „kerge“ märkega valkude osakaal 0,9. Arvestades joonisel 21 toodud H/M suhteid, saab järeldada et 720 minutit peale söötmevahetust on kõik valgud „kerge“ märkega.

5.4 Arutelu

Klassikalise arusaama järgi on ribosoomid RNA-valk kompleksid stabiilsed ning vähe muutuvad, sest muutused ribosoomides võivad mõjutada nende poolt läbiviidavat translatsiooni efektiivsust. Sellest tulenevalt peetakse muutusi ribosoomides haruldaseks ning tavaliselt kaugel nende funktsionaalsetest tsentritest. Samas on näidatud ribosoomi valkude võimekust vahetuda ribosoomides. Selles töös uuriti r-valkude vahetust, selleks et uurida selle tähtsust ning tähendust ribosoomides.

Ribosoomivalkude vahetust on eelnevalt näidatud valkude L1, L7/L12, L9, L10, L11 ja L33 puhul *in vitro* tingimustel (Pulk et al., 2010). Need tulemused langevad kokku siin töös tehtud järeldustega, r-valgud L1, L9, L10, L11, L7/L12 ja L33 vahetuvad ribosoomide eraldamise protsessi käigus. Samas ei vahetunud kõik mainitud valgud samades tingimustes ning sama kiiresti. Valgud L7/L12, L10 ja L11 vahetusid ribosoomide vahel ainult nende eraldamisel rakkudest, kuid mitte eelnevalt puhastatud ribosoomides aja jooksul. Selle tõttu on võimalik, et nende valkude vahetuseks on vajalik mingi faktor, mis on olemas rakkudest eraldamise lahuses, kuid mitte puhastatud ribosoomide lahuses. Valgud L1 ja L9 vahetusid nii rakkudest eraldatud proovides kui ka eelnevalt puhastatud ribosoomide proovides, aga nende vahetus toimus pika aja jooksul. Valk L33 oli ainuke, kes vahetus nii rakkudest eraldamise käigus kui ka eelnevalt puhastatud ribosoomides ning seda lühikese aja jooksul.

L7/L12 ja L10 moodustavad kompleksi $(L7/L12)_4L10$, mis asub ribosoomi pinnal ning aitab siduda translatsioonifaktoreid ribosoomidele. See kompleks omakorda on seotud ribosoomi külge läbi valgu L11. Eelnevalt on näidatud, et *in vitro* tingimustes vahetuvad L7/L12 dimeerid ribosoomide vahel (Hamel et al., 1972; Kische et al., 1971). Kuna $(L7/L12)_4L10$ kompleks osaleb translatsioonifaktorite sidumisel ribosoomidele, on võimalik, et tema vahetus mängib rolli seondumise läbiviimisel. Nimelt on kaks võimalust, kuidas $(L7/L12)_4L10$ kompleks saab siduda faktoreid ribosoomile: esimese puhul on ta seotud ribosoomide külge ning seob translatsioonifaktoreid „mööda minnes“, teine võimalus on see, et ta dissotseerub ribosoomilt, seob faktorid endale ning liigub tagasi ribosoomile. Tulemused siin töös viitavad viimase mudeli võimalikkusele. See aga viitab sellele, et $(L7/L12)_4L10$ vahetus on katalüüsitud seni defineerimata faktori poolt. Valgu L11 puhul on teada, et osaleb *stringent response* vastuse tekitamisel rakkudes ning tema tsentraalses rollis antibiootikumi thiostrepton-i resistentsuse tekitamises. Mõlemad mainitud faktid aga ei anna aru milleks peaks see valk vahetuma. Vastus peitub arvatavasti ikkagi $(L7/L12)_4L10$ kompleksis, mis on seotud ribosoomi külge osaliselt läbi L11.

Valgud L1 ja L9 on sammuti ribosoomi perifeerias asuvad valgud, mis ei ole seotud tugevalt ribosoomiga. Valkude L1 ja L9 puhul on näidatud, et nad ei ole hädavajalikud translatsiooni läbi viimiseks ning rakutüved ilma nende valkudeta on eluvõimelised (Dabbs, 1986; Herr et al., 2001). L1 arvatakse, et ta osaleb tRNA eemaldamisel ribosoomi E-saidist. L1 puhul on näidatud, et tema geeni deleteerimisel rakkudest väheneb ribosoomide võimekus sünteesida polüpeptiide 40-60%. Samas lisades selliselt tüvest eraldatud ribosoomidele puhastatud L1 valku, taastub nende originaalne translatsiooniline võimekus (Wilson ja Nierhaus, 2005). Seega juhtumil kui L1 valk on saanud kahjustada ribosoomides, siis on tema vahetusega võimalik taastada ribosoomi algne translatsiooni efektiivsus.

