

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

***Escherichia coli* ribosomaalsete valkude dünaamika lag-kasvufaasis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anna Liigus

Juhendajad    PhD Aivar Liiv  
                  MSc Kaspar Reier

TARTU 2020

## INFOLEHT

### ***Escherichia coli* ribosomaalsete valkude dünaamika lag-kasvufaasis**

Ribosoom on rRNA ja r-valkude kompleks, mis vastutab valgusünteesi eest igas organismis. R-valgud on olulised mitte ainult ribosoomi struktuuri hoidmiseks ja selle funktsioneerimiseks, vaid ka ribosoomi biogeneesi koordineeritud protsessi jaoks. Ribosoomide biogenees on vajalik rakkude kasvu ja jagunemise alustamiseks. *Escherichia coli* rakkudes algab uute ribosoomide süntees hilises lag-kasvufaasis. Selle töö peamine küsimus on, mis juhtub *E. coli* r-valkudega lag-kasvufaasis? Vastuse leidmiseks kasutati kvantitatiivset mass-spektromeetria (SILAC) meetodit r-valkude uurimiseks rakukultuuri proteoomis. Tulemused näitasid, et statsionaarse kasvufaasi rakkude r-valgud lagunevad lag-kasvufaasis, kuid mittetäielikult. Kas selle põhjuseks on r-valkude spetsiifiline lagundamine või kogu raku proteoomi lagundamine, on edasiste uuringute jaoks avatud küsimus.

Märksõnad: *Escherichia coli*, ribosoomid, r-valgud, SILAC, lag-kasvufaas

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

### **Dynamics of *Escherichia coli* ribosomal proteins in the lag growth phase**

A ribosome is a complex of rRNA and r-proteins that is responsible for protein synthesis in every organism. R-proteins are important not only for the maintenance and function of ribosome structure, but also for the coordinated process of ribosome biogenesis. Ribosome biogenesis is required to initiate cell growth and division. In *Escherichia coli* cells, the synthesis of new ribosomes begins in the late lag growth phase. The main question in this work is what happens to *E. coli* r-proteins in the lag growth phase? Quantitative mass spectrometry (SILAC) was used to measure the change of quantity of r-proteins in the cell culture proteome. Results showed that r-proteins from stationary growth phase cells are degraded, but not completely. Whether this is a cause of specific degradation of ribosomal proteins or the whole cell proteome remains an open question for further research.

Keywords: *Escherichia coli*, ribosomes, r-proteins, SILAC, lag growth phase

CERCS code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Bakteriaalne ribosoom .....	7
1.1.1. Ribosoomi struktuur .....	7
1.1.2. Ribosoomi funktsioon.....	8
1.2. Ribosomaalsed valgud .....	9
1.3. Ribosoomi biogenees .....	10
1.4. Bakterite kasvufaasid .....	12
1.4.1. Lag-kasvufaas.....	12
1.4.2. Statsionaarne kasvufaas .....	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	16
2.4. Töö eesmärgid .....	16
2.5. Materjal ja meetodika .....	16
2.5.1. Bakteritüvi.....	16
2.5.2. Söötmed .....	16
2.5.3. Kemikaalid .....	17
2.5.4. Seadmed .....	17
2.5.5. Rakkude kasvatamine .....	17
2.5.6. Proovide analüüs kvantitatiivse mass-spektromeetria abil .....	17
2.5.7. Andmete analüüs .....	18
2.5.8. <i>E. coli</i> rakkude lag-kasvufaasi pikkuse määramine.....	18
2.6. Tulemused .....	19
2.6.1. <i>E. coli</i> rakkude lag-kasvufaasi pikkuse määramine.....	19
2.6.2. R-alkude eluiga rakukultuuri proteoomis lag-kasvufaasis .....	23
KOKKUVÕTE .....	29
Summary .....	30
KASUTATUD KIRJANDUS .....	31
LISAD .....	38
LISA 1 .....	38
LISA 2 .....	39
LISA 3.....	40

LISA 4.....	41
LISA 5.....	42
LIHTLITSENTS.....	43

## KASUTATUD LÜHENDID

HPF – *Hibernation Promoting Factor*

MOPS – *3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid*

mRNA – informatsiooni-RNA (*Messenger RNA*)

OD – optiline tihedus (*Optical Density*)

PNPaas – polinukleotiidfosforülaas (*Polynucleotide phosphorylase*)

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

RMF – ribosoomi moduleeriv faktor (*Ribosome Modulation Factor*)

rRNA – ribosomaalne RNA

R-valk – ribosomaalne valk

SILAC – aminohapete märgistamine stabiilsete isotoopidega rakukultuuris (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*)

tRNA – transport-RNA

qMS – kvantitatiivne massispektromeetria

## SISSEJUHATUS

Ribosoom vastutab rakus valkude biosünteesi eest iga elusorganismi puhul. Ribosoom on kõrgmolekulaarne struktuur, mis koosneb valkudest ja RNA-st ning nende vahelistest interaktsioonidest. Bakteriaalsed ribosoomid erinevad eukarüootilistest ribosoomidest oma koosseisu poolest: nad sisaldavad 54 ribosomaalset valku ja kolme rRNA molekuli, mis koos moodustavad kaks ribosoomi alaühikut (suur ja väike). Kahe alaühiku ühinemine viib omakorda ribosoomi funktsionaalse struktuurini bakterirakus.

Ribosomaalsed valgud mängivad ribosoomi biogeneesis võtmerolli, muutes ja stabiliseerides rRNA struktuuri. R-valgud osalevad ribosoomi kokkupanemisel teatud hierarhilises järjestuses, kus iga järgneva valgu sidumine sõltub eelnevatest ühendustest. Lisaks on r-valgud olulised nende endi ekspressiooni reguleerimisel. R-valgud on hästi uuritud bakterite eksponentsiaalse- ja statsionaarse kasvufaasi puhul, kuid mitte lag-kasvufaasi rakkudes.

Lag-kasvufaas on bakterite ettevalmistamise etapp kasvu ja jagunemise alustamiseks soodsate tingimuste korral. Lag-kasvufaasis toimub raku ümberprogrammeerimine, sealhulgas ribosoomi biogeneesi taastamine. Samuti sõltub lag-kasvufaas rakkude eelnevast ajaloost ja statsionaarse kasvufaasi pikkusest.

Töö peamine küsimus on, mis juhtub r-valkudega lag-kasvufaasis? Püstitatud küsimusele vastuse leidmiseks uuriti r-valke *E. coli* MG1655 SILAC rakukultuuri proteoomis kvantitatiivse mass-spektromeetria (SILAC) meetodi abil.

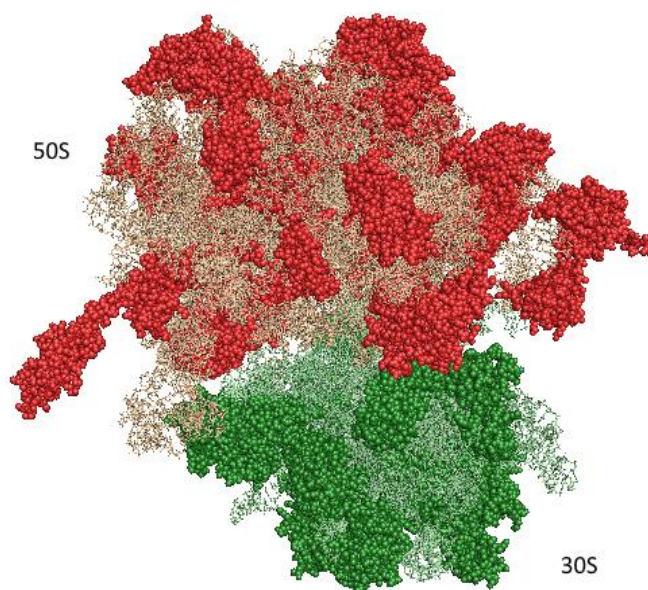
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Bakteriaalne ribosoom

### 1.1.1. Ribosoomi struktuur

Ribosoom on kõrgmolekulaarne struktuur, mis vastutab bakterirakus translatsiooni eest (Watson *et al.*, 2007). *Escherichia coli* ribosoom põhineb kolmel ribosomaalsel RNA (rRNA) molekulil ja 54 erineval ribosomaalsel valgul (r-valgul) (Shoji *et al.*, 2011). rRNA moodustab kaks kolmandikku *E. coli* ribosoomist (Watson *et al.*, 2007). Vaatamata sellele, et r-valkudel on ribosoomis suur arvukus, moodustavad nad ribosoomi massist vaid ühe kolmandikku osa (Watson *et al.*, 2007).

*E. coli* ribosoom (70S) koosneb väikesest alaühikust (30S) ja suurest (50S) alaühikust (vt joonis 1) (Voet *et al.*, 2008). Eeltoodud struktuuride nimetused tulenevad nende sedimentatsiooni koefitsientidest ultratsentrifuugimisel (Voet *et al.*, 2008). 30S ja 50S alaühikute vahelise ühenduse ehk nende assotsieerumise 70S ribosoomiks eest vastutavad 12 erinevat silda RNA-RNA, RNA-valk ning valk-valk interaktsioonide vahendusel (Voet *et al.*, 2008).

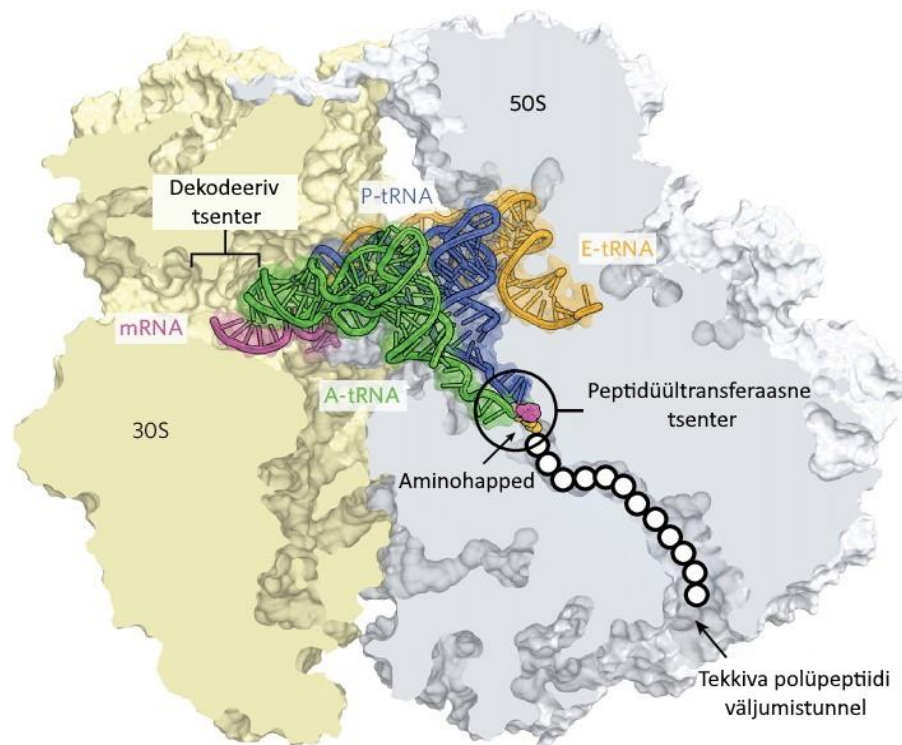


**Joonis 1.** 70S ribosoomi struktuur. Suur alaühik (50S) on esitatud joonisel punase värviga ja väike alaühik (30S) on roheline värviga. Tumede värvidega on kujundatud r-valgud ja heledate värvidega on rRNA molekulid. Joonis on kohandatud kõrgresolutsioonilisest *E. coli* ribosoomi struktuurist PDB andmebaasist (4YBD) (Noeske *et al.*, 2015).

