

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Annika Liiv

**Rakuvaba valgusünteesi rakendamine inimese neuroblastoomi SH-SY5Y
rakuliinis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad PhD Arto Pulk

PhD Kalle Kipper

TARTU 2021

Rakuvaba valgusünteesi rakendamine inimese neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliinis

Lühikokkuvõte:

Bakalaureuse töö eesmärk oli luua inimese neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y kasutades mudelsüsteem erinevate RNA-d siduvate valkude ja komplekside uurimiseks, et neid oleks võimalik välja puhastada ja kasutada struktuuribioloogilistes uuringutes. Töö käigus töötati välja meetodika SH-SY5Y rakuliinist translatsiooniekstrakti eraldamiseks ning ekstrakte kasutades leiti *in vitro* valgusünteesiks K^+ , Mg^{2+} ja mRNA optimaalsed tingimused. Tulemustest selgus, et G3BP-2 seostus mRNA külge ja ei oma endonukleaaset aktiivsust. Valgud G3BP-2 ja Caprin-1 langetasid koosmõjul valgusünteesi aktiivsust rohkem kui ainult G3BP-2-te kasutades, seejuures Caprin-1 valgusünteesile märgatavat mõju ei avaldanud. Western Blot meetod näitas, et translatsiooniekstraktile lisatud G3BP-2 ja Caprin-1 olid ülesindatud 40S subühikuid sisaldavas fraktsioonis.

Märksõnad: Ribosoom, neuroblastoom, RNA, valk

CERCS: Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees (P320)

Implementing the cell free translation in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

Abstract:

The aim of this thesis was to create a model from human neuroblastoma SH-SY5Y cell line for studying different RNA-binding proteins and complexes, to purify and use them in structural biology research. A method for extracting translation extracts from SH-SY5Y cell line was created and extracts were used for optimizing K^+ , Mg^{2+} and mRNA conditions in *in vitro* translation. The results showed that G3BP-2 binded to mRNA without having endonuclease activity. By combining G3BP-2 and Caprin-1 the translational activity decreased more than using G3BP-2 alone while Caprin-1 did not have a noticable effect on translation. The western blot analyses showed that G3BP-2 and Caprin-1 were found in the fraction containing 40S ribosomal subunits when proteins were added to the translation extracts.

Keywords: Ribosome, neuroblastoma, RNA, protein

CERCS: Nucleic acids, protein synthesis (P320)

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Translatsiooni initsiatsioon ja regulatsioon eukarüootides	9
1.2 Eukarüootne mRNA	11
1.3 mRNA transport neuronites RNA-graanulite abil	12
1.4 Neuroblastoomi rakuliin SH-SY5Y	14
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjalid ja meetodika	16
2.2.1 Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y kasvatamine	16
2.2.2 Rakuvaba <i>in vitro</i> translatsiooni ekstrakti valmistamine.....	17
2.2.3 DNA amplifitseerimine PCR meetodil.....	18
2.2.4 mRNA <i>in vitro</i> transkriptsioon ja puhastamine	19
2.2.5 mRNA cap-struktuuri lisamine.....	20
2.2.6 <i>In vitro</i> rakuvaba valgusüntees	21
2.2.7 Lutsiferaasi koguse mõõtmine translatsiooniproovist	22
2.2.8 Geeliinihe mRNA ja G3BP-2 kompleksi moodustumisel	22
2.2.9 Suhkrugradiendi valmistamine	23
2.2.10 Preparatiivses skaalas <i>in vitro</i> translatsiooni reaktsioon valkudega G3BP-2 ja Caprin-1	23
2.2.11 Valgu sadestamine sahharoosi fraktsioonidest	24
2.2.12 Valkude G3BP-2 ja Caprin-1 detekteerimine Western blot meetodil	24
2.3 Tulemused ja arutelu.....	26
2.3.1 SH-SY5Y rakuliini kasvatamine ja selle mõju <i>in vitro</i> translatsioonile.....	26
2.3.2 <i>In vitro</i> rakuvaba valgusünteesi tingimuste optimeerimine SH-SY5Y ekstraktis	

2.3.3	G3BP-2 ja Caprin-1 pärsivad reportervalgu sünteesi SH-SY5Y translatsiooniekstraktis	31
2.3.4	Rekombinantne G3BP-2 on võimeline seonduma lutsiferaasi mRNA-ga	33
2.3.5	G3BP-2 ja Caprin-1 on ülesindatud 40S subühikute fraktsioonis	34
KOKKUVÕTE		37
IMPLEMENTING THE CELL FREE TRANSLATION IN HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELL LINE		38
KIRJANDUSE LOETELU		39
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS		43

KASUTATUD LÜHENDID

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)

DMEM/F12 – Dulbecco modifitseeritud kotka meedium: toitainete segu F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*)

eIF1 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 1 (*eukaryotic initiation factor 1*)

eIF1A – eükarüootne initsiatsioonifaktor 1 A (*eukaryotic initiation factor 1 A*)

eIF2 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 (*eukaryotic initiation factor 2*)

eIF2 α – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*)

eIF2B – eükarüootne initsiatsioonifaktor 2 B (*eukaryotic initiation factor 2 B*)

eIF3 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 3 (*eukaryotic initiation factor 3*)

eIF4A – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 A (*eukaryotic initiation factor 4 A*)

eIF4B – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 B (*eukaryotic initiation factor 4 B*)

eIF4E – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 E (*eukaryotic initiation factor 4 E*)

eIF4F – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 F (*eukaryotic initiation factor 4 F*)

eIF4G – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 G (*eukaryotic initiation factor 4 G*)

eIF4H – eükarüootne initsiatsioonifaktor 4 H (*eukaryotic initiation factor 4 H*)

eIF5 – eükarüootne initsiatsioonifaktor 5 (*eukaryotic initiation factor 5*)

eIF5B – eükarüootne initsiatsioonifaktor 5 B (*eukaryotic initiation factor 5 B*)

EDTA – etüleendiamiintetraatseethape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

G3BP – Ras-GAP SH3 domeeniga seostuv valk (*Ras-GAP SH3 domain binding protein*)

HBSS – Hank'i balansseeritud soolalahus (*Hanks' balanced salt solution*)

HEPES – 4-(2-hüdoksüetüül)-1-piperasiinetaansulfaat (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid*)

Met-tRNA^{Met}_i – metioniiniga aminoatsüleeritud initsiaator-tRNA (*initiator tRNA aminoacylated with methionine*)

m⁷G – 7-metüülguanosiin (*7-methylguanosine*)

nRNAg – neuronite RNA graanul (*neuronal RNA granul*)

PABP – polü-A-seostuv valk (*poly(A)-binding protein*)

PB – protsessimise kehad (*processing bodies*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PN / STRP – penitsilliini-streptomütsiini segu (*penicillin-streptomycin mixture*)

PVDF – polüvinüüllideen fluoriid (*polyvinylidene fluoride*)

RBP – RNA-d siduv valk (*RNA-binding protein*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate* või *sodium lauryl sulfate*, SLS)

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeeli elektroforees (*sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

SG – stressigraanulid (*stress granules*)

TAE – tris-atsetaat-EDTA (*tris-acetate-EDTA*)

TB – tris-boraat (*tris-borate*)

TBST - tris-puhverdatud soola ja Tween 20 segu (*tris-buffered saline and Tween 20 mixture*)

TCEP – tris(2-karboksüetüül)fosfiin (*tris(2-carboxyethyl)phosphine*)

TG – transpordi graanulid (*transport granules*)

uORF – ülesvoolu avatud lugemisraam (*upstream open reading frame*)

UTR – mittetransleeriv regioon (*untranslated region*)

60S – eukarüootne ribosoomi suur alaühik (*eukaryotic large ribosomal subunit*)

40S – eukarüootne ribosoomi väike alaühik (*eukaryotic small ribosomal subunit*)

SISSEJUHATUS

Selle töö eesmärgiks oli uurida võimalusi, kuidas kasutada inimese neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini *in vitro* valgusünteesi katses, et hinnata RNA-d siduvate valkude (RBP) toimet valgusünteesile. Lisaks valgusünteesi aktiivsuse hindamisele, võimaldaks neuroblastoomi *in vitro* translatsiooni süsteem puhastada valgusünteesi komplekse, mida hiljem kasutada struktuuribioloogilisteks uuringuteks. Töögrupp on eelnevalt uurinud neuronite RNA graanuleid (nRNAg), mis on translatsiooniliselt inaktiivsed ribosoomide, mRNA-de ja RBPde kompleksid, transportimaks spetsiifilisi mRNAsid aksodentriitidesse. Senised tulemused on näidanud, et närilise ajukoest eraldatud nRNAg fraktsioon on heterogeenne. Nendes sisalduvate valkude ja mRNA-de koostis on varieeruv.

Üheks võimaluseks oleks siin nRNAg moodustamine eksperimentaalselt paremini kontrollitavates tingimustes kasutades imetaja rakkude *in vitro* translatsioonisüsteemi. Seetõttu on selles töös keskendutud *in vitro* translatsioonisüsteemi väljatöötamisele inimese neuroblastoomi rakuliinist SH-SY5Y eraldatud tsütoplasmaatilisest ekstraktist.

Neuronite väljavenitatud keha ja pikkade jätkete tõttu esineb nendes rakkudes lokaalne valgusüntees dendriitides ja aksonites sünapsite läheduses. Rakutuumas sünteesitud mRNA-d transporditakse rakutuumast jätkete distaalsesse otsa, kasutades RNA graanuleid. Lisaks ribosoomidele, mRNA-dele ja RBP-le vajab nRNAg transport mootorvalke (düneiini, kinesiini) ja tsütoskeleti komponente (aktiini filamendid ja mikrotuubulid).

Töörühm on eelnevalt identifitseerinud mitmeid nRNAg koosseisus olevaid RBP-e. Kõige huvitavamad neist on G3BP-2 ja Caprin-1. Lisaks nRNAg on teada, et need valgud osalevad stressi graanulite moodustamisel, et ajutiselt kaitsta mRNA-d stressitingimustes.

Kuna töörühm on eelnevalt uurinud neuronite RNA graanuleid ja leidnud, et G3BP-2 võiks otseselt seostuda ribosoomidega, et pärssida valgusünteesi, oleks seega vajalik kasutada neuronitel põhinevat süsteemi. Uurimaks G3BP-2 ja Caprin-1 valkude mõju valgusünteesile on töös kasutatud inimese neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y. Rakuliin on neurobioloogias laialdaselt kasutatav mudelsüsteem tulenevalt võimest diferentseeruda adren-, koliin- ja dopamiinergilisteks neuroniteks. Sellise mudelsüsteemina leiab neuroblastoomi rakuliin laialdast kasutamist erinevate neurodegeneratiivsete haiguste uurimisel.

Lõputöö tulemused näitavad, et neuroblastoomi rakkudest eraldatud tsütoplasmaatilist ekstrakti on võimalik kasutada *in vitro* translatsiooni süsteemina, kuna valgusünteesi aktiivsused küündivad samasse suurusjärku kui inimese embrüonaalsetest neeru rakkudest HEK293FT saadud ekstraktist.

Siinkohal tuleb mainida, et üheks raskuseks on olnud inimese neuroblastoomi rakkudest eraldatava materjali vähene kogus võrreldes sarnastes tingimustes kasvatatud HEK293FT eraldatava materjali hulgaga.

Töö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis biomeditsiinitehnoloogia suunal.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Translatsiooni initsiatsioon ja regulatsioon eukarüootides

Erinevalt enamikust teistest rakutüüpidest on neuronitele omane märkimisväärselt väljavenitatud rakukuju. Selle tõttu toimub enamiku valkude süntees neuronites mitte üksnes rakukehas, vaid ka rakukehast kaugel asuvates aksonites ja dendriitides. Sellist aksodendriitset valgusünteesi nimetatakse lokaalseks valgusünteesiks, mis on oluline näiteks mälu kujunemisel ja aksonite regenereerumisel (Willis ja Twiss, 2006).

Valgusüntees on energiakulukas ja on seetõttu rangelt reguleeritud. Keskne regulatsioonipunkt on valgusünteesi algusetapp ehk initsiatsioon, mille kulminatsioon on valgusünteesiks aktiivse 80S ribosoomi moodustumine. mRNA 5'-otsast sõltuva valgusünteesi algatamise saab jagada kahte osasse. Esimeses osas toimub 48S valgukompleksi moodustumine ja teises kompleksi seostumine eukarüootse ribosoomi väikese alaühikuga (60S). Tegemist on tsüklilise protsessiga, mille käigus kasutatakse uuesti ribosoomi alaühikud ja initsiatsioonifaktorid. (Jackson jt, 2010)

Translatsiooni initsiatsiooni esimeses etapis ühinevad eukarüootse ribosoomi väikese alaühikuga (40S) eukarüootne initsiatsioonifaktor 2 (eIF2) -GTP- metioniiniga aminoatsüleeritud initsiaator-tRNA ($\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$) ternaarne kompleks eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}, eukarüootne initsiatsioonifaktor 3 (eIF3), eukarüootne initsiatsioonifaktor 1 (eIF1), initsiatsioonifaktor 1 A (eIF1A) ning seeläbi moodustub 43S pre-initsiatsiooni kompleks (Jackson jt, 2010). eIF1 ja eIF1A aitavad leida õige alguskoodoni ning koos eIF3-ga eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met} seostuda (Jackson jt, 2010). eIF3 stimuleerib eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met} seostumist 40S ribosoomile ja 43S kompleksi mRNA-le seostumist ning takistab 40S ja 60S ribosoomide ühinemist (Jackson jt, 2010). eIF2 koosneb kolmest subühikust α , β ja γ ning on vajalik translatsiooni initsiatsioonil tRNA sidumiseks 40S ribosoomiga (Jackson jt, 2010). eIF2 α -subühiku fosforüleerimine proteiinkinaasi abil on üks translatsiooni pidurdav mehhanism (Carroll jt, 1993), mis võib juhtuda ekstrakti valmistamisel tekkiva rakustressi tõttu (Muaddi jt, 2010). Selle takistamiseks on võimalik lisada valku K3L, mis on kinaasile pseudosubstraadiks (Carroll jt, 1993). Teine võimalus on kasutada valku GADD34, mis moodustab fosfataasiga kompleksi võimaldades seeläbi eIF2 α defosforüleerimist (Novoa jt, 2001). On leitud, et *in vitro* katsetes translatsioonile K3L ja/või GADD34 lisamine tõstab valgusünteesi võimekust tänu eIF2 α fosforüleerimise langetamisele (Mikami jt, 2006). Valkude K3L ja GADD34 lisamine oleks üheks võimaluseks inimese neuroblastoomi ekstrakti *in vitro* süsteemis valgusünteesi aktiivsuse tõstmiseks.