L9 on struktuurselt huvitav valk, mis sisaldab kahte RNA siduvat globulaarset domeeni, mis on omavahel seotud pika heeliksiga. Tema puhul on täheldatud mõju ribosoomide „libisemisele“. Efekti kirjeldati esimesena T4 geen 60 mRNA puhul, kus ribosoomid peavad „libisema“ üle 50 nukleotiidse lõigu mRNA selleks, et jätkata translatsiooni. Ribosoomides, kus ei olnud olemas valku L9 toimus „libisemine“ 3,5% efektiivsusega võrreldes ribosoomidega, kus oli valk L9 (Adamski et al., 1996).

L33 on väike globulaarne valk, mille puhul on teada, et tema deletsioon ei oma efekti ei ribosoomi assambleerimisel ega funktsioneerimisel (Maguire ja Wild, 1997). Samas on valguga L33 vahetust märgatud mitmetes valguvahetuse töödes. Siin töös avaldatud tulemuste põhjal on võimalik öelda, et valk L33 on „tõeline“ vahetuja ribosoomides. See tähendab, et tema vahetus on mõjutatud ainult tema dissotsiatsiooni- ja assotsiatsiooni-konstandi poolt.

In vivo uuringud varieeruvad oma tulemustelt, mis võib olla põhjustatud erinevatest eksperimentaalsetest lähenemistest valguvahetuse uurimiseks. Sellest tulenevalt on arvatud, et ribosoomivalgude vahetus võib olla tingimuslik. *In vivo* on näidatud ribosoomivalgude L1, L5, L9, L10, L11, L13, L15, L16, L17, L19, L22, L30, L31, S2, S4, S5 ja S9 vahetus sügavas statsionaarses kasvufaasis. Kuna nendel tingimustel on rakkude elutegevus, ning läbi selle ka ribosoomide poolt läbiviidav translatsioon minimaalne, siis valguvahetuse jälgimine sellistel tingimustel annab infot vahetuse toimumise, kuid mitte selle mõju kohta elutegevusele. Sellest tulenevalt ka selle töö eesmärk leida viis, kuidas kirjeldada ribosoomides toimuvat valguvahetust rakkude elu käigus.

Selles töös avaldatud tulemustest järeldati, et ribosoomivalgud L2, L3, L4, L5, L6, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L27, L28, L30, L34 ja L35 vahetuvad ribosoomides sarnase kiirusega, *in vivo* tingimustel. Võttes arvesse, et valgud

erinevad nii oma interaktsioonide poolest rRNA kui ka suuruse poolest, siis peaks vahetust läbi viiv mehhanism olema ka kõiki valke hõlmav. Varasemalt on näidatud, et 30S alamühiku assambleerimisel kasutatakse juba valmis alamühikutes paiknevaid valke (Sykes et al., 2010). Seega on hüpoteetiliselt võimalik olukord, kus juba assambleeritud ribosoomi uuesti „lahti pakitakse“ ning selle käigus toimub valgulise koostise muutus. Samas tähendab see seda, et valkudevahetus ribosoomides oleks mõjutatud ribosoomide biogeneesi aktiivsusest. Eelnevalt on näidatud, et ribosoomide biogenees ei ole ühesuguse aktiivsusega kõikides kasvufaasides. Sellest tulenevalt peaks valkudevahetuse kiirus ning aeg olema korrelatsioonis biogeneesi aktiivsusega rakkudes. Sellist korrelatsiooni selles töös avaldatud tulemustes ei täheldatud.

Kuna kõik valgud käitusid sarnaselt eksponentsiaalse kasvufaasi katses, siis on seda tulemust võimalik seletada ka *pBAD-t ARA* promootori lekkimisega. Kontroll-katses näidati, et rakkude statsionaarses kasvufaasis, sünteesitakse *pBAD-t ARA* plasmiidilt 23S+tag rRNA-d ka lisarepressori juuresolekul. Kahjuks ei ole võimalik selle kontroll-katse järgi öelda, kuidas toimib *pBAD-t ARA* plasmidi repressioon rakkude eksponentsiaalses kasvufaasis. Seega on nii järelduse kinnitamiseks kui ka ümberlukkamiseks vajalik kontroll katse, mis näitaks *pBAD-t ARA* promootori repressiooni efektiivsust rakkude eksponentsiaalses kasvufaasis.