Esmalt vaatleme ribosoomi 50S alaühikut. 50S alaühik koosneb kahest rRNA molekulist (5S rRNA ja 23S rRNA) ja 33 r-valgust, mis on iseloomulikud ainult sellele alaühikule (Watson *et al.*, 2007). Ribosoomi 50S alaühikus asub peptidüültransferaasne tsepter (Watson *et al.*, 2007). 30S alaühik sisaldab ühte 16S rRNA molekuli ja 21 erinevat r-valku (Watson *et al.*, 2007). Üheks väikese alaühiku tähtsusest on mRNA koodonite dekodeerimine (Watson *et al.*, 2007).

### 1.1.2. Ribosoomi funktsioon

Ribosoomi struktuur on määratud valkude moodustamiseks mRNA-st (Cooper, 2000). Ribosoom sisaldab nelja RNA seondumissaiti (Alberts *et al.*, 2002). Neist kolm asuvad A, P ja E saitides, kuhu seondub tRNA (joonis 2) (Alberts *et al.*, 2002). Neljas on mRNA seondumissait, mis asub väikesel alaühikul (Alberts *et al.*, 2002).



**Joonis 2.** Kolm tRNA seondumissaiti 70S ribosoomis (A, P, E). A – aminoatsüülsait (roheline). P – peptidüülsait (sinine). E – väljumissait (kollane). 30S alaühik on esitatud helekollase ja 50S alaühik helesinise värviga. Ribosoomi struktuuril on märgistatud kaks peamist funktsionaalset tsentrit (dekodeeriv ja peptidüültransferaasne tsepter) ning kasvava polüpeptiidi väljumistunnel, kus aminohapped on kujundatud ringidena. Joonis on kohandatud artiklist Sergiev *et al.*, (2018).

Translatsiooniline protsess jaguneb kolmeks peamiseks etapiks: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon, milles osalevad ka mitmed translatsiooni faktorid (Cooper, 2000). Initsiatsiooni etapp algab initsiaatori met-tRNA ja mRNA seondumisega 30S alaühiku dekodeeriva tsentriga (Cooper, 2000). Seejärel seondub 50S alaühik selle kompleksi külge, mille tagajärjel moodustub funktsioneeriv 70S ribosoom (Cooper, 2000). See võimaldab alustada elongatsiooni etappi, millele järgneb polüpeptiidahela pikendamine suure alaühiku peptidüültransferaases tsentris (Cooper, 2000). Polüpeptiidahela sünteesi edasiliikumist soodustavad ribosoomi konformatsioonilised muutused (Alberts *et al.*, 2002). Stoppkoodon mRNA-l määrab elongatsiooni protsessi lõpetamise etapi (Alberts *et al.*, 2002). Lõpetamis- ehk terminatsiooni etapis vabastatakse värskelt sünteesitud polüpeptiidahel ribosoomilt (Alberts *et al.*, 2002).

## 1.2. Ribosomaalsed valgud

Ribosoomi korrapärase toimimise eest vastutavad nii rRNA kui ka r-valgud (Voet *et al.*, 2008). R-valgud jagunevad ribosoomides väikese (S) ja suure (L) alaühiku valkudeks (Voet *et al.*, 2008). R-valgud erinevad teistest RNA-ga otses kontaktis olevatest valkudest mitmete tunnuste järgi (Voet *et al.*, 2008). Nad on rikkad aluseliste aminohapete nagu arginiini ja lüsiini poolest ning sisaldavad vähe aromaatsid jääke (Voet *et al.*, 2008). Keskmiselt varieerub r-valkude suurus 46 kuni 557 aminohappejäägi vahel, sõltuvalt nende rollist ribosoomis (Voet *et al.*, 2008).

Järgnevalt käsitleme üldist r-valgu struktuuri. R-valkude struktuurides eristatakse globulaarseid domeene ning jätkeid (Voet *et al.*, 2008). R-valkude globulaarsed domeenid paiknevad enamasti ribosoomi alaühikute pinnal, samal ajal valkude jätkeid, mis on rikkad arginiiniga ja lüsiiniga, paiknevad alaühikute sees (Voet *et al.*, 2008). R-valkude jätkeid kontakteeruvad rRNA-ga oma positiivselt laetud külghelate kaudu, mis võivad vabalt interakteeruda negatiivselt laetud hapnikuaatomitega rRNA-l (Voet *et al.*, 2008).

Ribosoomis on iga r-valgu jaoks ainult üks koopia, välja arvatud L7/L12 valk (Voet *et al.*, 2008). Uute ribosoomide kokkupanemiseks on vaja hoida valkude stöhhiomeetriat rangelt kontrolli all ning selle tõttu toimub r-valkude sünteesi reguleerimine translatsiooni tasemel (Horton *et al.*, 2002). Samuti r-valkude sünteesile avaldab kaudset mõju ppGpp tase rakus (Burgos *et al.*, 2017). ppGpp - on väike signaalmolekul ehk alarmoon, mis tekib rakkudes nälgimise ja aminohapete puudumise tõttu (Srivatsan ja Wang, 2008). Selle kaudne mõju r-valkude sünteesile toimub läbi rRNA promootorite reguleerimise (Burgos *et al.*, 2017). Kui rakus on palju ppGpp, siis väheneb rRNA transkriptsiooni tase, mis viib vabade r-valkude hulga

suurenemiseni ning seeläbi r-valkude järgneva translatsiooni inhibeerimiseni (Burgos *et al.*, 2017). Vastupidiselt, kui ppGpp ei mõjuta rRNA transkriptsiooni ja rRNA tase rakus on kõrge, püsib ka r-valkude translatsioon kõrgel tasemel (Burgos *et al.*, 2017).

*E. coli* rakus on 13 erinevat operoni, mis sisaldavad r-valke kodeerivaid geene ning lisaks sellele veel 7 geeni paiknevad isoleerituna (Horton *et al.*, 2002). Enamik r-valkude operonidest sisaldab r-valku, mis on tema enda operoni geenide inhibiitor (Horton *et al.*, 2002). Inhibeerimine toimub siis, kui valk liitub enda operoni valmis mRNA-ga (Horton *et al.*, 2002).

R-valkude süntees sõltub ribosoomide kokkupanemise ehk assambleerumise tasemest (Horton *et al.*, 2002). Need valgud, mis vastutavad omaenda autoregulatsiooni eest, on tihedamalt seotud rRNA-ga kui sarnaste saitidega mRNA-l (Horton *et al.*, 2002). Uusi r-valke transleeritakse seni, kuni ribosoomide kokkupanemine püsib kõrgel tasemel ning värskelt sünteesitud valgud on kaasatud uutesse ribosoomidesse (Horton *et al.*, 2002). Arvatakse, et ribosoomide assambleerumise kiiruse vähenemisel suureneb vaba r-valkude hulk rakus ning seetõttu seostuvad inhibeerivad valgud vastavate mRNA-dega, peatades r-valkude sünteesi (Horton *et al.*, 2002). Järgmises peatükis vaatleme ülalmainitud ribosoomide kokkupanemisest lähemalt.

### **1.3. Ribosoomi biogenees**

Prokariootsete ribosoomide biogenees on keeruline, kuid kiire protsess (Davis *et al.*, 2016). Eksponentsiaalses kasvufaasis oleval rakul on ühe ribosoomi sünteesi kiirus 2 minutit (Davis *et al.*, 2016). Lisaks sellele on prokariootne rakk võimeline sünteesima 100 000 ribosoomi tunnis (Davis *et al.*, 2016). Ribosoomi biogenees koosneb paljudest etappidest: rRNA süntees, selle ko-transkriptsiooniline lõhustamine, rRNA transkriptsioonijärgsed modifikatsioonid ja voltimine ning ka kõigi r-valkude süntees, post-translatsioonilised modifikatsioonid, voltimine ja sidumine (Davis ja Williamson, 2017). Ribosoomi biogenees toimub kümnete erinevate faktorite osalusel, mis suunavad protsessi kuni ribosoomi alaühikute küpsuseni (Chen ja Williamson, 2013). Need faktorid takistavad rRNA defektset voltimist (Woodson, 2000), r-valkude enneaegset sidumist ning parandavad r-valkude seostumist (Gulati *et al.*, 2014).

Ribosoomide kokkupanek sõltub raku kasvukiirusest, seega reguleeritakse selle protsessi mitmete mehhanismidega (Davis ja Williamson, 2017). Peamiselt toimub reguleerimine sõltuvalt rRNA sünteesi tasemest (Paul *et al.*, 2004), mis mõjutab ka r-valkude translatsiooni taset rRNA hõivatuse põhjal (Zengel ja Lindahl, 1994).

Ribosoomi biogeneesis mängivad r-valgud olulist rolli, muutes ja stabiliseerides rRNA struktuuri (Davis ja Williamson, 2017). R-valke saab grupeerida nende osalemise järgi ribosoomi alaühikute kokkupanemisel. 1970. aastatel on Nierhaus ja Nomura uurimisrühmad oma katsetes näidanud, et r-valkude seondumine rRNA-ga on hierarhiline ning alaühikute moodustumine toimub termodünaamiliselt soodsal viisil (Shajani *et al.*, 2011). Nende uuringute tulemuste järgi tehti r-valkude klassifikatsioon, kus rRNA-ga esimesena seonduvaid r-valke nimetati primaarseteks (Shajani *et al.*, 2011). Valgud, mille osalemiseks ribosoomi biogeneesis on vaja eelnevate valkude seondumist nimetati sekundaarseteks ja tertsiaarseteks (Shajani *et al.*, 2011). Kuid tänapäeval on teada, et ribosoomi biogeneesi protsess on palju keerukam ning selline r-valkude klassifikatsioon enam ei toimi.

Ühed varajastest suure alaühiku kokkupanemisel osalevatest r-valkudest on L24, L20, L4, L2, L3, L17 ning nad seonduvad otse 23S rRNA-ga (Herold ja Nierhaus, 1987). L24 ja L3 valgud on tähtsamaid 50S alaühiku kokkupanemise alustamises (Herold ja Nierhaus, 1987). Väikese alaühiku varajasteks r-valkudest on S4, S7, S8, S15, S17, S20 valgud, mis seonduvad otse 16S rRNA-ga (Mizushima ja Nomura, 1970). On tähelepanuväärne, et on olemas valgud, mis on vajalikud vahepealsteks seondumisteks, kuid millel pole järgmistes etappides ribosoomide kokkupanemisel funktsiooni (Shajani *et al.*, 2011). Sellisteks on näiteks S16 ja S18 valgud (Held ja Nomura, 1975) ning L20 ja L24 valgud (Spillmann ja Nierhaus, 1978).