43S alaühiku seostumiseks mRNA-le on vaja initsiatsioonifaktorite kompleksi 4 F (eIF4F) ja 4 B (eIF4B) või initsiatsioonifaktorit 4 H (eIF4H), mis võimaldavad mRNA 5'-otsa cap-struktuurile seostumist ja lahtiharutamist suurendades eIF4A helikasset aktiivsust (Jackson jt, 2010). eIF4F-kompleksi moodustumisel osalevad eukarüootsed initsiatsioonifaktorid 4 G (eIF4G), initsiatsioonifaktor 4 E (eIF4E), polü-A-seostuv valk (PABP) ja eIF4A, millest viimasel on helikaasne aktiivsus (Jackson jt, 2010). eIF4E tase on tõusnud kasvaja rakkudes, samuti leidub eIF4E-d kasvajarakus fosforüleeritult (Furic jt, 2010), kuid initsiatsioonifaktori puudumisel langeb *in vitro* translatsioonil valgusüntees märgatavalt (Gingras jt, 1999). eIF4E-d inhibeerivad eIF4E sesotuvad valgud 1 ja 2, mis takistavad cap-struktuurile seostumist ja seeläbi valgusünteesi (Fadden jt, 1997). Valkude fosforüleerimine muudab eIF4E kättesaadavaks ja tõuseb valgusünteesi võimekus (Fadden jt, 1997). Initsiatsioonifaktoril eIF4G on kaks isovormi, mille erinev hüdrolüüsimine võib kaasa tuua translatsioon aktiivsuse languse sõltuvalt mRNA-st (Castello jt, 2006). PABP-i abil tuuakse mRNA 3' polü-A ots valgusünteesi koha lähedusse (Jackson jt, 2010). mRNA seostub läbi joonisel 1 kujutatud cap-struktuuri eIF4E-ga ja seeläbi kaasatakse kogu eIF4F kompleks (Jackson jt, 2010).

eIF4F kompleks seostub 43S eel-initsiatsiooni kompleksiga ja moodustub 48S eel-initsiatsiooni kompleks, mis liigub mööda mRNA 5'-mittetransleerivat ahelat, vabastades seda kõrgemat järku struktuuridest, et leida esimene optimaalne start koodon (AUG) (Jackson jt, 2010). Optimaalne start koodon on defineeritud kui GCC(A/G)CCA**AUGG**, kus puriin on -3 positsioonis ja guaniin +4 positsioonis (Kozak, 1987). Initsiatsioonifaktoriga eIF2 koos tuuakse kompleksi ka Met-tRNA^{Met}i (Jackson jt, 2010). eIF3 kaudu on omavahel seotud 40S alaühik ja eIF4F-kompleks üheks 48S-kompleksiks, mis ühinemise järel asub mööda mRNA-d liikuma 5'-otsast AUG-koodoni suunas (Jackson jt, 2010). Kui ribosoom on leidnud optimaalse start koodoni, siis toimuvad 48S initsiatsiooni kompleksis konformatsioonilised muutused ja initsiaator Met-tRNA^{Met}i laaditakse ribosoomi P-saiti (Jackson jt, 2010). Siinkohal tuleb mainida, et ribosoomides on kolm tRNA sidumise saiti: A-sait ehk aminoatsüül-tRNA sidumise sait, P-sait ehk peptidüül-tRNA ja E-sait ehk tRNA väljumise sait (Jackson jt, 2010). Initsiatsiooni koodoni leidmise tulemusena on 48S kompleks kohustatud initsiatsiooniprotsessiga edasi minema, kus eIF5 seostumine indutseerib eIF2 GTPaasset aktiivsust ja toimub osaline eIF2-GDP eraldumine (Jackson jt, 2010).

Valgusünteesi initsiatsiooni teises etapis toimub 60S ribosoomi alaühiku seostumine väikse alaühikuga (Jackson jt, 2010). Seda protsessi vahendab initsiatsioonifaktor 5 B (eIF5B), millel on GTPaasne aktiivsus (Jackson jt, 2010). eIF5B indutseerib faktorite eIF1, eIF1A ja eIF3 eraldumist 48S kompleksist, mille tulemusel eraldub täielikult eIF2-GDP kompleks (Jackson

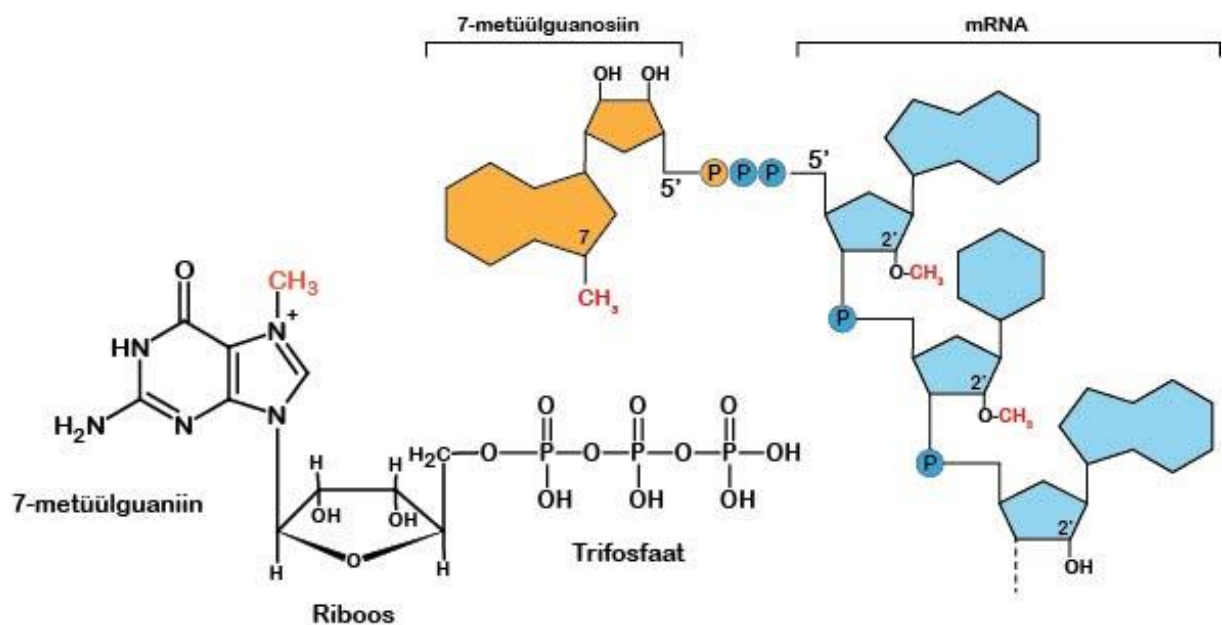
jt, 2010). eIF5B-seotud GTP hüdroolüüsil ei ole vaja 80S ribosoomide moodustamiseks, aga on vaja faktori eraldumiseks ribosoomilt (Jackson jt, 2010).

Translatsiooni kontrollivad ka 5'- mittetransleerivad regioonid (UTR) (Hinnebusch jt, 2016). 5'-UTR abil leitakse õige startkoodon ning viiakse kokku mRNA ja ribosoomid valgusünteesi alustamiseks (Hinnebusch jt, 2016). Mittetransleerivas alas moodustuvad sekundaarsed struktuurid aeglustavad järjestuse lugemist vähendades seeläbi lugemisvigade tekkimist, kuid sõltuvad *in vitro* translatsioonil suuresti eIF4A saadavusest (Hinnebusch jt, 2016).

1.2 Eukarüootne mRNA

Eukarüootsetel organismidel on sarnane mRNA ülesehitus. mRNA keskosas asub valku kodeeriv ala, millest mõlemale poole jäävad UTR-id (Mignone jt, 2002). Järjestuse 5'-otsas asub cap-struktuur ning sellele järgnev mRNA järjestus moodustab juuksenõelastruktuuri. 5'-UTR sisaldab veel ülesvoolu avatud lugemisraami (uORF) ja sisemist ribosoomi sisenemiskohta (Mignone jt, 2002). Kõik 5'-UTR struktuurid on vajalikud translatsiooni regulatsiooniks. mRNA 3'-UTR sisaldab samuti erinevaid struktuure: zip koodi, tsütoplasmaatilist polüadenülatsiooni elementi, polüadenülatsiooni signaali ja polü-A saba, mis on vajalikud nii translatsiooni kontrolliks, mRNA lokaliseerimiseks kui molekuli stabiilsuseks (Mignone jt, 2002). Üks oluline element eukarüootse mRNA juures on cap-struktuur ahela 5'-otsas, mis jagatakse kolmeks: cap 0, cap 1 ja cap 2 (Banerjee, 1980) (joonis 1). Cap 0 puhul on ahela otsas 7-metüülguanosiin (m^7G), mis on ühendatud viimase nukleosiidi külge läbi pööratud 5'-5'-trifosfaatsilla (Shuman, 2002). Erinevalt eukarüootidest ei esine struktuuri prokarüootidel ega arhedel, kuna nendes organismised puuduvad vastavad ensüümid struktuuri loomiseks, kuid neid võib leiduda osades viirustes (Shuman, 2002). Cap 1 korral metüleeritakse ahela esimene transkribeeritav nukleotiid, cap 2 korral metüleeritakse teine (Banerjee, 1980). Initsiatsioonifaktor eIF4E seob mRNA cap-struktuuri kaudu eIF4F kompleksi külge, mis on vajalik translatsiooni initsiatsiooniks (Jackson jt, 2010). Cap-struktuur aitab ribosoomi seostumisel ning tõstab translatsiooni aktiivsust (Banerjee, 1980). Teine oluline element mRNA-s on polü-A saba. 1970-ndatel leiti, et tsütoplasmaatilise mRNA 3'-otsas on polü-A saba, millelt ei toimu translatsiooni (Darnell jt, 1971). 3'-otsa mittetransleerivas alas asuvaid aluspaaride muutuseid tunneb ära ensüüm, mis lõikab selles kohas mRNA-d polüadenüleerimiseks (Tudek jt, 2018). Sobiv järjestus võib liigiti varieeruda, olulised on ka sellest üles- ja allavoolu olevad järjestused (Tudek jt, 2018). Lõike järel lisatakse liigispetsiifilise pikkusega polü-A saba, tänu millele liigutatakse mRNA-d rakus tuumast välja (Tudek jt, 2018). Polü-A saba pikkus varieerub liigiti jäädes imetajatel ligikaudu 250

nukleotiidi juurde, sest selle pikkuse saavutamisel muutub ensüümi ja seostunud valkudega sünteesikompleks ebastabiilseks (Kühn jt, 2009). Saba lisamine on vajalik transportvalkude kinnitumiseks mRNA-le (Tudek jt, 2018) ning PABP seostumise kaudu viiakse polü-A saba translatsiooniks vajalike initsiatsioonifaktorite lähedusse (Jackson jt, 2010). Seetõttu on *in vitro* valgusünteesi toimumiseks oluline spetsiifilise polü-A saba lisamine valgusünteesi algatamiseks. Samuti aitab polü-A saba kaasa RNA-de lagundamisele suunamisele, selle enneaegsele ärahoidmisele ja RNA-de stabiliseerimisele (Tudek jt, 2018). mRNA aktivatsiooniks translatsiooni initsiatsioonil on vajalik nii eIF4F kompleksi seostumine cap-struktuuri kaudu kui ka polü-A saba toomine valgusünteesi alguspunkti lähedusse (Jackson jt, 2010).



Joonis 1. Cap-struktuur mRNA 5'-otsas. Joonisel on vasakul 7-metüülguansiin. Paremal on cap struktuur, milles cap 0 on mRNA 5'-otsa üle 5'-5'-trifosfaatsilla lisatud 7-metüülguansiin, cap 1 on ahela esimene metüleeritud nukleotiid ja cap 2 on ahela teine metüleeritud nukleotiid.

1.3 mRNA transport neuronites RNA-graanulite abil

Neuronites on mRNA transport ja paiknemine kontrollitud mitmete mehhanismide abil. Neuronite jätkete pikkuse tõttu on oluline, et transportimise ajal hoitakse mRNA inaktiivsena, vastasel juhul võib vales kohas sünteesitud valgul olla letaalne efekt, nagu seda on näitatud müeliini aluselise valgu MBP puhul oligodendrotsüütides (Lyons jt, 2009). Allasurutud translatsioonilise aktiivsusega mRNA-sid on võimalik liigutada raku tuumast sünapsite lähedusse kasutades aktiivset transporti (Bramham ja Wells, 2007). Üheks võimaluseks on nende ühinemine RNA-seotud valkudega (RBP), moodustades erinevat tüüpi nRNAg-d (Bramham ja Wells, 2007). Lisaks mRNA-le ja RBP-dele on graanulite koosseisus ribosoomid,

filamentide/mikrotoubulite valgud ja mootorvalgud (Bramham ja Wells, 2007). Rakkudes võib leida erinevaid graanuleid: stressi graanulid (SG), transpordi graanulid (TG) ja protsessimise kehad (PB), millest esimesed ja viimased moodustuvad rakus stressitingimustes (Bramham ja Wells, 2007). Graanulites sisalduvate ribosoomide hulk langeb organismi arenedes, kuid ei kao täielikult (Elvira jt, 2006). Ühe neuroni nRNAg-d võivad sisaldada erinevaid valke ja erinevat valku kodeerivat mRNA-d. Närilise ajast eraldatud nRNAg on erineva valkude ja mRNA koostise tõttu heterogeensed (Fatimy jt, 2016). *In vitro* süsteemis oleks seega heterogeensust võimalik vähendada lisades ainult soovitud mRNA-sid. Graanulite koosseis on pidevas muutumises raku vajaduste kohaselt (Sephton ja Yu, 2015). mRNA-de hulk rakus jäi Falkenbergi jt katsete tulemusel enamasti vahemikku 2–6 ühe graanuli kohta (Falkenberg jt, 2017). Batish jt kindlat tüüpi värvainetega märgistatud mRNA-dega tehtud katsete tulemused näitavad, et ühes graanulis transporditakse korraga ainult ühte mRNA molekuli (Batish jt, 2012). nRNAg liigutamise kiirus mootorvalkude abil mööda mikrotoubuleid on erinev ning graanulid võivad üksteisega kokku puutudes moodutada suuremaid graanulite kogumeid (Fatimy jt, 2016).

Stressi tingimustes võivad moodustuda mitmel erineval viisil ja erineva koostisega SG. Nende tekkimine on vajalik endogeense mRNA kaitsmiseks lagundamise eest ja seetõttu on oluline SG normaalne moodustumine (Aulas jt, 2015). Üheks SG moodustumise põhjuseks on eIF2 α fosforüleerimine, mille järel tekib eIF2-GTP puudus ja peatub valgusünteesi initsiatsioon (Panas jt, 2016). Teiseks võimaluseks on eIF4F kompleksi inhibitsioon, mille tulemusel sarnaselt eelmisele peatub valgusünteesi initsiatsioon (Panas jt, 2016). Sellisel juhul ei saa 48S ribosoomi, mRNA ja valkude kompleks moodustada 80S initsiatsioonikompleksi ning seetõttu liituvad kompleksiga neid stabiliseerivad RBP-d (Panas jt, 2016). Üks oluline RBP on Ras-GAP SH3 domeeniga seostuv valk (G3BP) molekulmassiga 68-kDa (Parker jt, 1996), millel on kaks isovormi G3BP-1 ja G3BP-2 (Panas jt, 2012). Mõlemad valgud on vajalikud SG moodumiseks (Matsuki jt, 2012). G3BP üleekspressioon võib soodustada valgusünteesi peatumist ja SG tekkimist (Tourriere jt, 2003). G3BP mõlema isovormi C-terminaalses otsas on RNA-d äratundev ja arginiini-glütsiini rikas motiiv, mis aitavad valkudel mRNA-le kinnituda ning tuumas lokaliseeruda (Irvine jt, 2004). Järjestuse N-terminaalses otsas on konserveerunud tuuma transpordi faktori 2 sarnane domään, mistõttu võib valk aidata kaasa transpordile tuumas (Irvine jt, 2004). Järjestuse keskosas varieeruvad proliini ja happerikkad alad, mille kaudu seostumist ei toimu (Irvine jt, 2004). G3BP-l on rakus veel mitmeid funktsioone polüsoomide moodustumisel, valgusünteesi vahendamisel, RNA metabolismis ja rasGAP signaalirajal (Irvine jt, 2004).