Ribosoomivalkude proteoom rakkudes on kogumik nii valkudest, mis on ribosoomidega seotud, kui ka valkudest, mis ei ole seondunud ribosoomile. Läbi selle on võimalik kirjeldada valkude kogust, mass-spektromeetria abil, üksteise suhtes kui ka korrektse standard olemasolul või märkevaba kvantifitseerimist kasutades, kogu raku proteoomis. Varasemalt on näidatud, et proteoomis on ribosoomivalkude tase ühesugune, väljaarvatud valkude L7/L12 ja L10 puhul. Selles töös näidatud andmetest oli näha, et ribosoomivalkude kogused rakus ei erinevad üksteisest märkimisväärselt. Ainsad kaks erandit siin juures olid r-valgud L7/L12 ja L10. Seega on selles töös näidatud andmed korrelatsioonis eelnevalt avaldatud tulemustega.

Selles töös kasutatud eksperimentaalne lähenemine ribosoomi proteoomi uurimiseks rakkudes, võimaldab lisaks ribosoomivalkude koguste kvantifitseerimisele ka uurida ribosomaalsete valkude sünteesi- ja degradatsioonikiirust sõltuvalt rakkude kasvufaasist. Ribosoomivalkude sünteesi- ja degradatsiooni on keeruline vaadelda eraldi *in vivo* tingimustel. Selles töös kasutatud eksperimentaalne lähenemine on üks võimalikest meetoditest valkude translatsiooni ning lagundamise uurimiseks *in vivo* tingimustel.

6 KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli leida meetod, mis võimaldaks uurida ribosoomides toimuvat valkudevahetust *in vivo* tingimustes ning iseloomustada r-valkude vahetust selle kaudu. Nende saavutamiseks kasutati *Escherichia coli* MG1655 (*F*-, λ -, *rph-1*, Δ *lysA*, Δ *argA*), teise nimega *E.coli* MG1655 SILAC tüve, millesse oli transformeeritud *pBAD-t ARA* (*pBAD* promootor, *araC*, *Amp^R*, *rrnB*) plasmiid. Tulemuseks oli tüvi, kus ei olnud võimalik arginiini ja lüsiini *de novo* sünteesida ning plasmiidilt oli võimalik indutseerida või repressseerida märgitud 23S rRNA-d. Kuna rRNA spetsiifiline tag esines ainult 23S rRNA-s, siis sellest tulenevalt uuriti ainult 50S alamühiku valke.

Töö raames kasvatati *E.coli* MG1655 SILAC+ *pBAD-t ARA* rakke algul söötmes, kus indutseeriti 23S+tag rRNA süntees ning r-valgud sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgitud aminohappeid. Peale seda viidi läbi söötmevahetus, mille tulemusel repressseeriti 23S+tag rRNA süntees plasmiidilt ning sünteesitavad r-valgud ei sisaldanud enam märgitud aminohappeid. Sellest tulenevalt mõõdeti märgitud ja mitte-märgitud valkude suhtelist kogust 23S+tag sisaldavates ribosoomides ning läbi osakaalu muutuste kirjeldati valkudevahetust.

Meetodit kasutades kirjeldati ribosoomi 50S alamühiku r-valkude vahetust erinevatel tingimustel. Meetodi abil näidati, et valgud L1, L9, L10, L7/L12, L11 ja L33 vahetusid ribosoomide eraldamise käigus, millest tulenevalt ei olnud võimalik vaadelda valguvahetust nende puhul *in vivo* tingimustel. Lisaks sellele näidati, et valgud L7/L12, L10 ja L11 vahetuvad ainult ribosoomide eraldamisel lüsaatidest, aga valgud L1, L9 ja L33 vahetuvad ka puhastatud ribosoomides.

Selle töös läbiviidud *in vivo* katsetest järeldati, et valgud L2, L3, L4, L5, L6, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L27, L28, L30, L34 ja L35 on võimelised vahetuma ribosoomides, eksponentsiaalses kasvufaasis. Lisaks sellele nähti, et valkude vahetuskiirus ei erinenud valkude vahel. See tähendab, et enamus ribosoomi koostises olevatest valkudest on võimelised vahetuma ning valkudevahetus toimub sarnase kiirusega kõikide vaadeldud valkude jaoks.