Hilisemad uuringud selles teemas näitavad, et ribosoomi alaühikute kokkupanemiseks on olemas lisaks peamistele kokkupanemisaradadele ka paralleelsed teed (Davis *et al.*, 2016). Kõigi komponentide juuresolekul kulgeb alaühikute kokkupanemine kõige kiiremat ja järjestikust rada, st peamist rada (Davis ja Williamson, 2017). Paralleelsed rajad on aeglasemad, kuid need on vajalikud mõne ribosomaalse valgu või biogeneesi faktori puudumisel (Davis ja Williamson, 2017). Samuti nad on vajalikud rRNA ebanormaalsel voltimisel ning stressitingimustel keskkonna poolt, olles raku kaitsesüsteemiks (Davis ja Williamson, 2017). Ribosomaalsete valkude puudumise tõttu võib kokkupanemine toimuda samaaegselt paljude paralleelsete radade kaudu, mis viib erineva koostisega vaheühendite kuhjumiseni (Sykes *et al.*, 2010). Sellised vaheühendid on võimelised küpsema 50S ja 30S alaühikuteks (Sykes *et al.*, 2010). Kuid vaatamata sellele mõjutab teatud r-valkude puudumine ribosoomide funktsioneerimist ja raku kasvu kiirust (Shajani *et al.*, 2011). Näiteks rakud, millel puudub S20 r-valgu geen, on elujõulised, kuid neil puudub võime moodustada täiel määral 70S ribosoomi (Tobin *et al.*, 2010).

Suure alaühiku r-valkude deletsioonide näideteks on L25 ja L27 valkude geenide puudumine. Rakud, millel puudub võime L25 valku sünteesida, on elujõulised, kuid nende kasv on aeglastatud (Korepanov *et al.*, 2007). L27 valgu puudumisel toimuvad rakkudes tõsisemad tagajärjed, näiteks on probleemid 50S alaühiku kokkupanemisel (Wower *et al.*, 1998). Sel juhul akumulatsioonid vaheühendid, mis ei ole võimelised valmima 50S alaühikuteks (Wower *et al.*, 1998). Kõik see tugevalt mõjutab bakterite kasvu (Wower *et al.*, 1998).

Veel üheks näideks on S15 geeni deletsioon, mis on primaarne 16S rRNA-d siduv valk 30S alaühikus ning on tähtis S6, S18, S11 ja S21 r-valkude edasiseks seondumiseks (Bubunenko *et al.*, 2006). *E. coli* tüvi, milles puudub r-valk S15, on võimeline moodustama 30S alaühikuid, kuid rakkudel on aeglastatud kasv ja nad on tundlikud külma suhtes (Bubunenko *et al.*, 2006).

#### **1.4. Bakterite kasvufaasid**

Bakterite elutsüklil jaguneb teatud etappideks: lag-, log-, statsionaarne-, surmafaas ning pikendatud statsionaarne kasvufaas (Prossliner *et al.*, 2018). Need kasvufaasid kehtivad laboritingimustel kasvatatud bakterikultuuride korral (Prossliner *et al.*, 2018). Looduses viibivad bakterid enamik ajast pikendatud statsionaarses kasvufaasis, olles puhkeseisundis (Prossliner *et al.*, 2018). Järgmisena käsitleme lag-kasvufaasi ja statsionaarset kasvufaasi, mis on tähtsamaid selles töös.

##### **1.4.1. Lag-kasvufaas**

Lag-kasvufaas on bakterite elu osa, kus ei toimu rakkude jagunemist (Madar *et al.*, 2013). Bakterid sisenevad lag-kasvufaasi, kui puhkeseisundis rakke viiakse värskesse söötmesse (Pin *et al.*, 2009). Selles kasvufaasis kulgeb eriline bioloogiline protsess, kus bakterite füsioloogia kohaneb uute tingimustega (Madar *et al.*, 2013) ning valmistub edaspidiseks eksponentsiaalseks kasvuks (Hamill *et al.*, 2020).

Lag-kasvufaas jaguneb varajaseks ja hiliseks faasiks (Madar *et al.*, 2013). Varajane lag-kasvufaas või nn rakkude adapteerumise periood (McKellar ja Knight, 2000) on aeg bakterikultuuri inokuleerimisest kuni biomassi kasvu alguseni (Madar *et al.*, 2013). Hiline lag-kasvufaas jääb varajase faasi lõpu ja raku jagunemise alguse vahele (Madar *et al.*, 2013). Üksikute rakkude vahel leiti varajase ja hilise lag-kasvufaasi kestvustes stohhastiline erinevus (Métris *et al.*, 2005). Üks selle variatsiooni võimalikest põhjustest on ensüümide taseme juhuslik muutus rakus (Madar *et al.*, 2013).

Keskkonnatingimused ja raku elutsükkel võivad määrata raku adaptatsiooni kiirust, seal hulgas ka lag-kasvufaasi pikkust (Hamill *et al.*, 2020). Näiteks, statsionaarsest kasvufaasist spetsiifilise süsinikuallikaga keskkonda (näiteks arabinoos) sattudes hakkab rakk investeerima peamiselt selle süsinikuallika metabolismi geenide produktide tootmisele (Madar *et al.*, 2013). Sel juhul pikeneb varajane lag-kasvufaas (Madar *et al.*, 2013). Alles pärast spetsiifilise süsinikuallika metaboliseerimist aminohapete piisava koguse juures aktiveeritakse ribosoomi geenid (Madar *et al.*, 2013). Väidetavalt toimub ribosoomide tootmise kontroll ppGpp-ga hilises lag-kasvufaasis (Madar *et al.*, 2013). Kui statsionaarse kasvufaasi rakkudes on piisavalt glükoosikasutuse ensüüme, siis jäetakse varajane lag-kasvufaas vahele ja kohe pärast inokuleerimist algab hiline lag-kasvufaas ribosomaalsete geenipromootorite samaaegse aktiveerimisega (Madar *et al.*, 2013). On teada, et lisaks glükoosile on ka teisi suhkruid, mille juures rakud jätvavad varajase lag-kasvufaasi vahele (Madar *et al.*, 2013).

Seega ei sõltu lag-kasvufaasi pikkuse varieeruvus mitte ainult käesolevast keskkonnast, vaid ka rakkude varasemast ajaloost (D'Arrigo *et al.*, 2006). Näiteks pikka aega statsionaarses kasvufaasis enne inokuleerimist olnud rakud vajavad jagunemise alustamiseks ka pikemat ettevalmistust (Pin ja Baranyi, 2008). See tähendab, et vanade (hilisest statsionaarsest kasvufaasist) rakkude lag-kasvufaas kestab kauem aega, kui nooremate (varajasest statsionaarsest kasvufaasist) rakkude oma (Pin ja Baranyi, 2008). Lisaks on vanade rakkude lag-kasvufaas vähem efektiivne geeniespressiooni poolest (Pin *et al.*, 2009). Erinevalt noortest rakkudest surutakse vanade rakkude lag-kasvufaasis enamik olulisi ainevahetuse geene maha, sealhulgas aeroobse hingamise geenid (Pin *et al.*, 2009). Samuti translatsioonil ja ribosoomi biogeneesis vajalike geenide ekspressioon on kõrgel tasemel ainult noortel rakkudel (Pin *et al.*, 2009). Seal hulgas on ribosoomi alaühikute sünteesis osalevate valkude geenid, RNA protsessingus vajalike ribonukleaaside geenid ning tRNA aminoatsüülimise faktorite geenid (Pin *et al.*, 2009). Vanades rakkudes need geenid lag-kasvufaasis ei ekspresseeru (Pin *et al.*, 2009).

### 1.4.2. Statsionaarne kasvufaas

Bakterite eksponentsiaalsele kasvufaasile järgneb statsionaarne kasvufaas (Chubukov ja Sauer, 2014). Statsionaarne kasvufaas algab toitainete puuduse tagajärjel, mis negatiivselt mõjutab rakkude kasvu (Chubukov ja Sauer, 2014). Eksogeense süsiniku puudumise korral kestab *E. coli* paljunemisvõime veel 3–5 päeva, mille järel rakud enam ei pooldu (Fredriksson ja Nyström, 2006). Pikem statsionaarne kasvufaas viib kasvu heterogeensema rakukultuurini ja selle ebahühtlase taastamiseni paremate tingimuste korral (Jöers ja Tenson, 2016). Heterogeense bakteripopulatsiooni teke toimub statsionaarsele kasvufaasile iseloomulike sagedaste mutatsioonide tõttu (Chubukov ja Sauer, 2014). Sellises populatsioonis mõned rakud kasvavad ja paljunevad, teised aga jäävad puhkeseisundis, oodates potentsiaalset võimalust oma kasvu taastamiseks (Jöers ja Tenson, 2016). See aitab säilitada bakteripopulatsiooni erinevates tingimustes (Jöers ja Tenson, 2016). Statsionaarses kasvufaasis muutub ka bakterite füsioloogia ja morfoloogia (Nyström, 2004). Näiteks väheneb rakkude suurus makromolekulaarse sünteesi lakkamise ja käimasoleva rakujagunemise tõttu (Nyström, 2004).

Statsionaarset kasvufaasi iseloomustab translatsioonitäpsuse vähenemine, kuna toitainete näljamise korral tunnevad ribosoomid puudust aminohapetega laetud tRNA-des (Nyström, 2004). Ebatäpne translatsioon viib suurenenud ebakorrapärase struktuuriga valkude tasemele (Nyström, 2004). Selliseid valke karbonüülitakse, mille tagajärjel muutuvad nad vastuvõtlikuks proteolüüsile (Nyström, 2004). Proteolüüsi käigus lagundatakse valke aminohapeteks (Nyström, 2004). Kui rakud sisenevad statsionaarsesse kasvufaasi, peatub eksogeense süsiniku puudumise tõttu enamik makromolekulaarseid sünteesi (Nyström, 2004). Ning arvatakse, et üks bakterite ellujäämise mehhanisme on peptidaasist sõltuv autofagia, mis kasutab oma valkude proteolüüsi aminohapete tootmises (Nyström, 2004). See tagab *de novo* valkude sünteesi statsionaarses kasvufaasis, andes vajalikke aminohappeid (Nyström, 2004).

Kuid rakuliste komponentide lagundamine ja nende kasutamine statsionaarses kasvufaasis pole bakterite ainus viis ellu jääda (Yoshida *et al.*, 2019). Toitainete ja energia puuduse korral langeb genoomi ekspressioonitase 10 protsendini eksponentsiaalse kasvufaasi tasemest (Yoshida *et al.*, 2019) ning eksponentsiaalse kasvu geenide ekspressioon asendatakse statsionaarsele kasvufaasile iseloomulike geenide aktiveerimisega (Yoshida *et al.*, 2018). Geeniekspressiooni globaalse muutuse teostamiseks korraldatakse transkriptsiooni ja translatsiooni aparaadid ümber (Yoshida *et al.*, 2019). Kõigepealt peatatakse nende tootmine ning liigne transkriptsiooni- ja translatsiooniparaat muudetakse mittefunktsionaalseteks konformatsioonideks (Yoshida *et al.*, 2018).

Toitainete puudumisel tõuseb rakus ppGpp tase, mis muudab transkriptsiooni tasemel sigmafaktori rpoS võimeliseks seonduda RNA polümeraasiga (Nyström, 2004). Samal ajal teiste sigmafaktorite seondumise võimalus väheneb, sealhulgas kasvu eest vastutava sigmafaktori rpoD seondumine (Nyström, 2004). Stasionaarses kasvufaasis rpoD vähenenud seondumine RNA polümeraasiga negatiivselt mõjutab 50% võrra r-valkude ja translatsiooni faktorite tootmist (Nyström, 2004). Kuid osaline ekspressioon rpoD poolt võimaldab rakkudel paremate tingimuste korral kiiresti taastuda (Nyström, 2004). Sigmafaktor rpoS käivitab geenide programmi rakkude püsiseisundi tagamiseks ja kiireks taastumiseks soodsate tingimuste korral (Chubukov ja Sauer, 2014).