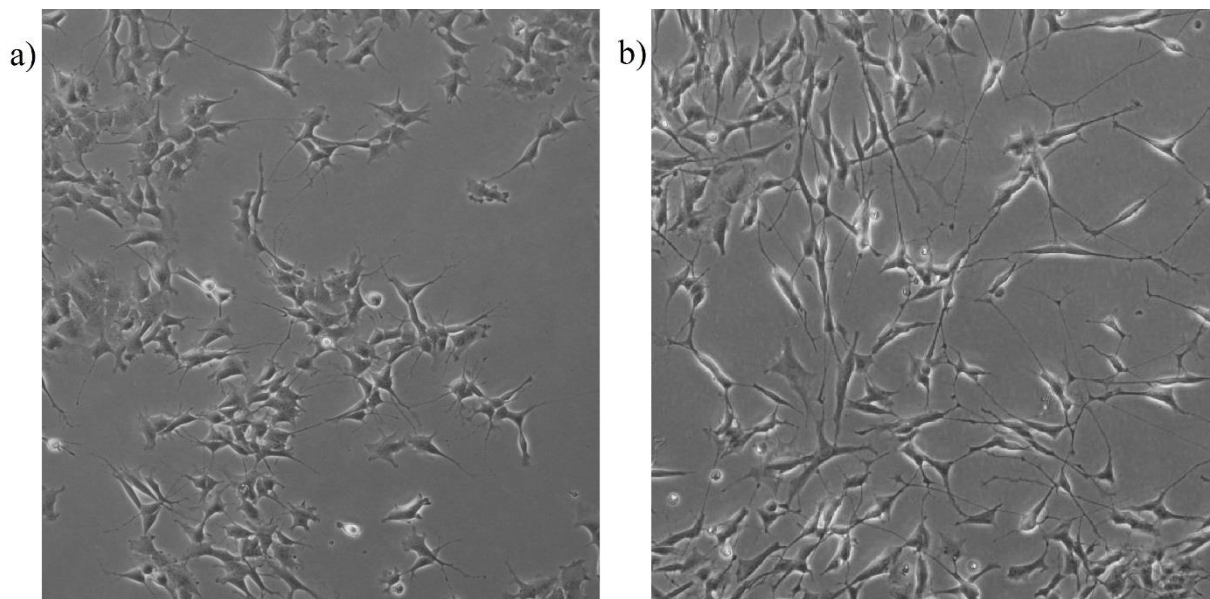
Lisaks G3BP-le on ajus oluline nRNAg-de koosseisus ekspresseeritud RBP 680 aminohappe pikkune Caprin-1 molekulmassiga 105 kDa (Shiina jt, 2005). Caprin-1 sisaldab G3BP-le sarnaselt C-terminaalses otsas RNA-d äratundvat ja arginiini-glütsiini rikast ala (Shiina jt, 2005). Valgu N-terminaalses otsas on tuuma lokaliseerimise ja ekspordimise motiivid valgu liikumiseks tuumast tsütoplasmasse (Shiina jt, 2005). Valk on vajalik spetsiifiliste mRNA-de transpordiks rakukehast dendriitidesse ning mälu tekkimisel (Nakayama jt, 2017). Valgu puudumisel ei moodustu tugevaid sünapseid neuronite vahel ning närvirakud kasvatavad nõrgemaid kontakte (Nakayama jt, 2017). Närilistel on täheldatud heterosügootsusest tuleneva vähesel määral Caprin-1 kodeeriva mRNA ja valgu koguse tõttu autismi spektrumi häireid (Ohashi jt, 2016). Valgule Caprin-1 vastupidist toimet omab G3BP-ga seostuv valk USP10, mis konkureerib samale seondumissaidile G3BP-s (Kedersha jt, 2016). Caprin-1 soodustab ja USP10 pidurdab stressigraanulite moodustumist, kuid SG moodustatakse ka ilma nende valkudeta G3BP1 poolt (Kedersha jt, 2016).

nRNAg-te koostise ja nende paiknemise muutused võivad viia mitmete neuronaalsete häireteni. Fragiilse X-i sündroomi puhul vaigistatakse X-kromosoomis geen FMR1, mille tulemusena ei toodeta piisavas koguses valku FMRP (Garber jt, 2008). Valk on kõige enam ekspresseerunud ajus (Garber jt, 2008) ja on üks levinumatest RBP-dest RNA graanulites (Ravanidis jt, 2018). FMRP aitab neuronites negatiivse kontrolli mehhanismiga reguleerida lokaalset valgusünteesi (Garber jt, 2008). Fatimy jt katsete tulemused näitasid, et FMRP valku esineb RNA graanulites polüribosoomidega võrreldes peaaegu kaks korda enam (Fatimy jt, 2016). Samuti esineb nRNAg-tes rohkelt mootorvalke kodeerivaid mRNA-sid, mis võib viidata nende lokaalsele sünteesile ja seega ka graanulite liikumise regulatsioonile (Fatimy jt, 2016). FMRP kaudu toimuva kontrolli häirimise tulemusena võib tekkida patsientidel pärilik vaimne alaareng (Garber jt, 2008).

1.4 Neuroblastoomi rakuliin SH-SY5Y

In vitro mudelsüsteemid on tänapäeval kasutusel mitmetes valdkondades. Diferentseerumata rakkude kasutamisel on üheks eeliseks täielikult diferentseerunud rakkude ees võime suunatud diferentseerumisele ja paljuneda kiiresti suures hulgas. Neurobioloogias laialdaselt kasutatav inimese neuroblastoomi rakuliin SH-SY5Y on 1970. aastal luuüdi biopsiast eraldatud rakuliini SK-N-SH alamrakuliin (Shipley jt, 2016). Rakuliini on võimalik erinevaid meetodeid kasutades diferentseerida adren-, koliin- ja dopaminergilisteks neuroniteks (Shipley jt, 2016). SH-SY5Y rakke on kasutatud mudelsüsteemina näiteks Parkinsoni tõve (Xie jt, 2010) ja Alzheimeri tõve uurimisel (Wang jt, 2019).

Diferentseerumata SH-SY5Y liini rakud meenutavad oma lühikeste jätketega neuroblaste ning ümara kehaga rakud kasvavad klastrites, milles võivad rakud kasvada üksteise otsa (joonis 2a). Diferentseerunud neuroblastoomi liini SH-SY5Y rakud meenutavad pikkade jätketega primaarseid neuroneid. Rakud paiknevad üksikult ning rakukehad on rohkem püramidaalsed (joonis 2b). Diferentseerimiseks võib kasutada erinevaid rakkudele lisatavaid aineid. Levinumateks neist on retinoolhappe, forboolestriite ja dibutürüül tsüklilise AMP lisamine, kuid on võimalik vastavalt töö sisule valida ka teisi diferentseerimise meetodeid. (Kovalevich ja Langford, 2013)



Joonis 2. Faaskontrastmikroskoobi pildid SH-SY5Y rakuliinist. a) Diferentseerumata rakud, 10-kordne suurendus; b) Retinoolhappega diferentseeritud rakud, 10-kordne suurendus (Artur Astapenka faaskontrastpilt, 2020).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on:

Inimese neuroblastoomi tsütoplasmaatilisel ekstraktil põhineva *in vitro* translatsioonisüsteemi väljatöötamine, et uurida erinevate RBP mõju valgusünteesile ja komplekside moodustamist, eesmärgil neid välja puhastada ja kasutada struktuuribioloogilistes uuringutes.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y kasvatamine

Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y rakke kasvatati töös kasutamiseks neli korda. Töös kasutati vedela lämmastiku aurust säilitatud 1 ml alikvoote inimese neuroblastoomi rakuliinist SH-SY5Y (ATCC; REF: CRL-2266) 10% dimetüülsulfoksiidi (DMSO) ja 10% veise loote seerumit (FBS) (Corning; REF: 35-015-CV) sisaldusega Dulbecco modifitseeritud kotka meediumi toitainete segu F-12 (DMEM/F12) (Corning; REF: 10-090-CVR) söötmes. Rakud külvati 10 cm läbimõõduga rakukultuuri tassidele (ThermoScientific BioLite; REF: 130181; kultiveeritav ala 60,8 cm²), millele lisati 10 ml DMEM/F12 söödet. Sellele DMEM/F12 söötmale oli lisatud 1-kordset penitsilliini-streptomütsiini segu (PN / STRP) (SIGMA; REF: P4333), 1-kordset GlutaMAX-i (Gibco; REF: 35050-061) ja 10% FBS-i. Rakke kasvatati 37 °C süsihappegaasi (sisaldus 5%) inkubaatoris Sanyo MCO-19AIC(UV) CO₂ Incubator. Kuus kuni kaksteist tundi pärast rakkude tassile külvamist kontrolliti faaskontrastmikroskoopi Eclipse TS100 kasutades SH-SY5Y rakkude tassile kinnitumist ja seejärel eemaldati kogu varasem sööde. Tassile lisati uus kogus 10 ml DMEM/F12 söödet, et vähendada DMSO mõju rakkudele ja rakud asetati samadesse tingimustesse kasvama. Rakukultuuri tassi vaadeldi pärast söötme vahetust faaskontrastmikroskoobi all selleks, et olla kindel rakkude jätkuvas tassile kinnitumises. SH-SY5Y rakke kasvatati kuni need olid saavutanud tassil 70-80% konfluentsuseni, mis tavaliselt võttis aega 3 päeva. Järgmiseks eemaldati tassilt kogu sööde ja pesti tassi 5 ml Hank'i balansseeritud soolalahusega (HBSS) (BioWest; REF: L0607500) söötme jääkidest vabanemiseks. HBSS lahust ei sisaldanud Ca- ega Mg-soolasid. SH-SY5Y rakkude tassilt eemaldamiseks kasutati trüpsiini ja etüleen-diamiintetraatseethappe (EDTA) (Corning; REF. 25-053-CI) lahust. Tassile lisati 2 ml trüpsiini-EDTA lahust ning tassi inkubeeriti 3 minutit 37 °C kapis 5 %-lise CO₂ juures. Trüpsiini mõju peatamiseks lisati tassile 8 ml DMEM/F12/PN/STRP/FBS söödet. Saadud rakke sisaldav lahust jagati nelja T75 rakukultuuri pudeli (Thermo Scientific BioLite; REF: 130190; kultiveeritav ala 75 cm²) vahel, kus igasse

pudelisse pipeteeriti 2 ml rakusöödet. Pudelisse lisati rakkudele juurde 13 ml DMEM/F12/PN/STRP/FBS söödet ja rakke kasvatati samades tingimustes konfluentsuseni 70-80%, mis tavaliselt võttis aega 3,5 päeva. Soovitud konfluentsuse saavutamise järel külvati rakud edasi kümnele 15 cm läbimõõduga tassile (Thermo Scientific BioLite; REF: 130183; kultiveeritav ala 148 cm²). Selleks eemaldati uuesti sööde aspiratsiooni abil ja pesti pudeleid 5 ml HBSS-iga. T75 pudelitest rakkude eemaldamiseks kasutati 4 ml trüpsiini-EDTA lahust ning inkubeeriti 3 minutit sarnaselt eelmisele etapile. Trüpsiiniga töödeldud rakkudele lisati 11 ml DMEM/F12 söödet. Igale 15 cm tassile pipeteeriti 4 ml saadud rakke sisaldavat lahust ja lisati 21 ml DMEM/F12/PN/STRP/FBS söödet. SH-SY5Y rakke kasvatati eelnevate etappidega sarnaselt 37 °C juures 90-100% konfluentsuse saavutamiseni, mis tavaliselt võttis aega 4 päeva. Rakuekstraktide tegemiseks vahetati 12 tundi enne rakkude lüüsi välja sööde 50% ulatuses värske DMEM/F12/PN/STRP/FBS söötme vastu. Rakkude lüüsimist on kirjeldatud järgmises alapeatükis.

2.2.2 Rakuvaba *in vitro* translatsiooni ekstrakti valmistamine

Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y rakkude lüüsimiseks kasutati isotoonilist lahust. Rakke kasvatati ja lüüsiiti töö jaoks neljal korral. 15 cm rakukultuuri tassidelt eemaldati DMEM/F12 söödet seroloogilise pipeti abil kuni tassidele jäi alles 4 ml söödet. Tassile kinnitunud rakud kraabitakse tassilt maha plastikust spaatli abil. Rakud koguti tassile jäetud 4 ml söötmes kahte 50 ml Falconi tuubi. Rakud tsentrifuugiti põhja, kasutades nurkrootoriga (12071) lauatsentrifuugi SIGMA 2-16PK 300 g ja 4 °C juures 5 min, ning rakkude pealt eemaldati sööde. Rakusademele lisati 3 ml lüüsipuhvrit. Puhvri koostises olid 20 mM 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfaat (HEPES, pH 7.5), 150 mM KOAc, 1 mM Mg(OAc)₂, 2mM tris(2-karboksüetüül)fosfiin (TCEP). 2 ml lüüsipuhvrit kasutades pesti rakke kaks korda ja iga pesu ajal tsentrifuugiti rakud põhja nurkrootoriga SIGMA 1-14K lauatsentrifuugiga 2000 rpm ja 4 °C juures 2 min jooksul. Pärast rakkude pesu lisati rakusademele samas ruumalas lüüsipuhvrit. See sisaldas Roche Complete Ultra EDTA-free Mini tablett (ROCHE cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free; REF: 05 892 791001; 1 tablett 10 ml kohta), mis sisaldas proteaasi inhibiitorite segu. Rakususpensiooni töödeldi järgnevalt 0,3 mg/ml lüsoletsitiiniga (SIGMA; REF: L4129-25MG), mille alglahus oli lahustatud metanoolis, 300 mg/ml. Suspensiooni inkubeeriti 4 °C juures 2,5 min ja tsentrifuugiti SIGMA 1-14K lauatsentrifuugis 11 400 rpm ja 4 °C juures 45 s. Rakkudelt eemaldati vedelik ning võeti üles Roche tabletti sisaldavas lüüsipuhvris ruumalas, mis oli 75 % rakumassi ruumalast. Seejärel lisati 50 µM vitamiin E analoog Trolox (SIGMA; REF: 238813-1G), et neutraliseerida vabade radikaalide mõju, mida

tekitas lüsoletsitiin. Saadud rakususpensioonile lisati RNAasi inhibiitorit RiboLock 0,75 U/ml (ThermoScientific; Catalogue number: EO0381; f.c. 100 U/ml), 1 ng/µl bestatiini, 100 µM PMSF-i ja 1 U/µl RNAasi-vaba DNAas I (ThermoScientific; Catalogue number: EN0521; f.c. 1 mU/µl). Rakulüüsiks kasutati 1 ml „LuerLock“ süstalt nõela suurusega 26 G. Rakulahus suruti läbi nõela 9 korda ning saadud lüsaat jagati 50 µl kaupa 1,5 ml tuubidesse. Rakuekstrakti kontsentratsiooni mõõdeti RNA sisalduse kaudu, kasutades NanoDrop 1000 spektrofotomeetrit neelduvust A260. Rakuekstrakt külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures.