Ribosomal protein exchange in *Escherichia coli* cells

Kaspar Reier

7 SUMMARY

The ribosome is a large ribonucleoprotein particle that is responsible for protein synthesis in every organism. *Escherichia coli* ribosome consists of 3 ribosomal RNA-s and 54 ribosomal proteins. According to the classical viewpoint, ribosome is very stable and less likely to change both conformationally and functionally. However it has been experimentally shown that changes in growth conditions can induce changes in r-protein composition of ribosome, including protein modifications and/or protein exchange.

The aim of the present study is to observe and characterize ribosomal protein exchange in *E.coli* cells under *in vivo* conditions. In order to achieve that, we developed a method that has a minimal influence on the vital functions of bacterial cells and used it to characterize protein exchange in the large subunit of ribosomes. The method was based on SILAC to detect changes in protein composition of ribosomes, using mass-spectrometry.

In this study, we conclude that ribosomal proteins L1, L7/L12, L9, L10, L11 and L33 exchange under *in vitro* conditions during ribosome purification from the cells. Due to that, this method cannot be used to characterize exchange for mentioned proteins under *in vivo* conditions. In addition to this, it was shown that proteins L1, L9 and L33 exchange in all stages of purification with different speed, while L7/L12, L10 and L11 exchange only when extracted from lysates.

From *in vivo* experiments we were able to conclude that proteins L2, L3, L4, L5, L6, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L27, L28, L30, L34 and L35 can exchange in exponential growth phase. The speed of the exchange was similar for all proteins.

8 TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Aivar Liiva abi, nõu ning kriitika eest, ilma milleta ei oleks selle magistr töö valmimine olnud võimalik. Sammuti soovin tänada professor Jaanus Remme-t, kelle teadmised ning arutelud minuga võimaldasid mul saavutada teatud arusaadavus ning selgus käsitletud teemades. Lisaks tänan vanemteadurit Lauri Peili tema jagatud teadmiste eest proteoomika kohta.

Lõpetuseks tänan oma perekonda, sõpru ning tuttavaid, ilma kelleleta ei oleks sellist inimest nagu Kaspar Reier olemas.

9 KASUTATUD KIRJANDUS

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920.

Barillot, E., et al. (2012). *Computational Systems Biology of Cancer*. CRC Press. Florida.

Catherman, A.D., Skinner, O.S., Kelleher, H.L. (2014). Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun*. 445: 683-93.

Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Kahan, L., Nomura, M. (1980). *Ribosomes: Structure, Function, and Genetics*. University Park Press. Baltimore.

Chen, C. H. (2008). Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta*. 624: 16-36.

Condon, C., Squires, G. And Squires, C. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 59: 623-645.

Deroo, S., Hyung, S.J., Marcoux, J., Gordiyenko, Y. Koripella, R.K., Sanyal, S., Robinson, C.V. (2012). Mechanism and Rates of Exchange of L7/L12 between Ribosomes and the Effects of Binding EF-G. *ACS chem Biol*. 7:1120-7.

Edmonds, C.G. and Smith, R.D. (1990). Electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 193: 412-31.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246: 64-71.

Gabashvili, I. S., Gregory, S.T., Valle, F., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M.C., Dahlberg, A.E., Frank, J. (2001). The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol. Cell* 8:181–188.

Han, X., Aslanian, A. and Yates, J. R., 3rd (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 12: 483-490.

- Hamel, E., Koka, M., and Nakamoto, T. (1972). Requirement of an *E. coli* 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 247: 805–814.
- Helgstrand, M., Mandava, C. S., Mulder, F. A. A., Liljas, A., Sanyal, S., and Akke, M. (2007). The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J. Mol. Biol.* 365, 468–479.
- Hennelly, S. P., Antoun, A., Ehrenberg, M., Gualerzi, C. O., Knight, W., Lodmell, J. S. and Hill, W. E. (2005). A time-resolved investigation of ribosomal subunit association. *J Mol Biol.* 346: 1243-1258.
- Herold, M. and Nierhaus, K.H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262: 8826-8833
- Herold, M., Nowotny, V., Dabbs, E.R. and Nierhaus, K.H. (1986). Assembly analysis of ribosomes from a mutant lacking the assembly initiator-protein L24: lack of L24 induces temperature sensitivity. *Mol. Gen. Genet.* 203: 281-287.
- Ishihama, Y., Schmidt, T., Rappsilber, J., Mann, M., Hartl, F.U., Kerner, M.J. and Frishman, D. (2008). Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics.* 9:102.
- Kaczanowska, M. and Ryden-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 477-494.
- Kischa, K., Möller, W., and Stöffler, G. 1971. Reconstitution of a GTPase activity by a 50S ribosomal protein from *E. coli*. *Nature New Biol.* 233:62–63.
- Klein, D. J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol.* 340: 141-177.
- Liiv, A. (1998). Ribosomal Large Subunit Assembly in vivo. Tartu Ülikooli Trükikoda. Tartu.
- Lu, B. and Chen, T. (2004). Algorithms for de novo peptide sequencing using tandem mass spectrometry. *Biosilico vol.2. 2:* 85-90.