Translatsiooni tasemel dimeriseeruvad 70S ribosoomid 100S ribosoomideks RMF (*Ribosome Modulation Factor*) ja HPF (*Hibernation Promoting Factor*) valkude abil (Yoshida *et al.*, 2019). RMF ja HPF on statsionaarsele kasvufaasile iseloomulikud valgud (Yoshida *et al.*, 2019). 100S konformatsioon kaitseb ribosoomi enneaegse lagunemise eest, takistades dissotsieerumist vabadeks ribosoomi komponentideks (Prossliner *et al.*, 2018). Samas on näidatud, et varajase statsionaarse kasvufaasi rakukultuuri viimine värskesse söötmesse toob kõikide 100S ribosoomide lagunemiseni tagasi 70S ribosoomideks, mis võimaldab rakul kiiresti log-kasvufaasi alustada ja kasvu taastada (Prossliner *et al.*, 2018). Kuid pikema statsionaarse kasvufaasi korral ei toimu rmf ekspressiooni (Arunasri *et al.*, 2014) ja umbes 4-6 päeva pärast statsionaarse kasvufaasi algust vabaneb RMF 100S-dest, mille järel toimub dissotsieerumine 70S ribosoomideks (Prossliner *et al.*, 2018). Seejärel toimub ribosoomide dissotsieerumine vabadeks alaühikuteks ning lagunemine RNA- ja valgukomponentideks (Prossliner *et al.*, 2018). Lõpuks väheneb rakkude elujõulisus alla 10% (Wada, 1998).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.4. Töö eesmärgid

Käesoleva töö küsimuseks on, mis juhtub *E. coli* r-valkudega lag-kasvufaasis? Vastuse leidmiseks püstitati järgmiseid eesmärke:

1. Selgitada välja *E. coli* rakkude lag-kasvufaasi pikkus sõltuvalt statsionaarse kasvufaasi pikkusest.
2. Kvantifitseerida *E. coli* ribosomaalsete valkude koguse muutust lag-kasvufaasi käigus.
3. Teha kindlaks, kas lag-kasvufaasis statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valke lagundatakse või kasutatakse uute ribosoomide kokkupanemisel.

### 2.5. Materjal ja meetodika

#### 2.5.1. Bakteritüvi

Selles töös kasutati eelnevalt meie laboris konstrueeritud *Escherichia coli* MG1655 SILAC (*F*- $\lambda$ -, *rph-1*,  $\Delta$ *lysA*,  $\Delta$ *argA*) tüve.

#### 2.5.2. Söötmed

Luria-Bertani (LB) sööde – 0,5% NaCl; 1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 1,5% agar (Bertani, 1951).

MOPS sööde – 1x MOPS soolad; 1,32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 mg/ml iga aminohape; 0,2% glükoos, 0,2 µg/ml tiamiin (Neidhardt et al., 1974).

“Kerge” MOPS sööde – sisaldab märgistamata arginiini (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) ja lüsiini (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Käesolevas töös nimetatakse neid aminohappeid “kergeteks”.

“Raske” MOPS sööde – sisaldab raske isotoopmärkega arginiini ([<sup>13</sup>C]<sub>6</sub>H<sub>14</sub>[<sup>15</sup>N]<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) ja lüsiini ([<sup>13</sup>C]<sub>6</sub>H<sub>14</sub>[<sup>15</sup>N]<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Käesolevas töös nimetatakse neid aminohappeid “rasketeks”.

### 2.5.3. Kemikaalid

Arginiin ( $[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$ ) (Silantes); lüsiin ( $[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$ ) (Silantes); kerged aminohapped (AppliChem); MOPS soolad (AppliChem); glükoos (Cargill); tiamiin (laboristokk).

### 2.5.4. Seadmed

- Spektrofotomeeter Eppendorf BioPhotometer UV/Vis;
- Lauatsentrifuug Hettich Rotina 420;
- Loksuti INFORS HT multitron;
- Mikroplaadilugeja POLARstar Omega.

### 2.5.5. Rakkude kasvatamine

*Escherichia coli* MG1655 SILAC tüvi külvati LB-tassidele kahes bioloogilises korduses ning inkubeeriti üleöö 37°C juures. Rakud külvati värskesse MOPS söötmesse ("raske") ning pandi kasvama loksutile 16 päevaks (37°C, 180 rpm).

Võeti hilise statsionaarse kasvufaasini (16 päeva) kasvatatud rakukultuur ning tehti lahjenduskülv algtihedusega ( $\text{OD}_{600} = 0,08$ ) värskesse MOPS söötmesse. Rakke kasvatati 37°C juures loksutil (180 rpm). Rakke kasvatati 0 min (võeti otse statsionaarse kasvufaasi rakukultuurist), 80, 160 ning 240 minutit ning igast ajapunktist koguti rakud. Proovide maha võtmisel segati rakukultuur 1:1 jääga ning fuugiti põhja (4754 g, 15 min, 4°C) Hettich Rotina 420 lauatsentrifuugiga. Sööde aspereeriti ning rakusade pesti 1X OV-10 lahusega. Rakud hoiustati -80°C juures.

### 2.5.6. Proovide analüüs kvantitatiivse mass-spektromeetria abil

Proovide massispektromeetrist analüüsi viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogia instituudi proteoomika tuumiklabori poolt. Rakud lüüsi ning segati kokku standardiga (puhastatud 70S ribosoomid) 24:1 suhtes (mass). Standard oli Kaspar Reier poolt puhastatud 70S ribosoomid *E. coli* MG1655 SILAC tüvest ( $\text{OD}_{600} \sim 2.0$ ).

### 2.5.7. Andmete analüüs

Saadud qMS andmed analüüsiti järgmise tarkvara abil: MSconvert (ProteoWizard 3.0.10328), Mascot Daemon (v.2.5.1) ja Skyline (v3.6). Kõigepealt filtreeriti .mgf-failid *MSconverti* programmi abil 100 kõige intensiivsema piigi leidmiseks, seejärel otsiti nende identifitseerimise programmi *Mascot* abil *Uniprot E. coli MG1655 K-12* andmebaasi (04.24.2019) ja levinud kontaminantide andmebaasi vastu (koostatud Max Plancki Biokeemia Instituudi poolt, Martinsried).

Otsingus kasutati järgmisi parameetreid: peptiidi m/z hälve  $\pm 7$  ppm; MS/MS massi hälve  $\pm 0.6$  Da; fikseeritud modifikatsiooniks oli tsüsteiini karbamidometülatatsioon ja varieeruvateks modifikatsioonideks olid arginiin ( $\text{Arg6} - [^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$  ja  $\text{Arg10} - [^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$ ) ja lüsiin ( $\text{Lys4} - \text{C}_6\text{H}_{10}[^2\text{H}]_4\text{N}_2\text{O}_2$  ja  $\text{Lys8} - [^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$ ) ning metioniini oksüdatsioon. Identifitseeritud peptiide kvantifitseeriti kasutades *Skyline* programmi järgmiste parameetritega: peptiidide pikkus 5 kuni 25 aminohapet. Peptiide, mis sisaldasid metioniini jäeti andmete töötlemisel välja. Peptiide, mis sisaldasid endas raskeid arginiini ( $[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_4\text{O}_2$ ) või lüsiini ( $[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}[^{15}\text{N}]_2\text{O}_2$ ) märgistati H tähega (ingl.k *heavy*). Peptiide, mis sisaldasid kergeid arginiini ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ ) või lüsiini ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ ) märgistati L tähega (ingl. k *light*). Standardist pärit peptiide, mis sisaldasid keskmiseid arginiini ( $[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ ) või lüsiini ( $\text{C}_6\text{H}_{10}[^2\text{H}]_4\text{N}_2\text{O}_2$ ) märgistati M tähega (ingl. k *medium*). Iga peptiidi jaoks arvutati välja L/M ja H/M suhted. R-valkude H/M ja L/M suhted leiti arvutades unikaalsete peptiide keskmiseid.

Väärtuste normaliseerimiseks kasutati lag-kasvufaasi pikkuse määramise katse tulemusi kolme bioloogilise replikaadi kohta. Esimesena arvutati kui palju erinevad rakukultuuri OD<sub>580</sub> väärtused (80 min, 160 min ja 240 min) 0 minuti OD<sub>580</sub> väärtusest. Seejärel arvutati mediaan kolme bioloogilise korduse vahel. Saadi erinevaid kordajaid 0, 80, 160 ning 240 minuti jaoks. Viimasena korrutati läbi kordajaga vastavatest ajapunktidest r-valkude H/M ning L/M suhted.

### 2.5.8. *E. coli* rakkude lag-kasvufaasi pikkuse määramine

*E. coli* MG1655 SILAC tüve külvati kolmes bioloogilises korduses (K92, K93, K95) LB-tassidele ja kasvatati üleöö (37°C). Üleöö kultuuri külvati ümber värskesse MOPS söötmesse ("kerge") ning pandi loksutile (37°C, 180 rpm) kuni statsionaarse kasvufaasi jõudmiseni. Tehti esimene 1000x lahjenduskülv värskesse MOPS söötmesse ning kasvatati (37°C, 180 rpm) statsionaarse kasvufaasini. Lahjendust ja kasvatust korrati samadel tingimustel. Rakud külvati

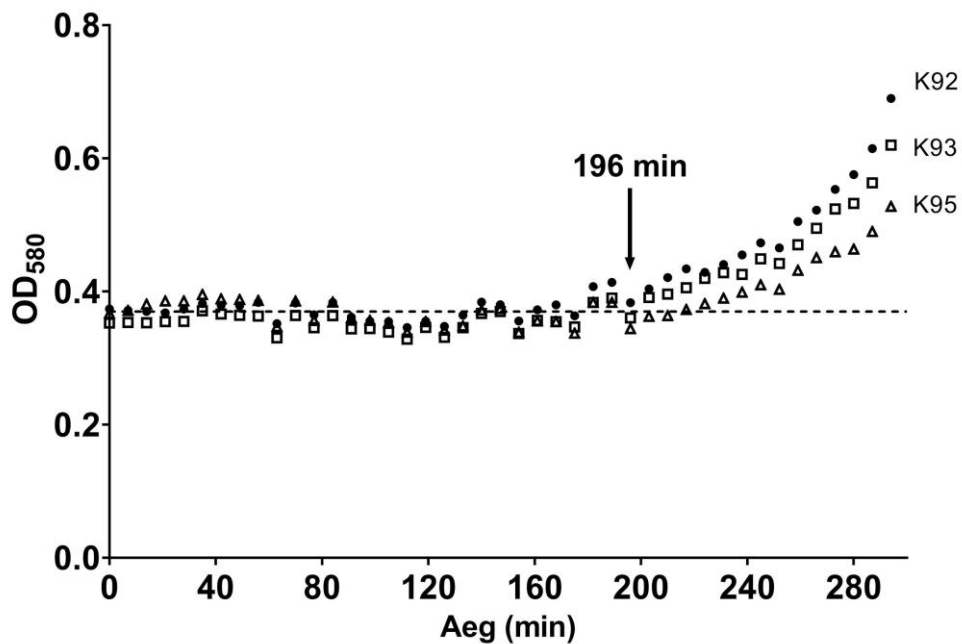
värskesse MOPS söötmesse algse rakukultuuri tihedusega ( $OD_{600} = 0,02$ ) ning kasvatati loksutil 16 päeva ( $37^{\circ}\text{C}$ , 180 rpm).

1., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. ja 16 päeval võeti ~1 ml rakukultuuri, mõõdeti selle  $OD_{600}$  ning tehti vahelahjendused. Seejärel tehti rakukultuurist lahjendusi mikrotiiterplaadile algtihedusega ( $OD_{600} = 0,08$ ). Rakukultuuri kasvatati mikrotiiteplaadil PolarSTAR Omega masinas ( $37^{\circ}\text{C}$ , 500 rpm) üleöö, kus iga 7 minuti tagant toimus optilise tiheduse mõõtmine.

## **2.6. Tulemused**

### **2.6.1. *E. coli* rakkude lag-kasvufaasi pikkuse määramine**

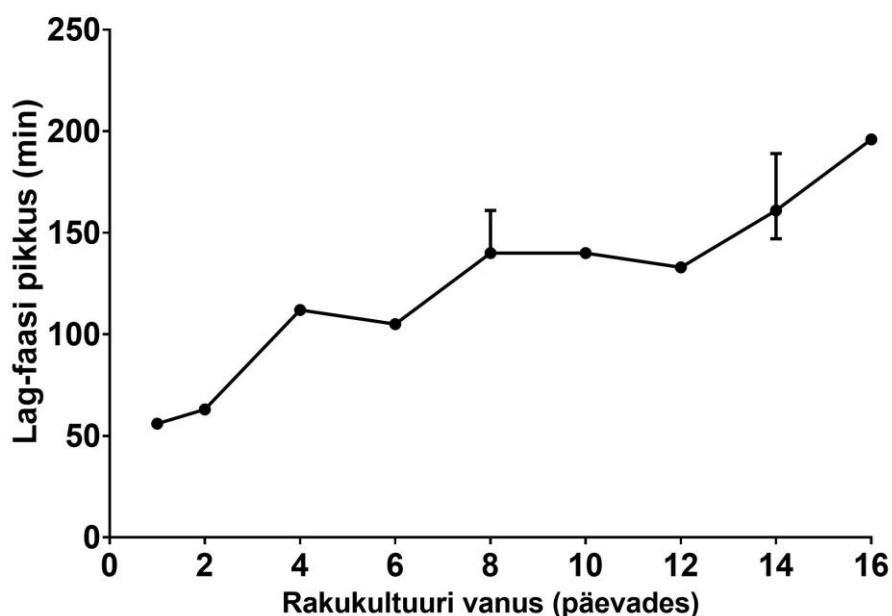
Katse eesmärgiks oli vaja teada saada lag-kasvufaasi pikkuse sõltuvalt statsionaarse kasvufaasi pikkusest. Selle jaoks kasvatati *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kolmes bioloogilises korduses “kerges” MOPS söötmes 16 päeva. Kasvatavast rakukultuurist võeti proovid 1., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 16 päeva järel. Pärast seda kasvatati rakukultuuri proovid mikrotiiterplaatidel algse optilise tihedusega ( $OD_{600} = 0,08$ ) üleöö. Saadi optilise tiheduse mõõtmised, mille alusel koostati kasvukõverad erineva statsionaarse kasvufaasi pikkusega rakukultuuri jaoks (joonis 3, lisa 1 ja 2). Lag-kasvufaasi pikkuse määramiseks arvutati kolme bioloogilise korduse jaoks esimese tunni mõõtmispunktidest ( $OD_{580}$ ) keskmine, mille järgi tõmmati graafikule sirgjoon, mis iseloomustab lag-kasvufaasi OD. Punktis, kus ilmnes sirgjoonest kõrvalekalle, määrati lag-kasvufaasi lõpp. Näidisenäidena toodi välja 16. päeva rakukultuuri kasvukõver (joonis 3).



**Joonis 3.** 16-päevase rakukultuuri lag-kasvufaasi pikkus. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva MOPS söötmes. Iga kahe päeva järel võeti rakukultuuri proov, millest tehti ümberkülv ( $OD_{600} = 0,08$ ) mikrotiiterplaadile ning kasvatati üleöö. Katset tehti kolmes bioloogilises korduses. Mõõdetud  $OD_{580}$  esitati graafikul punktidenä. Esimeste 60 minuti punktide ning kolme bioloogilise korduse vahel võeti keskmine ning esitati joonisel punktiirjoonega. Lag-kasvufaasi lõpp määrati visuaalselt kohas, kus on kõrvalekalle punktiirjoonest. Joonise y-teljel on esitatud  $OD_{580}$  ning x-teljel on aeg minutites.

Tulemus jooniselt 3 näitab, et 16 päeva kasvanud rakukultuuri lag-kasvufaasi pikkus on 196 minutit kõigi bioloogiliste korduste puhul. Märkimisväärne on see, et lag-kasvufaasis püsinud ühel joonel rakukultuurid lahknesid edaspidi eksponentsiaalses kasvufaasis erinevalt. Täheldatud varieeruvus kolme erineva bakterikoloonia vahel pärast lag-kasvufaasist väljumist võib olla tingitud erinevatest teguritest. Näiteks selle põhjuseks võib olla metaboolne heterogeensus (Nikolic *et al.*, 2013), stohhastiline geeniekspressioon (Elowitz *et al.*, 2002) ning asümmeetriline jaotus rakkude jagunemise käigus (Tonn *et al.*, 2019). Samuti võisid tekkida geneetilised erinevused läbi toimunud mutageneesi rakkude säilitamise ja kasvatamise ajal (Nahku *et al.*, 2011). Kõik ülaltoodud tegurid võivad põhjustada fenotüübilisi erinevusi, sealhulgas erinevusi kasvukiiruses *E. coli* tüvede alampopulatsioonide vahel (Tonn *et al.*, 2019). Fenotüübilise mitmekesisuse tekitamise võime annab bakteritele võimaluse kohaneda erinevate keskkonna kõikumistega (Saint-Ruf *et al.*, 2014).

Järgmisena leiti sõltuvus kahe kasvufaasi vahel kasutades määratud lag-kasvufaasi pikkused erineva statsionaarse kasvufaasi pikkusega rakukultuuri puhul (joonis 4). Kolme bioloogilise korduse vahel võeti mediaan ning väärtuste vahemik.



**Joonis 4.** Lag-kasvufaasi pikkuse muutus sõltuvalt statsionaarse kasvufaasi kestvusest. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva MOPS söötmes. Iga kahe päeva järel võeti rakukultuuri proov, millest tehti ümberkülv ( $OD_{600} = 0,08$ ) mikrotiiterplaadile ning kasvatati üleöö. Joonis koostati eelnevalt leitud erineva statsionaarse kasvufaasi pikkusega rakukultuuri lag-kasvufaasi kestvuste järgi. Joonise x-teljel on esitatud statsionaarse kasvufaasi rakukultuuri vanus päevades ja y-teljel on lag-kasvufaasi pikkus minutites. Joonisel esitati kolme bioloogilise korduse vahel mediaan ning väärtuste vahemik.

Tulemused näitavad (joonis 4), et statsionaarse kasvufaasi pikkuse ja sellele järgneva lag-kasvufaasi vahel on kindel seos: mida kauem on rakud kasvanud statsionaarses kasvufaasis, seda pikem on nende lag-kasvufaas pärast inokuleerimist värskesse söötmesse.

Oma taastumispotentsiaali säilitamiseks muutub statsionaarse kasvufaasi rakkudel toitainete puuduse mõjul morfoloogia, füsioloogia (Zhu *et al.*, 2020) ja genoomi ekspressioon (Arunasri *et al.*, 2014), ning tõenäoliselt, mida pikem on rakukultuuri statsionaarne kasvufaas, seda rohkem seda muutust on rakkudes.

Varasemates uuringutes on näidatud, et hilise statsionaarse kasvufaasi rakud vajavad kauem aega lag-kasvufaasis kasvu taastamiseks (Pin ja Baranyi, 2008) ning geeniekspressiooni ümberprogrammeerimiseks (Pin *et al.*, 2009). Võrreldes lühema statsionaarse kasvufaasi rakkudega erineb lag-kasvufaasis hilisema statsionaarse kasvufaasi rakkude geeniekspressioon. Näiteks varajase statsionaarse kasvufaasi (1 päev) rakkude puhul ekspresseeruvad ribosoomi biosünteesiks vajalikud geenid lag-kasvufaasis kiiremini, kui hilise statsionaarse kasvufaasi (16 päeva) rakkudes. Ribosoomide biogenees on üks olulisemaid protsesse, mida vajab rakk kasvu alustamiseks ning jagunemiseks. Seega, mida kauem on rakud statsionaarses kasvufaasis, seda pikem on nende lag-kasvufaas ja see võib tuleneda ribosoomi biogeneesis vajalikke geenide inhibitsioonist.

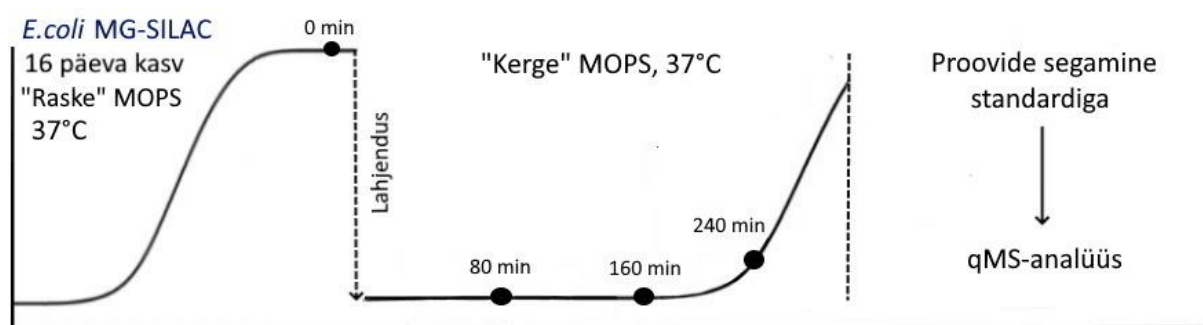
Varajase statsionaarse kasvufaasi rakkude lühem kasvufaas võib tuleneda mitte ainult ekspresseeritud biogeneesi geenidest lag-kasvufaasis kui ka sellest, et statsionaarse kasvufaasi alguses hoiustatakse 70S ribosoomi 100S konformatsioonides (Prossliner *et al.*, 2018). 100S konformatsioon kaitseb 70S ribosoomi lagundamise eest varajases statsionaarses kasvufaasis ning on võimeline rakkude värskesse söötmesse inokuleerimisel laguneda tagasi 70S ribosoomideks (Prossliner *et al.*, 2018). See võib põhjustada rakkude kasvu ja jagunemise kiiret taastumist lag-kasvufaasis.