2.2.3 DNA amplifitseerimine PCR meetodil

Töös kasutatava mRNA sünteesiks vajalikku DNA-d amplifitseeriti rakendades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Soovitud lutsiferaasi kodeerivat järjestust sisaldav geen oli kloneeritud pUC19 vektorisse, kus geeni 5'- ja 3'-otsa oli viidud inimese tubuliini beta alaühiku isoform 2-spetsiifiline mittetransleeriv järjestus (konstrukt oli tehtud kolleegi, Abbas Mansouri poolt), mida on kirjeldatud joonisel 3. PCR reaktsioonisegu valmistati 50 µl koguses 200 µl PCR tuubidesse. Segu sisaldas 10 µl 5-kordset HF Phusion puhvrit (ThermoSci; REF : F-518), 1,25 µl 10 µM tub-1 praimerit, 1,25 µl 10 µM tub-p60 praimerit, 3,1 µl 4 mM dNTP, 0,23 µl 356 ng/µl tubulin-pUC19 vektorit, 33,4 µl UltraPure vett (Invitrogen; REF: 10977-035) ja 0,8 µl Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific; REF: F-530S). Praimerite koostis on toodud tabelis 1. PCR käigus lisatakse tubuliin-lutsiferaasi geenile polü-A saba. Töös kasutati PCR masinat Eppendorf MasterCycler ep gradient S. Programm koosnes järgmistest tsüklitest: 1 tsükkel (40 s 98 °C juures); 35 tsüklit (10 s 98 °C juures, 15 s 57 °C ja 45 s 72 °C juures); 1 tsükkel (5 min 72 °C juures); 4 °C juures lõpmatuseni. PCR reaktsiooni toimumise ajal valmistati 1 %-ne Tris-atsetaat-EDTA (TAE) agarosgeel, milles sisaldus 0,5 g SeaChem agarosi (Lonza; REF: 50004) ja 50 ml 1-kordset TAE puhvrit ning lahust kuumutati mikrolaineahjus kuni agaros lahustus puhvris täielikult. Kui lahuse temperatuur oli jõudnud 50°-60° C juurde, lisati sellele etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioonis 0,5 µg/ml. Lahus valati geeli vormi ning geelivann täideti 1-korde TAE puhvriga. PCR reaktsioonist saadud proovidele lisati 10 µl 6-kordset TriTrack DNA laadimisvärvi (Thermo Scientific; REF: R1161). Lisaks kanti geelile 5 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder markerit (Thermo Scientific; 1 µg/µl; REF: SM0311), millele lisati 1 µl 6-kordset TriTrack DNA laadimisvärvi. Geelelektroforeesi teostati toatemperatuuril 100 V juures 30-40 minutit. DNA-d sisaldavad suurusmarkeri 3000 bp triibu kaugusel olevad triibud geelitükid, mis sisaldasid tubuliini-lutsiferaasi DNA-d lõigati 314 nm UV-lampi kasutades välja. DNA geelist eraldamiseks kasutati geeli eraldamise komplekti GeneJET (Thermo Scientific; REF: K0691), kasutades tootja ettekirjutusi. Puhastamise järel

hinnati DNA sisaldust lahuses NanoDrop 1000 spektrofotomeetri abil mõõtes neelduvust lainepikkusel 260nm ning eraldatud DNA-d säilitati DNA LoBind tuubis (Eppendorf; REF: EP0030108051) -20 °C juures.

sisaldas 1,19 µg tubuliini-lutsiferaasi DNA-d, 10 µl 10-kordset T7 transkriptsioonipuhvrit, 2 µl RNAasi inhibiitorit RiboLock (40 U/µl), 2,3 µl pürofosfataasi (NEB; REF: M03615), 6 µl T7 RNA polümeraasi kontsentratsiooniga 0,0625 µg/µL, 5 µl 100 mM ditiotreitol (DTT) ja 20 µl rNTP segu, kus iga rNTP oli kontsentratsiooniga 20 mM. T7 transkriptsiooni puhvris sisaldus 500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM MgCl₂, 50 mM DTT ja 20 mM spermiidiin. Saadud segu inkubeeriti 37 °C kapis 3 tundi. Pärast transkriptsiooni tehti transkriptsioonisegule puhvri vahetus, kasutades eelnevalt veega tasakaalustatud Zeba 7 kDa MWCO spinnkolonni (Thermo Scientific; REF: 89882), et eemaldada madalmolekulaarsed ühendid. Kolonnile kantud reaktsioonisegu tsentrifuugiti nurkrootoriga lauatsentrifuugis 1500 g ja 4 °C juures 2 minutit. Sellele järgnes vahetatud puhvriga transkriptsioonisegu DNAas I (Promega; 1 u/µl; REF: M6101) töötlus, mida lisati 5 µl koos 10 µl 10-kordse DNAas I reaktsiooni puhvriga. Puhver sisaldas 400 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgSO₄ ja 10 mM CaCl₂. Segu inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. DNA lagundamise järel puhastati mRNA kasutades ränidioksiidi 50 %-list lahust (Honeywell Fluka, partiklite suurus 0,5-10 µm, S5631-100G) või Qiagen RNeasy Minikit'i. RNA ränidioksiidil puhastamise korral lisati 3,5-kordne ruumala RNeasy MiniKit'i lahust RLT (Qiagen; REF: 74104) ja 2,5-kordne ruumala 96 %-st etanooli (Chem-Lab; REF: CL00.0556.0250). Enne RNA lahuse panemist räni dioksiidile tsentrifuugiti 40 µl 50 %-lisest ränidioksiidi lahusest Axygen 2 ml tuubi põhja kasutades nurkrootoriga SIGMA 1-14K tsentrifuugi tingimustel 6000 rpm, 4 °C ja 50 s. Seejärel lisati sadestatud RNA, RLT ja etanooli segu ning inkubeeriti 4 °C juures 30 minutit segades end-over-end segajas. Ränidioksiidi külge seostunud mRNA tsentrifuugiti 6000 rpm ja 4 °C juures 50 jooksul tuubi põhja ja pesti kaks korda kasutades 70 %-list etanooli. Seejärel sade kuivatati 40 °C juures, et aurustuks liigne etanool, mis võiks segada järgnevaid etappe. Sademele lisati 75 µl UltraPure vett ja inkubeeriti 1 minut 37 °C juures. Ränilt eraldunud mRNA lahustati vette ja räni tsentrifuugiti tuubi põhja lauatsentrifuugil 13 000 ja 4 °C juures 2 min. mRNA koguse hindamiseks kasutati spektrofotomeetrit NanoDrop 1000, millega mõõdeti lahuse neelduvust 260 nm juures. Puhastatud mRNA-d säilitati DNA LoBind tuubis (Eppendorf; REF: EP0030108051) -20 °C juures.

2.2.5 mRNA cap-struktuuri lisamine

Sünteesitud mRNA sisaldas järjestuse 3'- otsas PCR käigus lisatud polü-A saba, kuid mRNA stabiliseerimiseks ja valgusünteesiks tuli töö käigus mRNA 5'- otsa lisada m⁷G cap-struktuur ja cap1-struktuur, kus mRNA esimese positsiooni 2'-OH rühm on metüleeritud. Selleks kasutati Vaccinia viirusel põhinevat cappimise süsteemi. Cappimiseks kasutati 50 µg tubuliini-

lusiferaasi mRNA-d 68 µl vees, mida inkubeeriti 65 °C juures 3 min. Peale inkubeerimist pandi mRNA lahus jääle ja lisati 10 µl 10-kordset reaktsioonipuhvrit (NEB; REF: B2080A), 5 µl 10 mM GTP (NEB; REF: N2080A), 5 µl 4 mM S-adenosüülmetioniini (NEB; REF: B9003S), 5 µl Vaccinia ensüümi (NEB; REF: M2080S), 5 µl 50 U/µl metüültransferaasi (NEB; REF: M0366S) ja 2 µl 40 U/µl RNAasi inhibiitorit RiboLock. Saadud 100 µl segu inkubeeriti 37 °C juures 1,5 tundi. Reaktsioonisegu puhastati kasutades komplekti RNeasy Mini Kit (Qiagen; REF: 74104), milles võeti mRNA üles komplektis sisalduvas 40 µl RNAasi-vabas vees. mRNA sisalduse hindamiseks mõõdeti NanoDrop 1000 spektrofotomeetri abil lahuse neelduvust 260 nm juures. mRNA-d sisaldav lahus külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -20 °C juures.

2.2.6 *In vitro* rakuvaba valgusüntees

Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y rakkude lüüsimisel saadud ekstrakti kasutati rakuvabaks valgusünteesiks. Et vabaneda rakuekstraktis sisalduvast endogeensest mRNA-st, töödeldi ekstrakti esmalt Micrococcal nukleaasiga, mille aktiivsus sõltub Ca^{2+} ionidest. Alapeatükis 2.2.2. kirjeldatud meetodiga saadud rakuekstrakti töödeldi 0,0110 U/µL MNaasiga ning vajaliku Ca^{2+} sisalduse saavutamiseks lisati CaCl_2 lõppkontsentratsioon 0,365 mM. Reaktsiooni peatamiseks lisati rakuekstraktile EGTA-d lõppkontsentratsioon 1,45 mM. Paralleelselt valmistati PCR tuubidesse segu valgusünteesi läbiviimiseks vajalike komponentidega. Lutsiferaasi reaktsiooni jaoks viidi läbi *in vitro* translatsioonireaktsioon, kus ühe punkti lõppruumala oli 10 µl. Translatsioonisegu pipeteeriti suhtes 1:10 (1 µl) kogu valgusünteesi segusse. Translatsioonisegu sisaldas 20 mM fosfokreatiini, 35 U/µl kreatiinkinaasi (ROCHE; REF: 10127566001), 0,1 mM spermidiini, 100 µM aminohapete segu (Promega; Amino Acid Mixture, Complete; REF: L4461) ja 8,6 mM HEPES pH-ga 7,5. Translatsioonisegule lisati ATP/GTP segu lõppkontsentratsioonini 1 mM ja 20 U/µl RNAasi inhibiitorit SUPERase (Invitrogen; Catalog number: AM2694). mRNA-d (0,5–1,45 µg reaktsiooni kohta), K^+ (78–213 mM), Mg^{2+} (0,5–1,75 mM) ja valgusegu erinevaid kontsentratsioone testiti maksimaalse valgusünteesi aktiivsuse saamiseks. Reaktsioonisegusse lisati pH 7,5 HEPES lõppkontsentratsioon 27,3 mM, spermidiini lõppkontsentratsioon 0,2 mM, putrestsiini lõppkontsentratsioon 0,1 mM ja TCEP-i lõppkontsentratsioon 2 mM. Valgusünteesi segu sisaldas ka translatsiooniks vajalike valkude segu. Segu koostises oli 40 µM K3L, 4 µM GADD34, 2 µM eIF4E ja 8 µM PABP, mida pipeteeriti valgusünteesi segusse 0,5 µl. Valgusünteesiks sobiva $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ kontsentratsiooni leidmiseks teostati valgusüntees $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ lõplikel kontsentratsioonidel 0,5 mM, 0,75 mM, 1,25 mM ja 1,75 mM. Sobiva KOAc kontsentratsiooni leidmiseks viidi valgusünteesi läbi KOAc lõplikel

konsentratsioonidel 78 mM, 100 mM, 130 mM, 160 mM, 190 mM ja 213 mM. Sünteesiks sobiva mRNA sisalduse leidmiseks kasutati mRNA koguseid 0,5 µg, 0,9 µg, 1 µg, 1,38 µg ja 1,45 µg. Saadud valgusünteesi segu inkubeeriti PCR masinas Eppendorf MasterCycler ep gradient S 30°C juures 30 minutit. Sarnaselt SH-SY5Y rakuekstraktiga tehtud valgusünteesile kasutati võrdlusena ka inimese embrüonaalse neeru rakuliini HEK293FT rakuekstrakti. Valgusünteesi tulemuslikkuse kontrollimiseks kasutati lutsiferaasi reaktsiooni, mille käigus registreeriti reaktsioonil tekib kemoluminesents. Signaali mõõdeti Promega Glomax 96 Microplate luminomeetriga (Promega; REF: E6521). Reaktsiooni on kirjeldatud järgmises alapeatükis.

2.2.7 Lutsiferaasi koguse mõõtmine translatatsiooniproovist

Lutsiferaasi reagent Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega; REF: E2510) pipeteeriti 50 µl kaupa 96-kaevuga plaadile vastavalt proovide arvule ja igasse kaevu lisati 4 µl inkubeeritud valgusünteesi segu. Signaali tugevuse mõõtmiseks kasutati Promega Glomax 96 Microplate luminomeetri (Promega; REF: E6521) “Steady-Glo” programmi.

2.2.8 Geeliinihe mRNA ja G3BP-2 kompleksi moodustumisel

Valgusünteesiks kasutatava tubuliini-lutsiferaasi mRNA ja G3BP-2 kompleksi moodustumise kindlaks tegemiseks kasutati geelelektroforeesi. Selleks vajalik 1% agarosgeel valmistati lahustades SeaChem agaros (Lonza; REF. 50004) 1-kordses Tris-boraat (TB) puhvril. Lahusele lisati etiidiumbromiidi lõppkonsentratsioonini 0,5 µg/mL kui lahus oli jõudnud 50°-60° C juurde. Saadud lahus valati geeli vormi ning geelivann täideti 1-kordse TB puhvriga. Geeli tardumise ajal valmistati 6 erineva kontsentratsiooniga 0 µM, 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM ja 0,6 µM G3BP-2-te sisaldavad proovid. Rekombinantne inimese G3BP-2 valk oli puhastatud kolleegide poolt. G3BP-2 alglahusele lisati K3L puhvrit, mille abil valmistati sobivad G3BP-2 lahjendused. K3L puhver sisaldas 10 mM HEPES-KOH pH-ga 7,5, 60 mM KOAc, 5% glütserooli ja 0,5 mM TCEP-i. Tubuliini-lutsiferaasi mRNA-d lisati reaktsioonisegusse lõppkonsentratsioon 0,1 µM. Segu valmistamisel lisati ühe reaktsiooni kohta 0,2 µl RNAasi inhibiitorit RiboLock kontsentratsiooniga 40 U/µl, HEPES-KOH pH 7,5 lõppkonsentratsioon 27,3 mM, KOAc lõppkonsentratsioon 165 mM, Mg(OAc)₂ lõppkonsentratsioon 0,5 mM, spermiidiini lõppkonsentratsioon 0,2 mM, putrestsiini lõppkonsentratsioon 0,1 mM ja TCEP-i lõppkonsentratsioon 2 mM. G3BP-2 lahjendustele PCR tuubides lisati reaktsioonisegu ning inkubeeriti proove 30°C juures 15 minutit. Seejärel

lisati proovidele 6-kordset laadimispuhvrit ja kanti geelivanni asetatud tardunud geeli kaevudesse. Markerina kasutati RNA Ladder HR-i, mida inkubeeriti eelnevalt koos 2-kordse laadimisvärviga 65°C juures 5 minutit. Agaroosgeel ja 1-kordne TB puhver jahutati 4°C juurde. Geelelektroforeesi teostati 4°C, 50 V ja 25 mA juures 100 minutit. Geelist tehti pilt 60 minuti ja 100 minuti möödumisel.

2.2.9 Suhkrugradiendi valmistamine

Erinevate valgusünteesist saadavate fraktsioonide eraldamiseks kasutati suhkrugradienti, mis valmistati translatsioonile eelneval päeval. Selleks valmistati 10 %-line ja 25 %-line sahharoosilahus, milles sisaldus ka spermidiin lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM, 0,6 mM putrestsiin, 0,5 mM TCEP, 150 mM K(OAc), 4 mM Mg(OAc)₂ ja 20 mM Hepes-KOH. Kaks SW41 tuubi täideti 5,5 ml 25 %-lise sahharoosilahusega. Selle pinnale pumbati klaaspipeti abil SPETEC PERIMAX 12/1 SM peristaltilist pumpa kasutades kiirusel 30 rpm 5,5 ml 10 %-list sahharoosi lahust selliselt, et moodustusid kaks silmaga eristatavat vedelikukihti. Tuubid kaeti parafilmiga ja asetati seisma horisontaalses asendisse, et kihid omavahel osaliselt segunek. Sellises asendis hoiti SW41 tuube toatemperatuuril 4 tundi ning keerati seejärel tagasi vertikaalsesse asendisse ja hoiti 4 °C juures üleöö.