- Maguire, B.A. and Wild, D.G. (1997). Mutations in the rpmBG Operon of *Escherichia coli* That Affect Ribosome Assembly. *J Bacteriology*. 179(8): 2486-2493.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K. and Horning, S. (2006). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*. 78: 2113-2120.
- Mallick, P. and Kuster, B. (2010). Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol*. 28: 695-709.
- May, C., Brosseron, F., Chartowski, P., Schumbrutzki, C., Schoenebeck, B. and Marcus, K. (2011). Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol*. 696: 3-26.
- Moore, P. B. and Steitz, T.A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem*. 72:813–850
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. and Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol*. 119: 736-747.
- Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H. (2012). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. *Methods in Molecular Biology*. 893: 85–100.
- Noeske, J., Wasserman, MR., Terry, DS., Altman, RB., Blanchard, SC., Cale, JH. (2015). High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome. *Nat Struct Mol Biol*. 22: 336-41.
- Noller, H.F., Hoffarth, V., Zimniak, L. (1992). Unusual Resistance of Peptidyl Transferase to Protein Extraction Procedures.
- Noller, H. F. and Nomura, M. 1996. Ribosomes, p. 167-186. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
- Nomura, M., Gourse, R.L. and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. BioChem*. 53: 75-117.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 1: 376-386.

- Ong, S. E. and Mann, M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol.* 1: 252-262.
- Ong, S. E. and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc.* 1: 2650-2660.
- Parkins, W.E. (2005). The uranium bomb, the calutron, and the space-charge problem. *Physics Today.* 58: 45–51.
- Pulk, A., Liiv, A., Peil, L., Maivali, U., Nierhaus, K. and Remme, J. (2010). Ribosome reactivation by replacement of damaged proteins. *Mol Microbiol.* 75: 801-814.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell.* 108: 557-572.
- Ramakrishnan, V. and Moore, P. B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 144-154.
- Robertson, W. R., Dowsett, S. J. and Hardy, S. J. (1977). Exchange of ribosomal proteins among the ribosomes of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 157: 205-214.
- Rodina, M.V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, HJ., Mohr, D., Matassova, NB., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, CO., Wintermeyer, W. (2000). GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol Chem.* 381:377-87.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science.* 310: 827-834.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. t., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science.* 313: 1935-1942.
- Shao, W. and Lam, H. (2016). Tandem mass spectral libraries of peptides and their roles in proteomics research. *Mass Spectrom Rev.* 1098-2787.
- Sparkman, O.D. (2000). *Mass Spectrometry Desk Reference.* Global View Pub. Pittsburgh

- Steen, H. and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. *Mol. Cell Biol.* Nature Pub Group. 5: 699-711.
- Sykes, M.T., Shajani, Z., Sperling, E., Beck, A.H. and Williamson, J.R. (2010). Quantitative Proteomic Analysis of Ribosome Assembly and Turnover *In Vivo*. *J. Mol. Biol.* 403: 331-345.
- Subramanian, A. R. and van Duin, J. (1977). Exchange of individual ribosomal proteins between ribosomes as studied by heavy isotope-transfer experiments. *Mol Gen Genet.* 158: 1-9.
- Tsiatsiani, L. and Heck, A.J. (2015). Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 282: 2612-26.
- Zengel, J.M. and Lindahl, L. (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Progress Nucleic Acid Res.* 47: 331-370.
- Walther, T. C. and Mann, M. (2010). Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 190: 491-500.
- Wilkins, M., (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16: 1090-4.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. and Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 14: 61-65.
- Wilson, D. N. and Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40: 243-267.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 407: 327-339.
- Wittmann, H. G. (1982). Components of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 51: 155-183.
- Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1984). Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Physical Chemistry.* 88: 4451-4459.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292: 883-896.

Österberg, R., and Sjöberg, B. (1977) Small-angle x-ray scattering study of the protein complex of L7/L12 and L10 from *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett.* 73, 22–24.

10 Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kaspar Reier

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 17.06.1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Ribosoomivalkude vahetus *Escherichia coli* rakkudes“

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Aivar Liiv,

(juhendaja nimi)

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

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

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 18.08.2016 *(kuupäev)*