Samal ajal on näha platood 8 – 12-päevase rakukultuuri puhul (joonis 3), mis tähendab, et selles ajavahemikus oleval rakukultuuril ei pikene lag-kasvufaas pärast inokuleerimist. Kuid 12. päeva pärast taastub tendents hilise statsionaarse kasvufaasi rakkude puhul lag-kasvufaasi pikendamiseks. Põhjuseks, miks lag-kasvufaas ei pikene selles perioodis võib olla tingitud sellest, et rakud on võimelised uuesti jagunema statsionaarse kasvufaasi 8 – 12 päeval. Rakud võivad taastada jagunemise, näiteks, pärast toimunud rakkude surmefaasi (Finkel, 2006). Bakteripopulatsioon on heterogeenne suuremise suhtes, mis tähendab, et suurenenud oksüdatiivse stressi korral programmeeritakse osa rakkudest surmaks tagamaks ülejäänud rakkude ellu jäämist (Finkel, 2006). Need rakud saavad kataboliseerida surnud rakkude jääke, sealhulgas valkude aminohappeid, rakumembraani lipiide, süsivesikuid jne, mis aitab neil ellu jääda toitainete puudumise tingimustes statsionaarses kasvufaasis (Finkel, 2006).

## 2.6.2. R-valkude eluiga rakukultuuri proteoomis lag-kasvufaasis

Selleks, et jälgida statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude muutust lag-kasvufaasis, kasutati ühte kaasaegsatest kvantitatiivse proteoomika meetoditest – SILAC (Ong *et al.*, 2002). SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) on massispektromeetriline meetod, mis põhineb mitteradioaktiivsete isotoopidega aminohapete märgistamisel. Märgistatud aminohapped erinevad oma molekulmassi poolest looduses levinutest, mis võimaldab eristada neid sisaldavaid peptiide massispektromeetria abil. Selles töös kasutati meetodites kirjeldatud auksotroofset tüve, mis ei sünteesi *de novo* arginiini ja lüsiini. Auksotroofsete mutantide vajadus seisneb selles, et nad on võimelised kasutama aminohappeid ainult väliskeskkonnast ning selle meetodi abil võib muuta valkude märgistust, manipuleerides söötme koostisega.

Selles töös kasutati meie laboris enim konstrueeritud *Escherichia coli MG1655* SILAC tüve. Rakke kasvatati 16 päeva "raskes" MOPS söötmes. Statsionaarse kasvufaasi 16. päeval oli rakkude optiline tihedus  $OD_{600} = 2,54$ . Seejärel rakke inokuleeriti värskesse "kergesse" MOPS söötmesse, kus algne rakutihedus oli  $OD_{600} = 0,08$ . Rakke kasvatati 80, 160 ja 240 minutit ning igas ajapunktis koguti rakud. Lisaks sellele võeti 0 minuti proov, kus koguti rakud 16-päevasest rakukultuurist. Seejärel rakud lüüsi ja segati standardiga, milleks olid eelnevalt meie laboris eraldatud keskmiselt märgistatud 70S ribosoomid. Ribosoomid eraldati *E. coli MG1655* SILAC rakkudest, mida kasvatati „keskmises“ MOPS söötmes. Seejärel saadeti proovid qMS analüüsi. Ülalkirjeldatud katse etappe näidati skeemina joonisel 5.

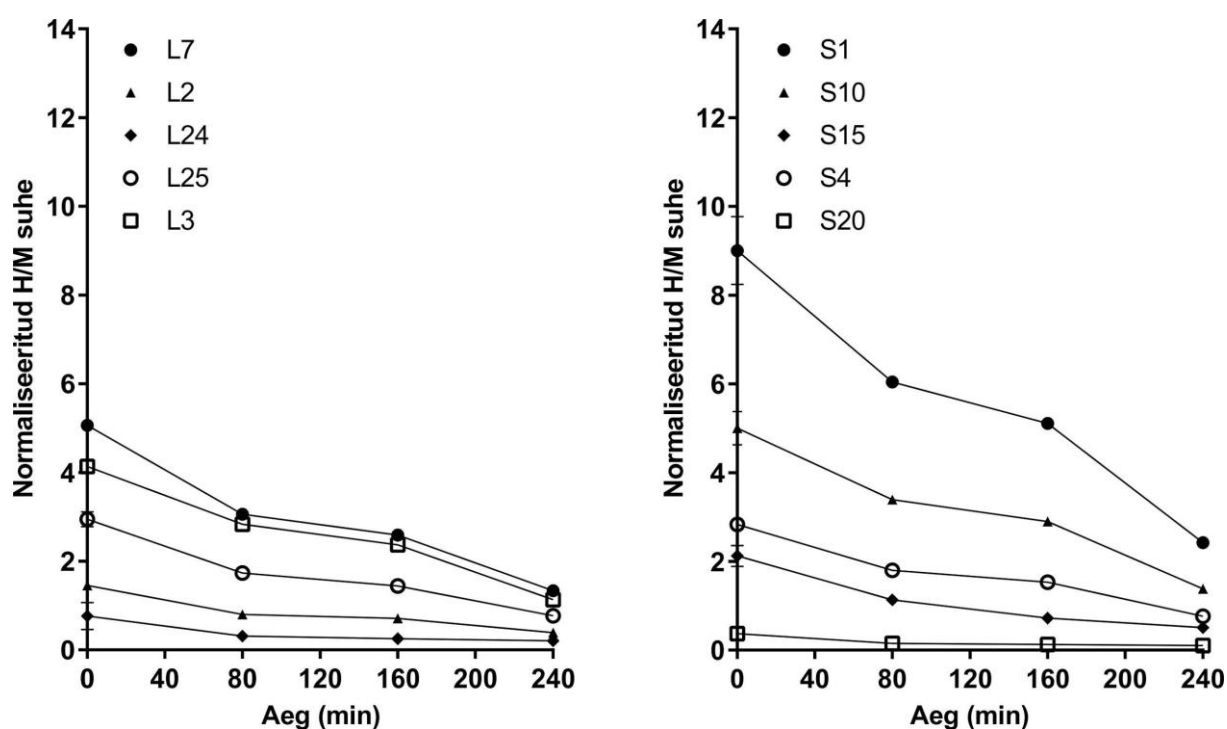


**Joonis 5.** Katse ülesehitus. Katse koosneb järgmistest etappidest: rakkude kasvatamine hilisesse statsionaarsesse kasvufaasi, bakterikultuuri ülekandmine värskesse söötmesse, kasvatamine lag-kasvufaasis, rakkude kogumine lag-kasvufaasis ja varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, proovide segamine standardiga ning kvantitatiivne mass-spektromeetria analüüs.

Järgmisena analüüsiti saadud massispektromeetrilisi andmeid. Statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valgud sisaldasid rasket märget ning neid tähistati H-ga (ingl. k *Heavy* – raske). Peale

söötmevahetust uuesti sünteesitud r-valgud sisaldasid kerget märget ning neid tähistati kui L (ingl. k *Light* – kerge). Iga r-valgu jaoks arvutati H/M ja L/M suhted (v.a identifitseerimata L20 ja S21 valgud), mis näitavad raskelt või kergelt märgistatud valkude kogust keskmise märkega standard valkude vastu (M, ingl. k *Medium* – keskmine). H/M suhe näitab statsionaarsest kasvufaasist pärit valkude koguse muutust lag-kasvufaasis. L/M suhe näitab uute r-valkude koguse muutust lag-kasvufaasi käigus. Lõpuks H/M ja L/M suhted normaliseeriti optilise tiheduse muutuse vastu. Normaliseerimist tehti selleks, et lahti saada rakkude jagunemisest tingitud H/M ja L/M suhte muutusest.

Esmalt vaadeldi H/M muutust lag-kasvufaasis kõigi suure (50S) ja väikese (30S) alaühiku r-valkude kohta (lisa 3). Kõikidest r-valkudest valiti näiteid: L7, L2, L24, L25, L3 (50S alaühiku r-valgud) ning S1, S10, S15, S4, S20 (30S alaühiku r-valgud) (joonis 6).



**Joonis 6.** Statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valke lagundatakse lag-kasvufaasi jooksul. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva „raskes“ MOPS söötmes (H).. Seejärel rakukultuur inokuleeriti „kergesse“ MOPS söötmesse (L) ( $OD_{600} = 0,08$ ) ning koguti proovid 0 min, 80 min, 120 min, 160 min ja 240 min möödudes. Rakukultuuri proteoomi proovid analüüsiti qMS meetodiga. Normaliseeritud H/M suhe näitab raskete r-valkude kogust standardi suhtes. Standardiks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgistatud arginiini ( $[^{13}C]_6H_{14}N_4O_2$ ) ja lüsiini ( $C_6H_{10}[^2H]_4N_2O_2$ ) (M). Valiti näided 50S alaühiku (L7, L2, L24, L25, L3) ning 30S alaühiku (S1, S10, S15, S4, S20) r-valkudest. Joonisel on esitatud nende valkude H/M suhe muutus lag-kasvufaasi jooksul. Joonise x-teljel on aeg

minutites ning y-teljel on normaliseeritud H/M suhe. 0 minuti ja 240 minuti puhul esitati kahe bioloogilise korduse keskmine ning väärtuste vahemik. 80 minuti ja 160 minuti puhul on esitatud ühe bioloogilise korduse H/M suhe.

Kõikide r-valkude H/M suhe langeb rakkude proteoomis lag-kasvufaasi käigus, kuid mittetäielikult (joonis 6, lisa 3). Sellest võib järeldada et r-valke, kas lagundatakse spetsiifiliselt lag-kasvufaasis rakkudes või toimub rakkudes kogu proteoomi lagundamine. Samas H/M suhte mittetäielik kadumine võib tähendada seda, et vanu r-valke ei lagundata lõpuni ning log-kasvufaasi alguseks osa nendest jääb rakkudesse ribosoomi koosseisus või vabalt tsütoplasmas. Tõenäoliselt kui nad on vabalt rakus, siis võivad nad olla kaasatud ribosoomide biogeneesis, kuna log-kasvufaasis suurem osa energiaressursse on suunatud ribosoomide moodustamisele ja translatsiooniprotsessile .

Vastandlikult sellele, et vanad r-valke kasutatakse uute ribosoomide biogeneesis, võib rakk hoopis lagundada vabu r-valke proteolüüsi abil, et saada vajalikke biomassi suurendamiseks aminohappeid, kuna rakkude varajses lag-kasvufaasis on maha surutud süsiniku kasutamise eest vastutavad geenid (Schultz ja Kishony, 2013).