2.2.10 Preparatiivses skaalas *in vitro* translatsiooni reaktsioon valkudega G3BP-2 ja Caprin-1

Valgusünteesiks kasutati HEK293FT ekstrakti, millele tehti MNaasi töötlus sarnaselt alapeatükis 2.2.6. kirjeldatule. Sellele järgnes mRNA eelinkubatsioon valkudega G3BP-2 ja Caprin-1. Eelinkubatsiooniks vajalikud komponendid segati kokku DNA LoBind tuubis. 15,7 µg mRNA-le lisati 27,5 µl K3L puhvrit, 5,4 µl KOAc ja Mg(OAc)₂ lahust (1713 mM KOAc, 1 mM Mg(OAc)₂, 273 mM HEPES, 2 mM spermidiin, 1 mM putrestsiin, 20 mM TCEP), 5,4 µl RNAasi inhibiitorit Suprase, 0,95 µl valku G3BP-2 lõppkontsentratsioonini 3 µM ja 1,30 µl valku Caprin-1 lõppkontsentratsioonini 2 µM. K-iooni kontsentratsioon segus oli 222 mM ja Mg-ioonil 0,1 mM. Segu lõppruumala oli 54 µl ja seda inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Samal ajal valmistati translatsiooniks vajalik lahus. Sinna lisati 27 µl translatsioonisegu (koostist on kirjeldatud alapeatükis 2.2.6), 13,5 µl 20 mM ATP/GTP segu, 27 µl 10-kordset KOAc lahust (470 mM KOAc, 273 mM HEPES, 2 mM spermidiin, 1 mM putrestsiin, 20 mM TCEP), 135 µl MNaasiga töödeldud HEK293FT ekstrakti ja 13,5 µl valgusegu (40 µM K3L, 4 µM GADD34, 2 µM eIF4E ja 8 µM PABP). Translatsiooni lahuse lõppruumala oli 216 µl ning

see segati kokku eelinkubatsioonisega saades lõppruumala 270 µl. Valgu G3BP-2 lõppkontsentratsioon oli 600 nM ja valgu Caprin-1 lõppkontsentratsioon oli 400 nM. Saadud lahust inkubeeriti 30 °C juures 30 minutit. Seejärel tsentrifuugiti lahusest välja suuremad osakesed ning supernatant kanti 10-25 %-lisele suhkrugradiendile. Paralleelselt kanti teises SW41 tuubis olevale sahharoosigradiendile 150 µl HEK293FT ekstrakt, mida ei töödeldud MNaasiga ega kasutatud valgusünteesiks. Gradienti tsentrifuugiti kasutades ultratsentrifuugi Optima XE-90 Ultracentrifuge (Beckman Coulter, REF: B10049), milles tsentrifuugimise tingimused olid 38 000 rpm, $\omega^2 t$ oli $1,566 \times 10^{11}$ rad²/s, kestvus 2 tundi ja 45 minutit ning töötemperatuuriks oli 4 °C.

Sahharoosigradiendis liikuvate komponentide visualiseerimiseks kasutati SPETEC PERIMAX 12/1 SM peristaltilist pumpa kiirusel 90 rpm, mis oli ühendatud seadmega BioRad ECONO UV Monitor ja võimaldas registreerida lahuse neelduvust 260 nm juures tundlikkusega 0,5 AUFS. Tulemus registreeriti arvutiprogrammi „WindDaq“ abil. Saadud graafikust lähtuvalt koguti läbipumbatav vedelik 2 ml Eppendorf tuubidesse, külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures.

2.2.11 Valgu sadestamine sahharoosi fraktsioonidest

Valkude kontsentratsiooni suurendamiseks lahuses tehti alapeatükis 2.2.10. kirjeldatud meetodiga saadud fraktsioonides valkude sadestamine. Selleks lisati igast fraktsioonist saadud 2 ml Axygen tuubis 200 µl lahusele 800 µl metanooli ja 200 µl kloroformi ning lahuseid segati. Saadud lahuseid inkubeeriti 4 °C juures jääl 20 min. Seejärel tsentrifuugiti swing-out rootoriga SIGMA 1-14K lauatsentrifuugis 16 100 g ja 4 °C juures 15 min. Tuubidest eemaldati pealmine metanooli sisaldav faas kuni tuubidesse jäi 200 µl vedelikku. Sellele lisati 1500 µl metanooli ja segati. Lahuseid tsentrifuugiti samades tingimustes 15 min. Tuubidest eemaldati vedelik kallutades ning sadet kuivatati toatemperatuuril 4 min. Fraktsioonidest 1 ja 4 saadud sade võeti üles 20 µl 1-kordses SDS geeli laadimispuhvris. Fraktsioonidest 2, 3 ja 5 saadud sade võeti üles 40 µl 1-kordses SDS geeli laadimispuhvris. Saadud kontsentreeritud fraktsioone kasutati Western bloti käigus ning seda on kirjeldatud alapeatükis 2.2.12.

2.2.12 Valkude G3BP-2 ja Caprin-1 detekteerimine Western blot meetodil

Sahharoosigradiendi kasutades saadud fraktsioonides olevate komponentide uurimiseks kasutati Western blot meetodit. Lisaks fraktsioonidele kanti geelile võrdluseks ka puhastatud valgud G3BP-2 ja Caprin-1, et nende asukohta ja kontsentratsioone fraktsioonides hinnata. Valkudest

tehti lahjendused, millele lisati 4 µl 6-kordset naatriumdodetsüülsulfaat (SDS) geeli laadimispuhvrit. Ühes lahjenduses oli mõlema valgu kogus 50 ng ja teises 125 ng. Fraktsioonid 1 ja 4 kontsentreeriti ja lahustati 20 µl 1-kordses SDS geeli laadimispuhvris ning fraktsioonid 2, 3, ja 5 lahustati 40 µl 1-kordses SDS geeli laadimispuhvris vastavalt alapeatükis 2.2.11. kirjeldatud meetodile. Saadud fraktsioone ja valgulahjendusi kuumutati 95 °C juures 5 minutit, et valgud denatureeruks. Proovid kanti 1,5 mm paksusele 10 %-lisele valgu SDS-PAGE geelile ning jooksutati 1-kordses SDS-PAGE puhvris 180 V juures 50 minutit. Polüakrüülamiidgeelilt kanti valgud Immobilon-P membraanile (Merck; IPVH08130), mille poori suurus oli 0,45 µm. Selleks kasutati BioRad märja ülekande seadet 4 °C juures, kus lisajahutusena kasutati jääd vältimaks ülekuumenemist. Geeli loputati 10 ml 1-kordse polüvinüülidien fluoriid (PVDF) puhvriga, milles sisaldasid 3,05 g/l Tris, 14,4 g/l glütsiin ja 25 ml/l metanool (SIGMA; REF: 34885-1L-M). PVDF puhvrise kasteti ka Whatman filterpaberid, mida kasutati võileiva moodustamiseks. Võileib moodustati laotades esmalt kolm filterpaberit, nende peale geel ja selle peale membraan ning kolm filterpaberit. Kihid fikseeriti ülekande seadmesse 1-kordses PVDF puhvris ja ülekandeks kasutati 80 V kestvusega 1 tund ja 25 minutit. Ülekande lõpus ilmusid membraanile suurusmarkeri valkude bändid. Membraani loputati 1-kordses tris-puhverdatud soola ja Tween 20 segu (TBST) puhvris, mis sisaldas 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl ja 0,05 % Tween-20. Blokeerimiseks kasutati 5 %-list piima (AppliChem; REF: A0830,0500; rasvavaba piimapulber) lahust 1-kordses TBST puhvris, mida segati 1 tund toatemperatuuril. Primaarsete antikehade seostumiseks valmistati 10 ml 0,5 %-list piimalahust 1-kordses TBST puhvris, millele lisati 3 µl anti-flag (SIGMA-ALDRICH; REF: SAB4301135) ja 3 µl rpl7a/SURF3 (Bethyl; REF: A300-749A-T) primaarseid antikehasid. Membraani inkubeeriti lahuses toatemperatuuril segades 50 minutit. Inkubeerimise järel pesti membraani kolm korda 2-minutiliste intervallidega 10 ml 1-kordses TBST puhvris. Pesemisele järgnes inkubatsioon 10 ml 1 %-lises piimalahuses, millele lisati 3 µl sekundaarset peroksüdaasiga konjugeeritud Goat Anti-Rabbit IgG (H +L) antikeha (Pierce; REF: 31466) ja 1 µl Strep-MAB-Classic HRP antikeha (IBA; REF: 2-1509-001). Sekundaarsete antikehadega inkubeeriti membraani 50 minutit orbitaalsegajas (60 rpm/min) segades toatemperatuuril. Membraani pesti sarnaselt eelnevalt 2-minutiliste intervallidega kolm korda. Tulemuste nähtavaks tegemiseks valmistati 2 ml ilmutuslahust, milleks segati omavahel 1 ml reagenti 1 ja 1 ml reagenti 2 (Amersham ECL Western Blotting Analysis system; REF: RPN2109). Membraan asetati ilmutuslahusesse kilekaante vahel ning eksponeeriti kemoluminestsentsfilmile (GE Healthcare) 2,5 minutit.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 SH-SY5Y rakuliini kasvatamine ja selle mõju in vitro translatsioonile

Neuroblastoomi rakuliini SH-SY5Y rakke kasvatati translatsiooniekstrakti eraldamiseks töögrupi poolt varem kirjanduse põhjal välja töötatud protokoll kohaselt. Rakke kasvatati ekstrakti eraldamiseks kokku neljal korral (kasvatus 1 - 4). Kasvatuste 1 ja 2 korral koguti rakud ekstrakti eraldamiseks 90 % - 100 % konfluentsuse juures.

Üheks probleemiks translatsiooniekstrakti eraldamisel SH-SY5Y rakuliinist kasvatustes 1 ja 2 oli saadava materjali vähene kogus võrreldes sarnastes tingimustes kasvatatud HEK293FT rakuliinist saadava ekstraktiga. Kasvatustes 1 ja 2 saadi SH-SY5Y rakkudest keskmiselt 4 A260 ühikut ekstrakti, sarnastes tingimustes kasvatatud HEK293FT rakkudest aga keskmiselt 93 ühikut ekstrakti. SH-SY5Y rakkudest eraldatud ekstrakti vähene kogus ei olnud piisav edasisteks biokeemilisteks katseteks.

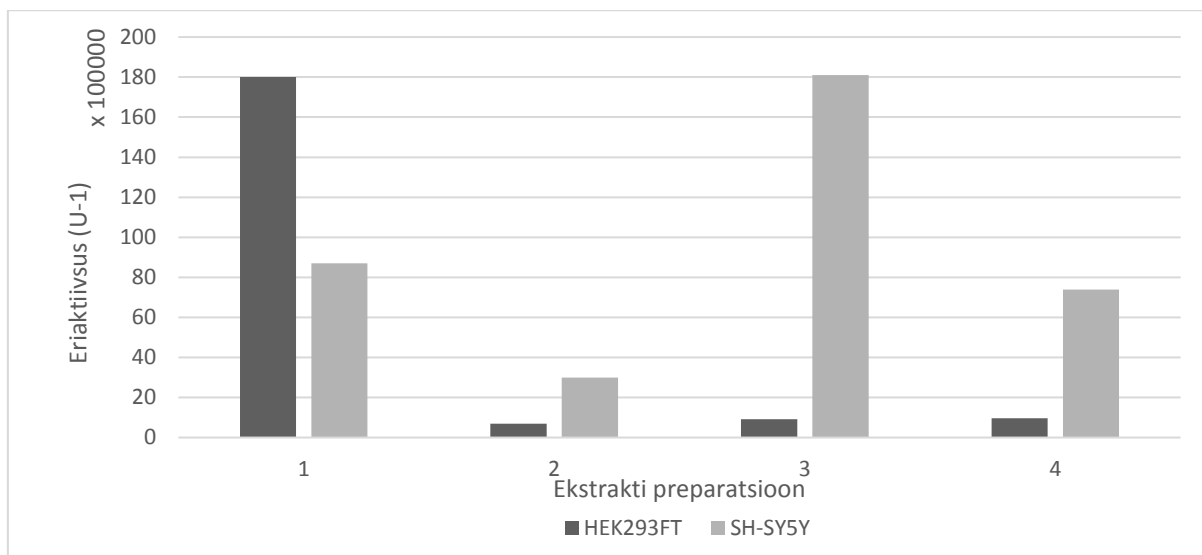
Üheks võimaluseks eraldatava materjali kogust tõsta on kultiveeritavate rakkude arvu suurendamine, kasvatades rakke 10 koekultuuri tassi asemel 15-l või isegi 20-l tassil. Rakkudega läbi viidavate tegevuste puhul on aga oluline teha neid võimalikult kiiresti vältimaks rakkude stressi. Seega tasside arvu suurendamisega kaasneks probleem nende käsitlemisel säilitamiseks rakkude stabiilset keskkonda ning tõuseks ressurside kulu. Eraldatava materjali hulga tõstmiseks eraldati kahes viimases katses (kasvatused 3 ja 4) ekstrakt seetõttu üle 100 % konfluentsuseni kasvanud rakukultuurist. Kolmandas katses kasvatati SH-SY5Y rakke esmalt 100 %-lise konfluentsuseni ja siis veel üks lisapäev. Katses 4 kasvatati rakke 100 % konfluentsuse saavutamise järel veel kaks lisapäeva. Üle 100 %-lise konfluentsuse juures vastavalt 1 või 2 päeva kasvatatud rakkude kultuuris rakkude suremisele viitavaid tunnuseid nagu rakkude suures koguses eraldumine kasvusubstraadilt ja/või söötmes „hõljuvate“ rakkude arvu märgatav suurenemine ei täheldatud. Rakkude arvu tõstmine üle 100 % konfluentsuse juures kasvatamisel teel tõstis eraldatud ekstrakti hulka ligi kolmekordselt (eraldatud ekstrakti keskmine kogus 12 A260 ühikut) (tabel 2).

Tabel 2. Rakuliini SH-SY5Y kasvatustest 1-4 saadud ekstrakti kogus A260 ühikutes. Katsetes 1 ja 2 kasvatati rakke 90 - 100 %-lise konfluentsuseni, katses 3 kasvatati rakke esmalt 100 %-lise konfluentsuseni ja siis veel üks lisapäev, katses 4 kasvatati rakke 100 %-lise konfluentsuse saavutamise järel veel kaks lisapäeva.

SH-SY5Y kasvatused	Ekstrakti kogus (A260 ühikut)
Kasvatus 1	4,8
Kasvatus 2	3,9
Kasvatus 3	14,5
Kasvatus 4	10,4

Erinevates kasvatustes eraldatud SH-SY5Y ekstraktide aktiivsust analüüsiti eelnevalt K^+ - ja Mg^{2+} -ioonide kontsentratsiooni suhtes optimeeritud tingimustes reportervalgu lutsiferaas sünteesil. Erinevate ekstraktide translatsiooniaktiivsuse võrdlemiseks jagati sünteesitud lutsiferaasi valgussignaali väärtus katsesse võetud ekstrakti hulgaga A260 ühikutes. Nii arvutatud eriaktiivsused võimaldavad hinnata ühesuguse koguse ribosoomide valgusünteesivõimet erinevates ekstrakti preparatsioonides ja seega kasvatus- ning eraldamistingimuste mõju ekstrakti kvaliteedile.