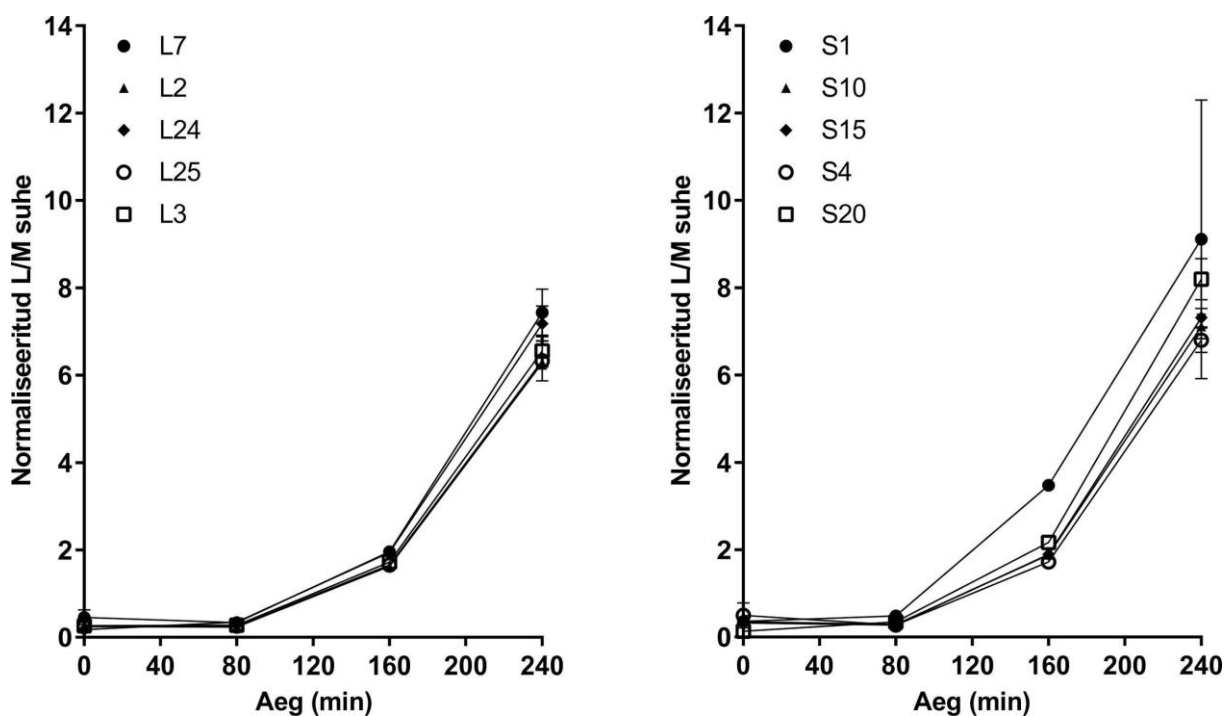
Samuti on vanade r-valkude lagundamise võimalikuks põhjuseks vajadus pärssida oma mRNA translatsiooni lag-kasvufaasist väljumise momendiks, et tagada uute r-valkude sünteesi vastavalt kõrgendatud rRNA tasemele. Sellest tulenevad küsimused miks r-valke lagundatakse lag-kasvufaasis ja kas r-valgud on rakkudes vabalt või ribosoomide koosseisus?

Lisaks on statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valgud erinevas koguses rakukultuuris lag-kasvufaasis. See võib kinnitada, et statsionaarsest kasvufaasist väljumise momendiks paikneb rakkudes osa vanu r-valke vabalt.

S1 valk on vajalik mRNA sidumiseks, voltimiseks ja liikumiseks translatsiooni ajal (Loveland ja Korostelev, 2018). On ammu teada, et statsionaarses kasvufaasis vabaneb S1 valk ribosoomidest ja akumuleerub raku tsütosoolis suurel koopia arvul (Ramagopal, 1976). Käesoleva töö kohaselt vana S1 valgu kogus on märgatavalt suurem lag-kasvufaasis võrreldes teiste statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude kogusega. Põhjuseks võib olla S1 valgu puudus kasutatavas standardis, milleks olid statsionaarse kasvufaasi rakkudest puhastatud 70S ribosoomid.

Lag-kasvufaasis või eksponentsiaalse kasvufaasi alguses toimub aktiivne ribosoomide biogenees, millega kaasneb suurenenud r-valkude süntees. Selleks, et teha kindlaks millal algab

uute r-valkude süntees, vaadeldi r-valkude normaliseeritud L/M suhte muutust lag-kasvufaasi jooksul (joonis 7, lisa 4).

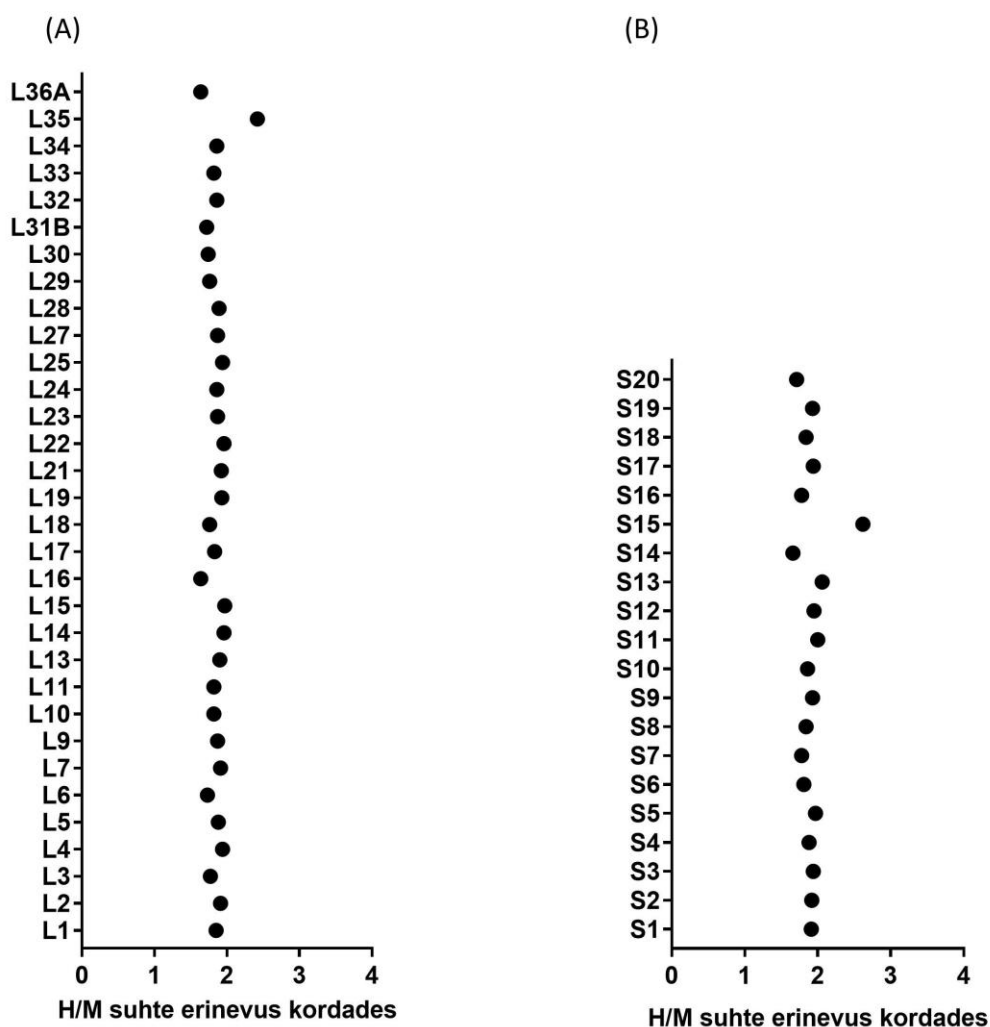


**Joonis 7.** Uute r-valkude süntees lag-kasvufaasis. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva „raskes“ MOPS söötmes (H). Seejärel inokuleeriti rakukultuur „kergesse“ MOPS söötmesse (L) ( $OD_{600} = 0,08$ ) ning koguti proovid 0 min, 80 min, 120 min, 160 min ja 240 min möödudes. Rakukultuuri proteoomi proovid analüüsiti qMS meetodiga. Normaliseeritud L/M suhe näitab raskete r-valkude koguse standardi suhtes. Standardiks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgistatud arginiini ( $[^{13}C]_6H_{14}N_4O_2$ ) ja lüsiini ( $C_6H_{10}[^2H]_4N_2O_2$ ) (M). Valiti näided 50S alaühiku (L7, L2, L24, L25, L3) ning 30S alaühiku (S1, S10, S15, S4, S20) r-valkudest. Joonisel on esitatud valitud r-valkude L/M suhe muutus lag-kasvufaasi jooksul. Joonise y-teljel on aeg minutites ning y-teljel on normaliseeritud L/M suhe. 0 minuti ja 240 minuti puhul esitati kahe bioloogilise korduse keskmine ning väärtuste vahemik. 80 minuti ja 160 minuti puhul on esitatud ühe bioloogilise korduse L/M suhe.

Jooniselt 7 on näha, et alates 80 minutist hakkab r-valkude L/M suhe tõusma ning sellest võib järeldada, et uute r-valkude süntees rakkudes algab hilises lag-kasvufaasis. See on ka uute ribosoomide biogeneesi alguspunktiks, mis ei ole varasemate uuringute vastuolus. Varasemalt on näidatud, et ribosoomide biogenees algab Fis valgu produtseerimise ajal hilises lag-kasvufaasis (Mallik *et al.*, 2004).

Lisaks sellele toimub enamiku r-valkude süntees ja akumulatsioon lag-kasvufaasi käigus võrdsetes kogustes, kuid on ka erandeid. Varasemates uuringutes on näidatud, et eksponentsiaalsest kasvufaasist üleminekul statsionaarsesse kasvufaasi asendatakse ribosoomides valgud L31A ja L36A vastavalt L31B ja L36B valkude vastu (Lilleorg et al., 2019). Selle töö tulemused (lisa 4) näitavad seda, et lag-kasvufaasi käigus L31B valgu uut sünteesi ei toimu, kuna see pole eksponentsiaalses kasvufaasis vajalik valk. Samal ajal tõuseb L36A valgu tase järsult 240 minuti momendiks ning ta on võrreldes teiste r-valkudega suuremas koguses, mis kinnitab seda, et ta on vajalik valk eksponentsiaalses kasvufaasis.

Kuna selgus, et statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude tase langeb lag-kasvufaasi käigus, seega järgneb küsimus kas see muutus toimub kõikide r-valkude jaoks ühtemoodi või erinevalt? Selleks võeti r-valkude normaliseeritud H/M suhted 0 minutist ja 160 minutist ning leiti erinevus kordades nende kahe ajapunkti vahel (tabel 1, joonis 8).



**Joonis 8.** Statsionaarses kasvufaasis sünteesitud r-valkude koguse muutus lag-kasvufaasis. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva „raskes“ MOPS söötmes. 16-päevane rakukultuur inokuleeriti „kergesse“ MOPS söötmesse ( $OD_{600} = 0,08$ ) ning koguti proovid 0 min, 80 min, 160 min ja 240 min möödudes. Rakukultuuri proteoomi proovid analüüsiti qMS meetodiga. Statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valgud sisaldasid rasket isotoopmärget. Nende tuvastamiseks arvutati H/M suhe, mis näitab „raske“ r-valgu kogust (H) keskmise isotoopmärkega standardi (M) suhtes. Standardiks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgistatud arginiini ( $[^{13}C]_6H_{14}N_4O_2$ ) ja lüsiini ( $C_6H_{10}[^2H]_4N_2O_2$ ). H/M suhe on normaliseeritud. Joonise x-telgedel on esitatud H/M suhte erinevus kordades 0 minuti ja 160 minuti vahel, mis kirjeldab r-valkude negatiivset muutust lag-kasvufaasi jooksul. Joonise y-telgedel on r-valkude nimetused. A) 50S alaühiku r-valkude väärtused. B) 30S alaühiku r-valkude väärtused.

Jooniselt 8 on näha, et enamiku r-valkude H/M suhe ajavahemikus 0 minutit kuni 160 minutit langeb rakukultuuris ligikaudu 2 korda. Samas eristuvad r-valkude seast kaks valku: L35 ja S15, mille H/M suhte osakaal langeb selles ajavahemikus teiste r-valkude omadest kiiremini. Selle tulemuse kohaselt võib järeldada, et L35 ja S15 r-valke lagundatakse spetsiifiliselt lag-kasvufaasis. Näiteks S15 valgu kiirema lagundamise põhjuseks võib olla vajadus oma translatsiooni inhibeerimise vähendamisel, sest ta on primaarne 16S rRNA-d siduv valk 30S alaühiku kokkupanemisel (Slinger *et al.*, 2015).