Nii SH-SY5Y kui töögrupi teiste liikmete poolt HEK293FT rakuliinist eraldatud ekstraktipreparatsioonide eriaktiivsused varieerusid märgatavalt (joonis 4). Samuti ei olnud täheldatav selgelt tõlgendatav seos ekstrakti eriaktiivsuse ja kasvatamistingimuste vahel. Siiski võib tulemuste põhjal väita, et SH-SY5Y rakkude kuni kahepäevane kasvatamine üle 100 % konfluentsuse juures ekstrakti valgusünteesivõimele negatiivset mõju ei avalda.

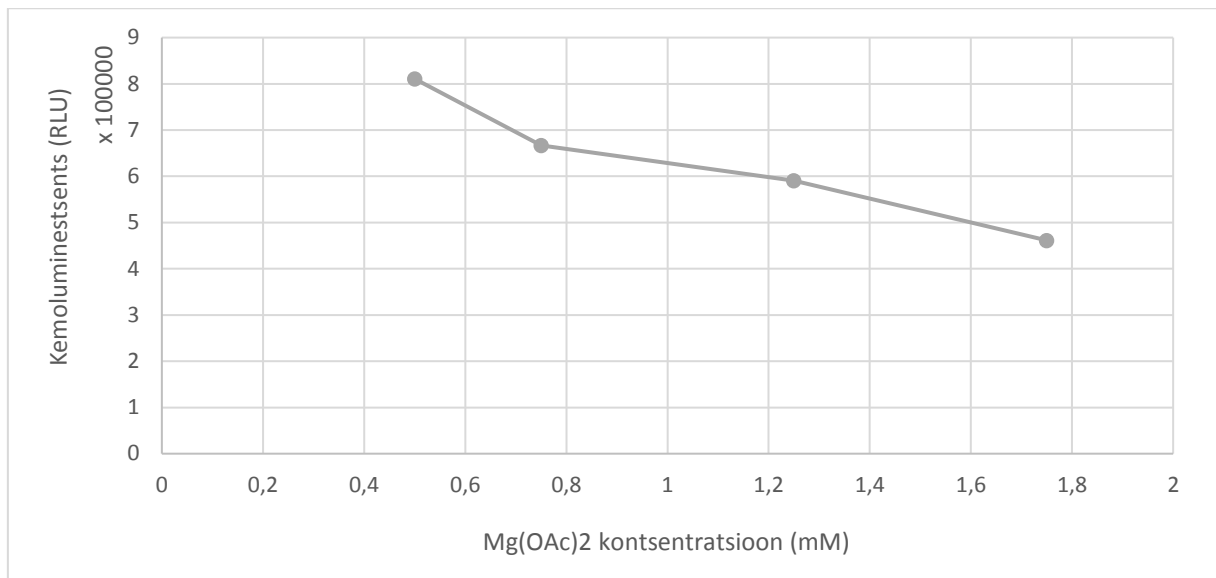


Joonis 4. SH-SY5Y ja HEK293FT ekstraktide eriaktiivsused optimaalsetes *in vitro* valgusünteesi tingimustes. Graafikul on kujutatud SH-SY5Y ja HEK293FT ekstraktide eriaktiivsused reaktsioonisegus, mida inkubeeriti 30 °C juures 30 min lutsiferaasi mRNA, 130-160 mM K(OAc) vastavalt ekstraktide optimumile (tabel 3), 0,5 mM Mg²⁺, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP-regenereerimissüsteemi juuresolekul. HEK293FT tulemused on saadud töögrupi varasematest katsetest.

Saadud tulemuste põhjal saab väita, et rakuliinist SH-SY5Y saadava ekstrakti koguse suurendamiseks võib rakke kasvatada kuni kaks päeva üle 100 %-lise konfluentsuse juures säilitades seejuures ekstraktide suhtelise aktiivsuse. Rakkude kasvatamiseks kasutatavate 15 cm läbimõõduga tasside arvu suurendamist saab kaaluda edaspidiste ekstraktide valmistamise korral kui soovitakse rakumassi veelgi suurendada. Rakkude kasvatamiseks kasutatava söötme koguse suurendamist töö käigus ei kaalutud, sest neuroblastoomi rakud kinnituvad tassi põhjale ja ei esine vabalt söötmes.

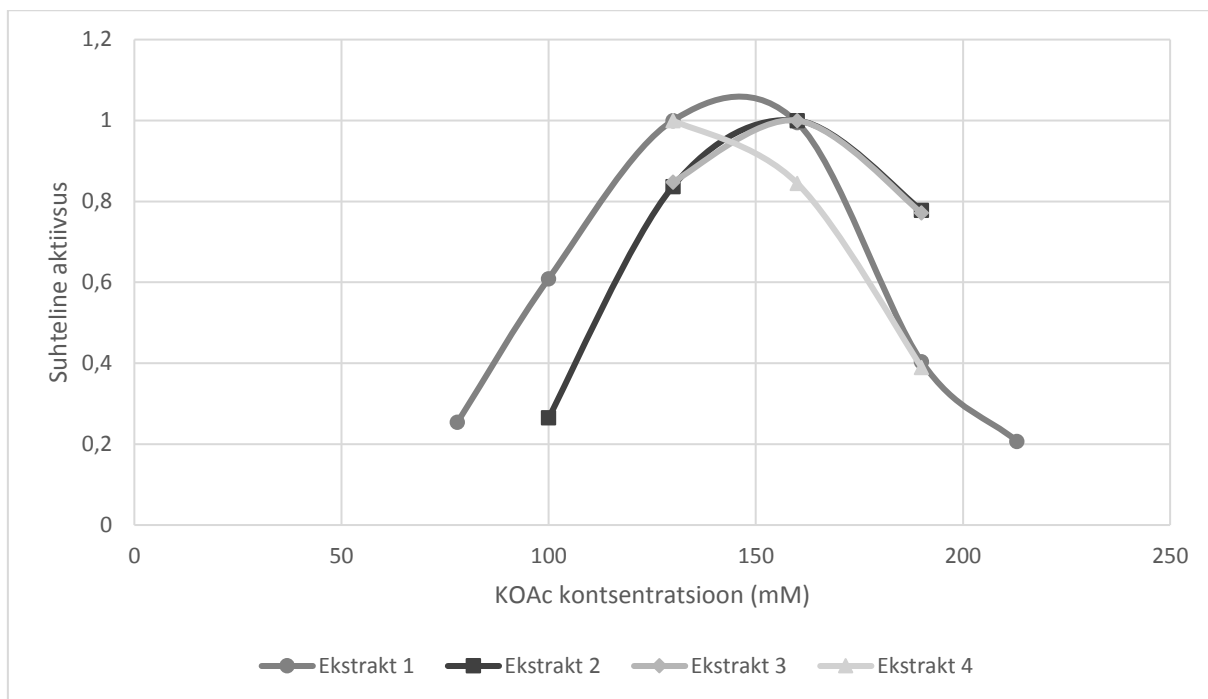
2.3.2 *In vitro* rakuvaba valgusünteesi tingimuste optimeerimine SH-SY5Y ekstraktis

Ribosoomide valgusünteesiaktiivsus sõltub oluliselt K⁺ ja Mg²⁺-ioonide ning mRNA kontsentratsioonist reaktsioonikeskkonnas. K⁺ ja Mg⁺ on olulised ensüümide kofaktorid, samuti aitavad nad stabiliseerida nukleiinhapet (Draper, 2004). Seetõttu määrati iga ekstrakti korral reportervalgu lutsiferaas sünteesiks optimaalne K⁺- Mg²⁺- ja mRNA kontsentratsioon. Selleks testiti lutsiferaasi sünteesi rakuekstraktis K⁺-ioonide kontsentratsioonivahemikus 90 – 210 mM, Mg²⁺-ioonide kontsentratsioonivahemikus 0,5 – 1,75 mM ning mRNA kontsentratsiooni vahemikus 0,5 – 1,47 µg. Valgusünteesi kõige suurem aktiivsus saavutati kui Mg²⁺ lõppkontsentratsioon oli valgusünteesi korral 0,5 mM (joonis 5).

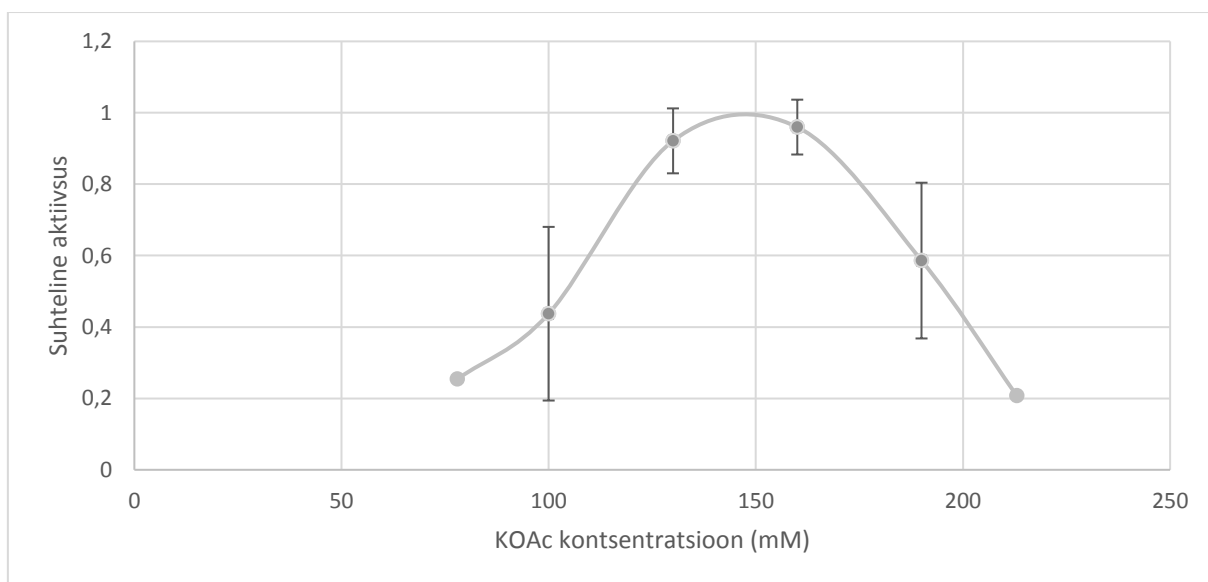


Joonis 5. Mg^{2+} -ioonide mõju SH-SY5Y ekstrakti translatsiooniaktiivsusele. Graafikul on kujutatud reportervalgu lutsiferaas aktiivsus mikrokoki nukleasiga eeltöödeldud, 0,19 A260 ühikut SH-SY5Y ekstrakti sisaldavas reaktsioonisegus, mida inkubeeriti 30 °C juures 30 min lutsiferaasi mRNA, 210 mM KOAc, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP-regenereerimissüsteemi juuresolekul Mg^{2+} kontsentratsioonivahemikus 0,5 – 1,75 mM.

Optimaalse K^+ kontsentratsiooni leidmiseks kasutati erinevaid KOAc kontsentratsioone. Joonisel 6 on kujutatud ekstraktide suhtelised aktiivsused translatsioonil erinevate KOAc lõppkontsentratsioonide juures. Joonis 7 näitab kõigi ekstraktide keskmist aktiivsust koos standardhälvega.



Joonis 6. K^+ -ioonide mõju SH-SY5Y ekstrakti translatsiooniaktiivsusele. Graafikul on kujutatud reportervalgu lutsiferaas aktiivsus mikrokoki nukleaasiga eeltöödeldud, 0,16 – 019 A260 ühikut SH-SY5Y ekstrakti sisaldavas reaktsioonisegus, mida inkubeeriti 30 min 30 C juures lutsiferaasi mRNA, 0,5 mM $Mg(OAc)_2$, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP regenereerimissüsteemi juuresolekul K^+ kontsentratsioonivahemikus 78 – 213 mM.



Joonis 7. K^+ -ioonide mõju SH-SY5Y ekstrakti translatsiooniaktiivsusele. Graafikul on kujutatud reportervalgu lutsiferaas aktiivsus mikrokoki nukleaasiga eeltöödeldud, 0,16 – 0,19 A260 ühikut SH-SY5Y ekstrakti sisaldavas reaktsioonisegus, mida inkubeeriti 30 min 30 °C juures lutsiferaasi mRNA, 0,5 mM $Mg(OAc)_2$, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP regenereerimissüsteemi juuresolekul K^+ kontsentratsioonivahemikus 78 – 213 mM.

Kõigi ekstraktide puhul andsid kõrge suhtelise aktiivsuse KOAc 130 mM ja 160 mM lõppkontsentratsiooniga valgusünteesi lahused ja nendest leiti K optimumid kõigi ekstraktide jaoks (tabel 3). Ekstrakt 1 andis 130 mM ja 160 mM KOAc korral sarnase aktiivsuse, ekstraktide 2 ja 3 jaoks oli optimum 160 mM ja ekstrakti 4 jaoks 130 mM KOAc juures.

Tabel 3. Rakuliini SH-SY5Y tsütoplasmaatilise ekstraktidele vastavad K⁺ optimaalsed kontsentratsioonid *in vitro* translatsiooni lahuses. Ekstraktid olid mikrokoki nukleaasiga eeltöödeldud ja neid inkubeeriti 30 min 30 °C juures lutsiferaasi mRNA, 0,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP regenereerimissüsteemi juuresolekul.

SH-SY5Y rakuekstraktid	K ⁺ optimum
ekstrakt 1	130 mM - 160 mM
ekstrakt 2	160 mM
ekstrakt 3	160 mM
ekstrakt 4	130 mM

Töö tulemused näitavad, et *in vitro* translatsiooniks on optimaalsed tingimused sellised, kus mRNA kogus on vahemikus 0,5-1 µg, K⁺ kontsentratsioon on 130-160 mM ning Mg²⁺ kontsentratsioon on 0,5 mM. Töögrupi varasemad katsed näitavad, et sarnased tingimused on vajalikud ka HEK293FT ekstraktiga *in vitro* translatsiooni katsetes. Ioonide kõrgemate kontsentratsioonide juures võivad need segada translatsiooni toimumist. mRNA-le polü-A saba ja cap-struktuuri lisamine on vajalikud translatsiooni initsiatsiooni toimumiseks (Jackson jt, 2010), mistõttu lisati mõlemad mRNA-le selle sünteesimisel.

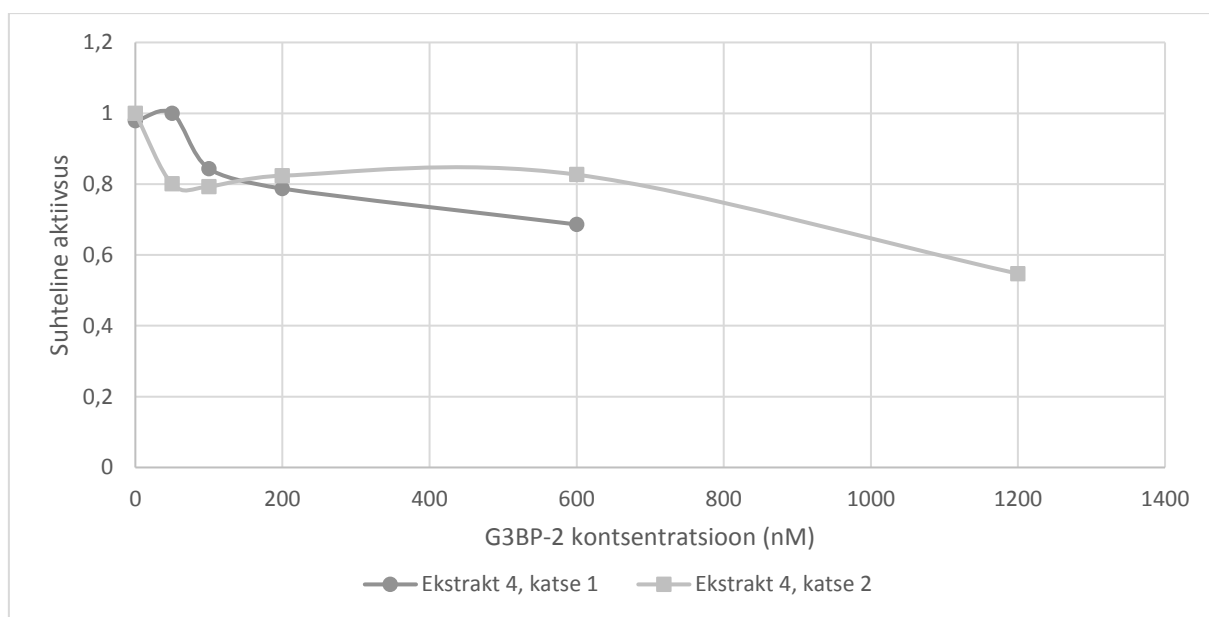
2.3.3 G3BP-2 ja Caprin-1 pärssivad reportervalgu sünteesi SH-SY5Y translatsiooniekstraktis

RNA-seonduvad valgud G3BP-2 ja Caprin-1 mängivad kesket rolli erinevate ribosomaalsete komplekside assambleerumisel nii stressigraanuliteks kui neuronaalseks RNA graanuliteks. Käesoleva töö eesmärgiks ongi SH-SY5Y rakuekstrakti põhineva *in vitro* translatsioonisüsteemi väljatöötamine ribosoom-G3BP-2/Caprin-1 komplekside eraldamiseks elektronmikroskoopiliseks struktuurianalüüsiks. Seetõttu testiti järgnevates katsetes töögrupi poolt varem prokarüootses süsteemis ekspresseeritud rekombinantse G3BP-2 ja Caprin-1 võimet ribosoomidega seonduda.

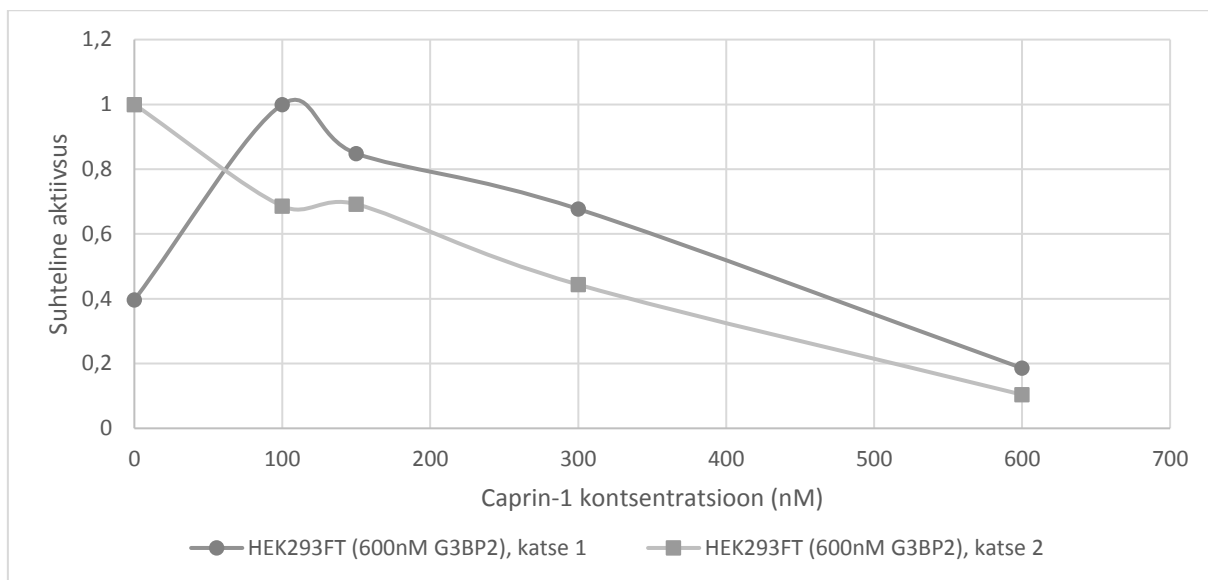
Kuna G3BP-2 ja Caprin-1 korral on varasemalt näidatud ribosoomide aktiivsust pärssivat toimet, analüüsiti esmalt G3BP-2 ja Caprin-1 mõju reportervalgu lutsiferaas sünteesile SH-

SY5Y translatsiooniekstraktis. K^+ -, Mg^{2+} -ioonide ning mRNA kontsentratsiooni suhtes optimeeritud tingimustes lisati translatsiooniekstraktile erinevas koguses G3BP-2-te või Caprin-1 ning ekstrakti valgusünteesivõimet hinnati sünteesitud lustiferaasi luminetsentsignaali põhjal. G3BP-2 kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 50 –1200 nM, Caprin-1 kontsentratsiooni vahemikus 100–600 nM.

Mõlema valgu lisamisel translatsiooniekstraktile oli täheldatav reportervalgu sünteesitaseme langus, mis oli positiivses korrelatsioonis lisatud G3BP-2 ja Caprin-1 kontsentratsiooniga. G3BP-2 korral ulatus maksimaalne valgusünteesi pärssiv toime 40 %-ni ilma G3BP-2-ta kontrollproovi translatsiooniaktiivsusest (joonis 8), Caprin-1 korral aga 80 %-ni kontrollproovi aktiivsusest (joonis 9).



Joonis 8. Rekombinantse, Flag-affiinsuspeptiidi sisaldava G3BP-2 mõju SH-SY5Y translatsiooniaktiivsusele. Reportervalgu lutsiferaas mRNA-d (350 nM) eelinkubeeriti G3BP-2-ga kontsentratsioonivahemikus 0 – 1200 nM 0,1 mM Mg^{2+} ja 210 mM K^+ juuresolekul toatemperatuuril 5 min. G3BP-2-eelinkubeeritud mRNA-le lisati 0,17 A260 ühikut SH-SY5Y ekstrakti, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP regenereerimissüsteemi sisaldav translatsioonisegu ning proovi inkubeeriti 30 min 30 C juures.



Joonis 9. G3BP-2 ja Caprin-1 koosmõju SH-SY5Y translatsiooniaktiivsusele. Reportervalgu lutsiferaas mRNA-d (350 nM) eelinkubeeriti 600 nM G3BP-2 ja Caprin-1-ga kontsentratsioonivahemikus 0 – 600 nM 0,1 mM Mg^{2+} ja 210 mM K^+ juuresolekul toatemperatuuril 5 min. G3BP-2/Caprin-1-eelinkubeeritud mRNA-le lisati 0,17 A260 ühikut SH-SY5Y ekstrakti, 1 mM aminohapete segu ning ATP/GTP regenereerimissüsteemi sisaldav translatsioonisegu ning proovi inkubeeriti 30 min 30 C juures.

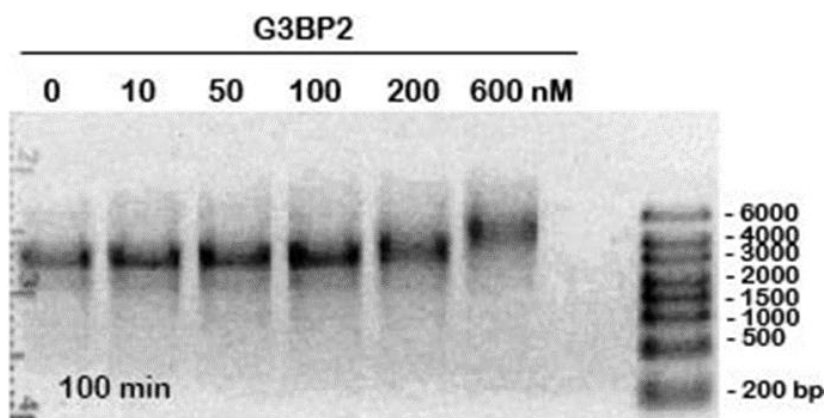
2.3.4 Rekombinantne G3BP-2 on võimeline seonduma lutsiferaasi mRNA-ga

G3BP-2 ja Caprin-1 valgusünteesi pärssiv toime võib olla tingitud nii nende valkude seondumisest transleeritava mRNA-ga kui otsesest seondumisest transleerivate ribosoomide või translatsiooni initsiatsiooni kompleksiga. Seetõttu analüüsiti järgnevas katsetes nii G3BP-2 seondumist „vaba“ (s.t. ribosoomidega mitteseondunud) mRNA-ga kui G3BP-2 ja Caprin-1 seondumist erinevate ribosomaalsete kompleksidega translatsiooniekstraktis.

G3BP-2 seondumist reportervalgu lutsiferaasi mRNA-ga analüüsiti mRNA elektroforeetilise liikuvuse muutuse põhjal nn. „gel-shift“ katsesüsteemis. Erinevas kontsentratsioonis G3BP-2-ga eelinkubeeritud mRNA liikuvuse muutust võrreldes sama mRNA liikuvusega G3BP-2-te mittesisaldavas kontrollproovis jälgiti elektroforeesil 1 % agarosgeelis. Sellises süsteemis erineb mRNA-G3BP-2 kompleksi liikuvus G3BP-2-ga mitteseondunud mRNA liikuvusest.

100 minutilise elektroforeesi järel 4 °C juures oli agarosgeelis selgelt täheldatav G3BP-2-ga eelinkubeeritud mRNA liikuvuse vähenemine võrreldes kontrollprooviga. mRNA liikuvuse vähenemine korreleerus eelinkubatsioonil kasutatud G3BP-2 kontsentratsiooniga (joonis 10).

Saadud tulemus osutab, et G3BP-2 on võimeline reporter-mRNA-ga seonduma sõltumata ribosoomide seondumisest mRNA-ga.



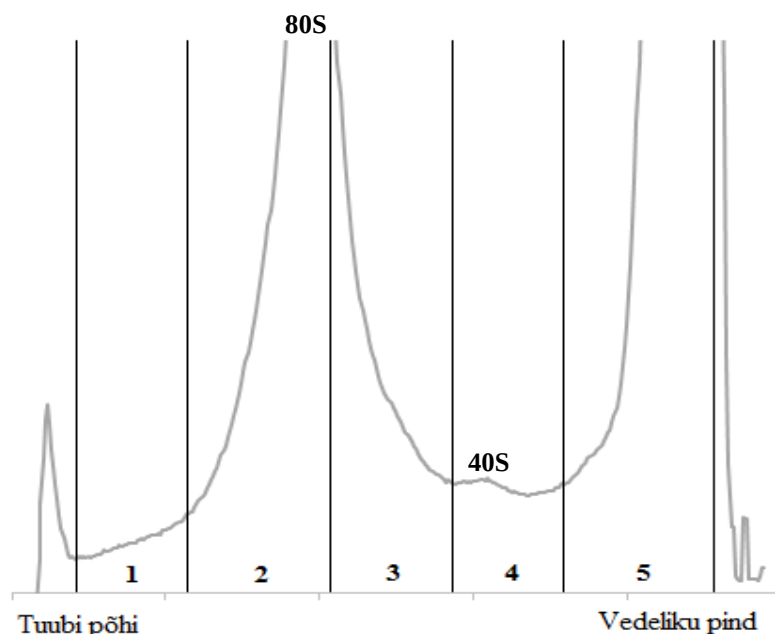
Joonis 10. G3BP-2-ga eelinkubatsiooni mõju lutsiferaasi mRNA elektroforeetilisele liikuvusele. 100 nM lutsiferaasi mRNA-d inkubeeriti 10 – 600 nM G3BP-2-ga 0,5 mM Mg^{2+} ja 165 mM K^+ juuresolekul 30 C juures 15 min. mRNA-G3BP-2 kompleksi moodustumist hinnati mRNA elektroforeetilise liikuvuse muutuse põhjal 100 min elektroforeesi järel 1 % agarosgeelils Tris-Boraat puhvris (pH 8.0) 50 V/25 mA ja 4 C juures.

Oluline on siinjuures lisada, et G3BP-2-ga eelinkubeeritud proovide elektroforeesil ei täheldatud mRNA lagunemisele viitavate madalama molekulmassiga fragmentide esinemist. Nimelt on kirjanduses andmeid, et G3BP-2 isovorm G3BP-1 omab fosforüleeritud kujul RNA endonukleaasest aktiivsust (Tourriere jt, 2001). RNA degradatsioonile viitavate madalama molekulmassiga fragmentide puudumine osutab seega G3BP-2 märgatava endonukleaasse aktiivsuse puudumisele ning välistab võimaluse, et translatsioonikatsetes täheldatud ekstrakti valgusünteesi aktiivsuse vähenemine G3BP-2 lisamisel tuleneks G3BP-2 endonukleaasest aktiivsusest.

2.3.5 G3BP-2 ja Caprin-1 on ülesindatud 40S subühikute fraktsioonis

Kuigi „gel-shift“ katse tulemused kinnitavad G3BP-2 võimet seonduda reportervalgu lutsiferaas mRNA-ga, ei ole selle tulemuse põhjal võimalik otsustada, kas translatsioonikatsetes täheldatud G3BP-2 valgusünteesi aktiivsust pärssiv toime tuleneb G3BP-2 ribosoomidega konkureerivast seondumisest mRNA-ga. On mõeldav ka stsenaarium, mille kohaselt G3BP-2 (ja Caprin-1) translatsiooni pärssiv toime ekstraktis tuleneb nende valkude otsesest seondumisest kas transleerivate ribosoomide või translatsiooni initsiatsiooni kompleksidega. Seetõttu on vajalik analüüsida, kas ja milliste ribosoomi kompleksidega seonduvad G3BP-2 ja Caprin-1 translatsiooniekstraktis.

Analüüsimeks G3BP-2 ja Caprin-1 jaotumist erinevate ribosoomi komplekside vahel translatsiooniekstraktis fraktsioneeriti G3BP-2 ja Caprin-1 sisaldav translatsiooniekstrakt 10 % - 25 % sahharoosi gradiendis tsentrifuugimise teel. Sahharoosi gradiendis tsentrifuugimine võimaldab teineteisest lahutada ribosoomi 40S ja 60S subühikud, 80S ribosoomid ning polüribosoomid (joonis 11). Eraldatud fraktsioonidest on G3BP-2 ja Caprin-1 sisaldust seejärel võimalik tuvastada/hinnata valguspetsiifiliste antikehadega Western Blot meetodil.

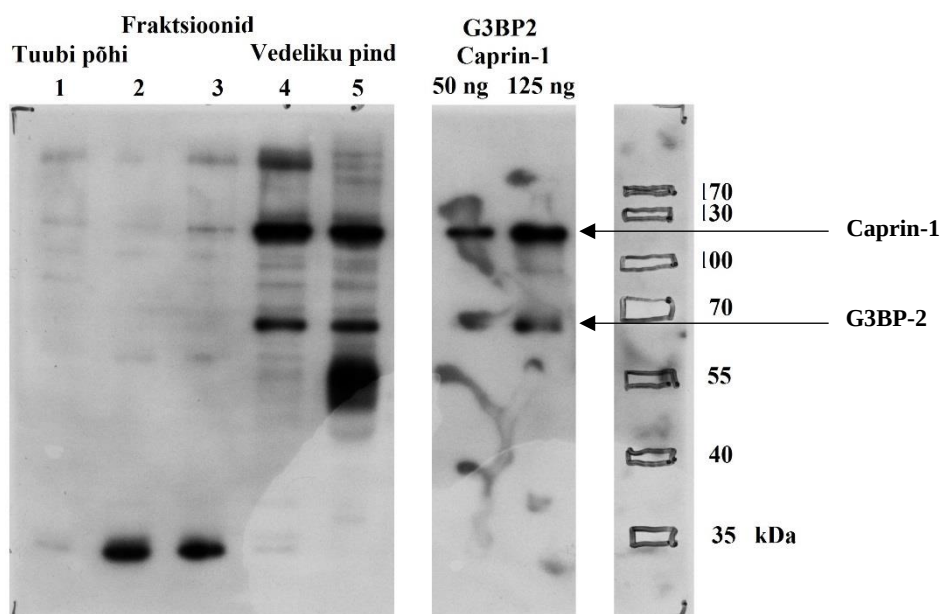


Joonis 11. G3BP-2 ja Caprin-1-ga inkubeeritud HEK293FT translatsiooniekstrakti fraktsioneerimine 10 % - 25 % sahharoosi gradiendis. 7 A260 ühikut HEK293FT translatsiooniekstrakti, millele oli lisatud 600 nM G3BP-2, 400 nM Caprin-1 ja 50 nM lutsiferaasi mRNA, inkubeeriti 30 min 30 C juures ning tsentrifuugiti seejärel $246942 \times g$ juures 165 min ($\omega t = 1,566 \times 10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$) läbi 10 mL 10 % - 25 % sahharoosi gradiendi. Joonisel on kujutatud RNA sisaldus tsentrifuugimise järel piki gradienti (suunas gradienti põhjast pinna poole) A260 neelduvuse põhjal. Numbrid 1 – 5 tähistavad gradiendilt kogutud fraktsioone, mida kasutati G3BP-2 ja Caprin-1 sisalduse määramiseks Western Bloti abil. 1) polüribosoomid, 2) 80S ribosoomid, 3) ribosoomi 60S subühikud, 4) ribosoomi 40 subühikud, 5) ribosoomidega mitteseondunud materjal.

Tulenevalt SH-SY5Y rakuekstrakti vähesest kogusest ning fraktsioneerimiskatse materjalikulukusest (ligi 7 A260 ühikut rakuekstrakti katse kohta), teostati töös pilootkatse HEK293FT rakuliini ekstraktsi kasutades.

Sahharoosi gradiendi fraktsioonidest $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ sadestamise teel kontsentreeritud materjali analüüs Western Blot meetodil osutab, et translatsiooniekstrakti lisatud G3BP-2 ja Caprin-1 on ülesindatud 40S subühikutele ja ribosoomidega mitteseondunud materjalile vastavas

fraktsioonis ning alaesindatud 80S ribosoomidele ja polüsoomidele vastavates fraktsioonides (joonis 12).



Joonis 12. G3BP-2 ja Caprin-1 sisaldus HEK293FT ekstrakti sahharoosi gradiendi fraktsioondies. Fraktsioonidest 1 – 5 (joonis 11) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ sadestamise teel kontsentreeritud materjalist kanti 10 % SDS-PAGE geelile 6 μg totaalset valku sisaldavad proovid (v.a. fraktsioon 1, kus geelile kanti 3 μg totaalset valku). Valkude ülekande järel geelilt PVDF membraanile tuvastati G3BP-2 ja Caprin-1 membraanil antikehade abil, mis on spetsiifilised vastavalt Flag-affiinsuspeptiidi suhtes G3BP-2-s ja streptavidiin-affiinsuspeptiidi suhtes Caprin-1-s. Nooltega on näidatud valkudele vastavad triibud geelil.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös töötati välja meetodika *in vitro* translatsiooniekstrakti eraldamiseks inimese neuroblastoomi rakuliinist SH-SY5Y. Eraldatud ekstrakti valgusünteesiaktiivsust testiti lutsiferaasi kodeerivast järjestusest ning klass I tubuliini 5'- ja 3'-mittetransleeritavatest aladest koosneva kimäärse mRNA translatsioonil ning analüüsiti stressigraanulite ja neuronaalsete RNA graanulite moodustumises kesket rolli mängivate RNA-seoseliste valkude G3BP-2 ja Caprin-1 mõju nimetatud mRNA translatsioonile SH-SY5Y ekstraktis. Eraldi analüüsiti töös G3BP-2 ja Caprin-1 jaotust erinevatesse ribosomaalsetesse fraktsioonidesse HEK293FT rakuliinist eraldatud translatsiooniekstraktis.

SH-SY5Y rakuliinist eraldatud ekstrakti eriaktiivsus oli võrreldav töögrupi poolt varem HEK293FT rakuliinist eraldatud ekstrakti eriaktiivsusega. Sarnaselt HEK293FT ekstraktiga oli ka SH-SY5Y ekstrakti korral täheldatav eriaktiivsuse märgatav kõikumine preparatsiooniti. See kõikumine ei korreleerunud rakkude kasvatustingimustega ning on seega oletatavasti seotud varieeruvusega ekstrakti eraldamise protseduurides.

Peamise probleemina ilmnes töös SH-SY5Y rakuliinist eraldatud ekstrakti vähene kogus võrreldes sarnastes tingimustes kultiveeritud HEK293FT rakkudest saadava ekstrakti kogusega. Mõnevõrra suurendas SH-SY5Y rakuliinist eraldatud ekstrakti kogust rakkude kuni kahepäevane kasvatamine üle 100 % konfluentsuse juures, mis ei ole üldreeglina soovitatav, kuid selline kasvatusmeetodika ei mõjutanud eraldatud ekstrakti eriaktiivsust.

Töögrupi varasematele tulemustele tuginedes kasutati *in vitro* translatsiooniks K3L, GADD34, eIF4E ja PABP valgusegu, millest tulenevalt oli *in vitro* valgusünteesi aktiivsus katsetes kõrge. Leiti, et kõige suurema aktiivsuse annab 0,5 mM Mg^{2+} ja K^{+} lõppkontsentratsiooniga vahemikus 130-160 mM. mRNA kogus peaks *in vitro* translatsiooni korral jääma vahemikku 0,5-1 μ g. SH-SY5Y ekstraktiga tehtud katsed näitasid, et K^{+} ja Mg^{2+} kontsentratsioonid langesid kokku samades tingimustes tehtud katsetes HEK293FT ekstrakti optimaalsete kontsentratsioonidega.

Tulemustest selgus, et G3BP-2 seostub mRNA külge inkubeerides neid 30 °C juures 15 minutit. Valgusünteesi inhibeerivat mõju avaldavad nii G3BP-2 üksinda kui ka koos valguga Caprin-1, kuid seejuures ei avalda Caprin-1 lisamine valgusünteesi aktiivsusele eralist mõju. Kahe valgu mõjul langeb valgusünteesi aktiivsus märgatavalt enam kui ainult G3BP-2 mõjul. Western blot analüüsist selgus, et G3BP-2 ja Caprin-1 leidub *in vitro* translatsioonil HEK293FT ekstraktis 40S ribosoomide subühikute fraktsioonis, mis on kooskõlas kirjanduse andmetega (Kedersha jt, 2016).

Implementing the cell free translation in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

Annika Liiv

Summary

The objective of this thesis was to investigate opportunities for the use of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line in *in vitro* translation experiments for assessment of the effect of RNA-binding proteins on protein synthesis. In addition to the assessment of protein synthesis rates, a neuroblastoma-based *in vitro* translation system would provide means for purification of protein and complexes, which could thereafter be utilised in structural biology studies.

Team had previously studied the use of neuronal RNA granules for delivery of specific mRNAs to axodendrites and identified several RBPs present in RNA granules, of which G3BP-2 and Caprin-1 are the most interesting due to being involved in the formation of stress granules for the temporary protection of RNA under stress conditions.

Main problem when making cytoplasmic extract was the small amount of extract from SH-SY5Y compared to HEK293FT grown under the same conditions. This was somewhat overcome by overgrowing SH-SY5Y cells at the confluency of 100% for 1-2 days. This method did not have negative effects on *in vitro* translation activity.

Based on the results from previous experiments protein mixture containing K3L, GADD34, eIF4E and PABP was added to the *in vitro* translation reaction which raised translational activity significantly. The rate of synthesis was found to be greatest at 0.5 mM Mg²⁺, 130–160 mM K⁺ and the amount of mRNA should fall between 0.5 and 1 µg. Similar results were received when extracts of HEK293FT were used for the protein synthesis.

The results showed that the protein G3BP-2 binds to mRNA, but does not break it down. Protein synthesis is inhibited both by G3BP-2 alone as well as in combination with Caprin-1; however, when only Caprin-1 is added, the rate of synthesis is not affected significantly. When the two proteins are combined, the decrease in the rate of protein synthesis is considerably higher than when only G3BP2 is present. The Western blot analysis showed G3BP-2 and Caprin-1 to be over-represented in the fraction of 40S sub-units and material not bound to ribosomes in *in vitro* translation in the HEK293FT extract.

In summary, it was established that cytoplasmic extracts prepared from neuroblastoma cells can indeed be utilised as an *in vitro* translation system, as the corresponding protein synthesis rates are within the same order of magnitude as in the case of extracts prepared from HEK293FT human embryonic kidney cells.

1. Aulas, A., Caron, G., Gkogkas, C. G., Mohamed, N.-V., Destroismaisons, L., Sonenberg, N., Leclerc, N., Parker, A. and Velde, C. V. (2015). G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *Journal of Cell Biology*, 209 (1): 73–84.
2. Banerjee, A. K. (1980). 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 44 (2): 175-205.
3. Batish, M., Van Den Bogaard, P., Kramer, F. R. and Tyagi, S. (2012). Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12): 4645–4650. Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., ... Lacaille, J. C. (2006). Characterization of an RNA granule from developing brain. *Molecular & cellular proteomics*, 5(4): 635–651.
4. Bramham, C. R. and Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 776–789.
5. Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. and Jagus, R. (1993). Recombinant Vaccinia Virus K3L Gene Product Prevents Activation of Double-stranded RNA-dependent, Initiation Factor 2 α -specific Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (17): 12837-12842.
6. Castello, A., Alvarez, E. and Carrasco, L. (2006). Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (44): 33206–33216.
7. Darnell, J. E., Wall, R. and Tushinski, R. J. (1971). An Adenylic Acid-Rich Sequence in Messenger RNA of HeLa Cells and Its Possible Relationship to Reiterated Sites in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68 (6): 1321-1325.
8. Draper, D. E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *RNA*, 10: 335–343.
9. Fadden, P., Haystead, T. A. J. and Lawrence, J. C., Jr. (1997). Identification of Phosphorylation Sites in the Translational Regulator, PHAS-I, That Are Controlled by Insulin and Rapamycin in Rat Adipocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 272 (15): 10240–10247.
10. Falkenberg, C.V., Carson J. H. and Blinov M. L. (2017). Multivalent Molecules as Modulators of RNA Granule Size and Composition. *Biophysical Journal*, 113: 235–245.
11. Fatimy, R. E., Davidovic, L., Tremblay, S., Jaglin, X., Dury, A., Robert, C., De Koninck, P. and Khandjian, E. W. (2016). Tracking the Fragile X mental retardation

- protein in a highly ordered neuronal ribonucleoparticles population: a link between stalled polyribosomes and RNA granules. *Plos Genetics*, 12(7): e1006192.
12. Furic, L., Rong, L., Larsson, O., ... Sonenberg, N. (2010) eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (32): 14134-14139.
 13. Garber, K. B., Visootsak, J. and Warren, S. T. (2008) Fragile X syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 16: 666–672.
 14. Gingras, A.-C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999). eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment To Ribosomes And Regulators Of Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 913–963.
 15. Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P. and Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*, 352 (6292): 1413-1416.
 16. Irvine, K., Stirling, R., Hume, D. and Kennedy, D. (2004). Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *The International Journal of Developmental Biology*, 48: 1065-1077.
 17. Jackson, R. J., Hellen, C. U. and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2): 113–127.
 18. Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., ... Anderson, P. (2016). G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *Journal of Cell Biology*, 212 (7): 845–860.
 19. Kovalevich, J. and Langford, D. 2013. Consideration for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology, p. 9-21. In Amini, S. ja White, M. K (ed), *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1078. Humana Press, Totowa, NJ.
 20. Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15: 8125–8148.
 21. Kühn, U., Gündel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rüdel, S. and Wahle, E. (2009). Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (34): 22803–22814.
 22. Lyons, A., Naylor, S. G., Scholze, W. and Talbot, W. S. (2009). Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nature genetics* 41, 854.

23. Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M. and Fujii, M. (2012). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells*, 18 (2): 135-146.
24. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3(3): reviews 0004.1–0004.10.
25. Mikami, S., Kobayashi, T., Yokoyama, S. and Imataka, H. (2006). A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *Journal of Biotechnology*, 127: 65–78.
26. Muaddi, H., Majumder, M., Peidis, P., Papadakis, A. I., Holcik, M., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Hatzoglou, M. and Koromilas, A. E. (2010). Phosphorylation of eIF2 α at Serine 51 Is an Important Determinant of Cell Survival and Adaptation to Glucose Deficiency. *Molecular biology of the cell*, 21 (18): 3220–3231.
27. Nakayama, K., Ohashi, R., Shinoda, Y., ... Shiina, N. (2017). RNG105/caprin1, an RNA granule protein for dendritic mRNA localization, is essential for long-term memory formation. *eLife*, 6:e29677.
28. Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. O. and Ron, D. (2001). Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *The Journal of Cell Biology*, 153 (5): 1011–1021.
29. Ohashi, R., Takao, K., Miyakawa, T. and Shiina, N. (2016). Comprehensive behavioral analysis of RNG105 (Caprin1) heterozygous mice: Reduced social interaction and attenuated response to novelty. *Scientific Reports*, 6, 20775.
30. Panas, M. D., Ivanov, P. and Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *Journal of Cell Biology*, 215 (3): 313–323.
31. Panas, M. D., Varjak, M., Lulla, A., Eng, K. E., Merits, A., Hedestama, G. B. K. and McInerney, G. M. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Molecular Biology of the Cell*, 23: 4663-4871.
32. Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., Dugue, A., Schweighoffer, F. and Tocque, B. (1996). A Ras-GTPase-Activating Protein SH3-Domain-Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (6): 2561-2569.
33. Ravanidis, S., Kattan, F. G. and Doxakis, E. (2018). Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2280.

34. Sephton, C. F. and Yu, G. (2015). The function of RNA-binding proteins at the synapse: implications for neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19): 3621–3635.
35. Shiina, N., Shinkura, K. and Tokunaga, M. (2005). A Novel RNA-Binding Protein in Neuronal RNA Granules: Regulatory Machinery for Local Translation. *The Journal of Neuroscience*, 25 (17): 4420–4434.
36. Shipley, M. M., Mangold, C. A. and Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, 108, e53193.
37. Shuman, S. (2002). What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 619–625.
38. Tourriere, H., Gallouzi, I.-E., Chebli, K., Capony, J. P., Mouaikel, J., van der Geer, P. and Tazi, J. (2010). RasGAP-Associated Endoribonuclease G3BP: Selective RNA Degradation and Phosphorylation-Dependent Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 21 (22): 7747–7760.
39. Tudek, A., Lloret-Llinares, M., and Jensen, T. H. (2018). The multitasking polyA tail: nuclear RNA maturation, degradation and export. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 373:20180169.
40. Wang, X., Zhang, M. and Li, H. (2019). LncRNA17A regulates autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cell line as an in vitro model for Alzheimer's disease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83 (4): 609–621.
41. Willis, D. E. and Twiss, J. L. (2006). The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 16 (1): 111-118.
42. Xie, H., Hu, L. and Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123 (8): 1086-1092.

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Annika Liiv,

(autori nimi)

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

Rakuvaba valgusünteesi rakendamine inimese neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliinis,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on PhD Arto Pulk ja PhD Kalle Kipper,

(juhendajate nimed)

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annika Liiv

31.05.2021