S15 valk vastutab, nagu paljud teised r-valgud, oma operoni autoregulatsiooni eest ehk liigne S15 valk seondub oma mRNA-ga ja takistab selle translatsiooni (Philippe *et al.*, 1990). Kusjuures on teada, et S15 valgu geen *rpsO* asub ühes operonis teise *pnp* geeniga, mis kodeerib PNPaasi (Régnier ja Portier, 1986). Vaatamata sellele, et *rpsO-pnp* operon on keerulise ehitusega ning sisaldab endas mitmeid promotoreid ja terminaatoreid, on võimalik, et S15 valk mõjutab ka PNPaasi translatsiooni (Régnier ja Portier, 1986).

PNPaas on eksonukleas ja seda on vaja paljude mRNA protsessingu reaktsioonide jaoks, samuti on see polü(A)-polümeraasi funktsiooniga (Fontaine *et al.*, 2016). Võimalik, et S15 valk laguneb, et mitte pärssida PNPaasi translatsiooni, mille funktsioneerimine võib tähtis olla lag-kasvufaasis, kui transkribeeritakse suures koguses mRNA-d.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö peamine küsimus on, mis juhtub *E. coli* r-valkudega lag-kasvufaasis? Sellele küsimusele vastuse leidmiseks püstitati eesmärgid ning teostati katseid. Esimese katse eesmärgiks oli selgitada välja *E. coli* rakkude lag-kasvufaasi pikkus sõltuvalt statsionaarse kasvufaasi pikkusest. Kõigepealt leiti kasvukõverad ning määrati erineva statsionaarse kasvufaasi pikkusega rakukultuuri puhul nende lag-kasvufaasi pikkused pärast inokuleerimist värskesse söötmesse. Tulemusest saab järeldada, et mida kauem rakud viibivad statsionaarses kasvufaasis, seda pikem on nende lag-kasvufaas.

Järgmise katse eesmärgiks on uurida *E. coli* ribosomaalsete valkude dünaamikat lag-kasvufaasi käigus. Samuti teha kindlaks, kas lag-kasvufaasis vanu r-valke lagundatakse või kasutatakse uute ribosoomide kokkupanemisel. Selleks leiti statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude koguse muutust lag-kasvufaasi jooksul. Järeldades sellest tulemusest r-valke lagundatakse kas spetsiifiliselt lag-kasvufaasis või toimub rakkude lagundamine. Samas vanu r-valke ei lagundata lõpuni ning lag-kasvufaasi alguseks osa nendest jääb rakkudesse kas ribosoomi koosseisus või vabalt rakkude tsütosoolis.

Lisaks sellele näidati, mitu korda muutub statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude kogus lag-kasvufaasi käigus (0 minutist kuni 160 minutit). Suuremal osal vanadest r-valkudest langes selles ajavahemikus nende kogus ligikaudu 2 korda. Samas eristus r-valkude seast kaks valku: L35 ja S15, mille koguse muutus lag-kasvufaasi käigus ligikaudu 2,5 korda.

Samuti kontrolliti lag-kasvufaasis uuesti sünteesivate r-valkude koguse muutust. Kontrolli tulemused läksid kokku eelnevate avaldatud tulemustega, kus on näidatud, et uute ribosoomide biogenees algab hilises lag-kasvufaasis (Mallik *et al.*, 2004).

Tulemused näitasid, et statsionaarse kasvufaasi rakkude r-valgud lagunevad lag-kasvufaasis, kuid mittetäielikult. Kas selle põhjuseks on r-valkude spetsiifiline lagundamine või kogu raku proteoomi lagundamine, on edasiste uuringute jaoks avatud küsimus.

## Dynamics of *Escherichia coli* ribosomal proteins in the lag growth phase

Anna Liigus

### Summary

A ribosome is a complex of rRNA and r-proteins that is responsible for protein synthesis in every organism. R-proteins are important in coordinated process of ribosome biogenesis. Ribosome biogenesis is required to initiate cell growth and division. In *Escherichia coli* cells, the synthesis of new ribosomes begins in the late lag growth phase. The main question in this work is what happens to *E. coli* r-proteins in the lag growth phase?

To find an answer to this question, goals were set and experiments were carried out. The aim of the first experiment was to determine the length of the lag growth phase of *E. coli* cells as a function of the length of the stationary growth phase. Growth curves were first found and the lag growth lengths of cell cultures of different stationary growth phase lengths were determined after inoculation into fresh medium. From the result, it can be concluded that the longer the cells stay in the stationary growth phase, the longer their lag growth phase.

The aim of the next experiment is to investigate the dynamics of *E. coli* ribosomal proteins during the lag growth phase. Also determine whether old r proteins are degraded during the lag growth phase or used to assemble new ribosomes. To this end, a change in the amount of r-proteins from the stationary growth phase during the lag growth phase was found. Inferring from this result, the r proteins are either specifically degraded or the whole cell proteome undergoes degradation in lag growth phase. However, the old r proteins are not completely degraded and at the beginning of the log growth phase, some of them remain in the cells either as a part of ribosomes or freely in the cytosol of the cells. In addition, it was shown how many times the amount of r-proteins from the stationary growth phase changes during the lag growth phase (0 minutes to 160 minutes). Most of the old r-proteins decreased approximately 2-fold during this period. However, two proteins differed from the r proteins: L35 and S15, the amount of which changed approximately 2.5-fold during the lag growth phase.

The change in the amount of new synthesized r-proteins during the lag growth phase was also checked. The control results were consistent with previous published results showing that the biogenesis of new ribosomes begins in a late lag growth phase (Mallik *et al.*, 2004).

„Why are some ribosomal proteins degraded during lag growth phase ?“ remains a interesting subject for further research in the field of molecular biology.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). From RNA to Protein. *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.*
- Arunasri, K., Adil, M., Khan, P. A. A., & Shivaji, S. (2014). Global gene expression analysis of long-term stationary phase effects in *E. coli* K12 MG1655. *PloS One*, 9(5), e96701.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.
- Bubunenko, M., Korepanov, A., Court, D. L., Jagannathan, I., Dickinson, D., Chaudhuri, B. R., Garber, M. B., & Culver, G. M. (2006). 30S ribosomal subunits can be assembled in vivo without primary binding ribosomal protein S15. *RNA*, 12(7), 1229–1239.
- Burgos, H. L., O'Connor, K., Sanchez-Vazquez, P., & Gourse, R. L. (2017). Roles of Transcriptional and Translational Control Mechanisms in Regulation of Ribosomal Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 199(21).
- Chen, S. S., & Williamson, J. R. (2013). Characterization of the Ribosome Biogenesis Landscape in *E. coli* Using Quantitative Mass Spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 425(4), 767–779.
- Chubukov, V., & Sauer, U. (2014). Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2901–2909.
- Cooper, G. M. (2000). Translation of mRNA. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition.*
- D'Arrigo, M., García de Fernando, G. D., Velasco de Diego, R., Ordóñez, J. A., George, S. M., & Pin, C. (2006). Indirect Measurement of the Lag Time Distribution of Single Cells of *Listeria innocua* in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2533–2538.
- Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., & Williamson, J. R. (2016). Modular Assembly of the Bacterial Large Ribosomal Subunit. *Cell*, 167(6), 1610–1622.e15.

- Davis, J. H., & Williamson, J. R. (2017). Structure and dynamics of bacterial ribosome biogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1716).
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., & Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5584), 1183–1186.
- Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: Evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(2), 113–120.
- Fontaine, F., Gasiorowski, E., Gracia, C., Ballouche, M., Caillet, J., Marchais, A., & Hajnsdorf, E. (2016). The small RNA SraG participates in PNPase homeostasis. *RNA*, 22(10), 1560–1573.
- Fredriksson, A., & Nyström, T. (2006). Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 612–618.
- Gulati, M., Jain, N., Davis, J. H., Williamson, J. R., & Britton, R. A. (2014). Functional interaction between ribosomal protein L6 and RbgA during ribosome assembly. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004694.
- Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., S, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., & Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1), 5948.
- Held, W. A., & Nomura, M. (1975). *Escherichia coli* 30 S ribosomal proteins uniquely required for assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(8), 3179–3184.
- Herold, M., & Nierhaus, K. H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(18), 8826–8833.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, D. J., Scrimgeour, K. G., & Horton, H. R. (2002). *Principles of Biochemistry* (3 edition). Prentice Hall.

- Jöers, A., & Tenson, T. (2016). Growth resumption from stationary phase reveals memory in *Escherichia coli* cultures. *Scientific Reports*, *6*, 24055.
- Korepanov, A. P., Gongadze, G. M., Garber, M. B., Court, D. L., & Bubunencko, M. G. (2007). Importance of the 5 S rRNA-binding ribosomal proteins for cell viability and translation in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *366*(4), 1199–1208.
- Lilleorg, S., Reier, K., Pulk, A., Liiv, A., Tammsalu, T., Peil, L., Cate, J. H. D., & Remme, J. (2019). Bacterial ribosome heterogeneity: Changes in ribosomal protein composition during transition into stationary growth phase. *Biochimie*, *156*, 169–180.
- Loveland, A. B., & Korostelev, A. A. (2018). Structural dynamics of protein S1 on the 70S ribosome visualized by ensemble cryo-EM. *Methods*, *137*, 55–66.
- Madar, D., Dekel, E., Bren, A., Zimmer, A., Porat, Z., & Alon, U. (2013). Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Systems Biology*, *7*, 136.
- Mallik, P., Pratt, T. S., Beach, M. B., Bradley, M. D., Undamatla, J., & Osuna, R. (2004). Growth Phase-Dependent Regulation and Stringent Control of *fis* Are Conserved Processes in Enteric Bacteria and Involve a Single Promoter (*fis P*) in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*(1), 122–135.
- McKellar, R. C., & Knight, K. (2000). A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *54*(3), 171–180.
- Métris, A., Le Marc, Y., Elfving, A., Ballagi, A., & Baranyi, J. (2005). Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, *100*(1–3), 13–19.
- Mizushima, S., & Nomura, M. (1970). Assembly Mapping of 30S Ribosomal Proteins from *E. coli*. *Nature*, *226*(5252), 1214–1218.
- Nahku, R., Peebo, K., Valgepea, K., Barrick, J. E., Adamberg, K., & Vilu, R. (2011). Stock culture heterogeneity rather than new mutational variation complicates short-term cell

- physiology studies of *Escherichia coli* K-12 MG1655 in continuous culture. *Microbiology*, 157(Pt 9), 2604–2610.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., & Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 736–747.
- Nikolic, N., Barner, T., & Ackermann, M. (2013). Analysis of fluorescent reporters indicates heterogeneity in glucose uptake and utilization in clonal bacterial populations. *BMC Microbiology*, 13(1), 258.
- Noeske, J., Wasserman, M. R., Terry, D. S., Altman, R. B., Blanchard, S. C., & Cate, J. H. D. (2015). High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(4), 336–341.
- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annual Review of Microbiology*, 58, 161–181.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 1(5), 376–386.
- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2004). RRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 38, 749–770.
- Philippe, C., Portier, C., Mougel, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P., Ehresmann, B., & Ehresmann, C. (1990). Target site of *Escherichia coli* ribosomal protein S15 on its messenger RNA. Conformation and interaction with the protein. *Journal of Molecular Biology*, 211(2), 415–426.
- Pin, C., & Baranyi, J. (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2534–2536.

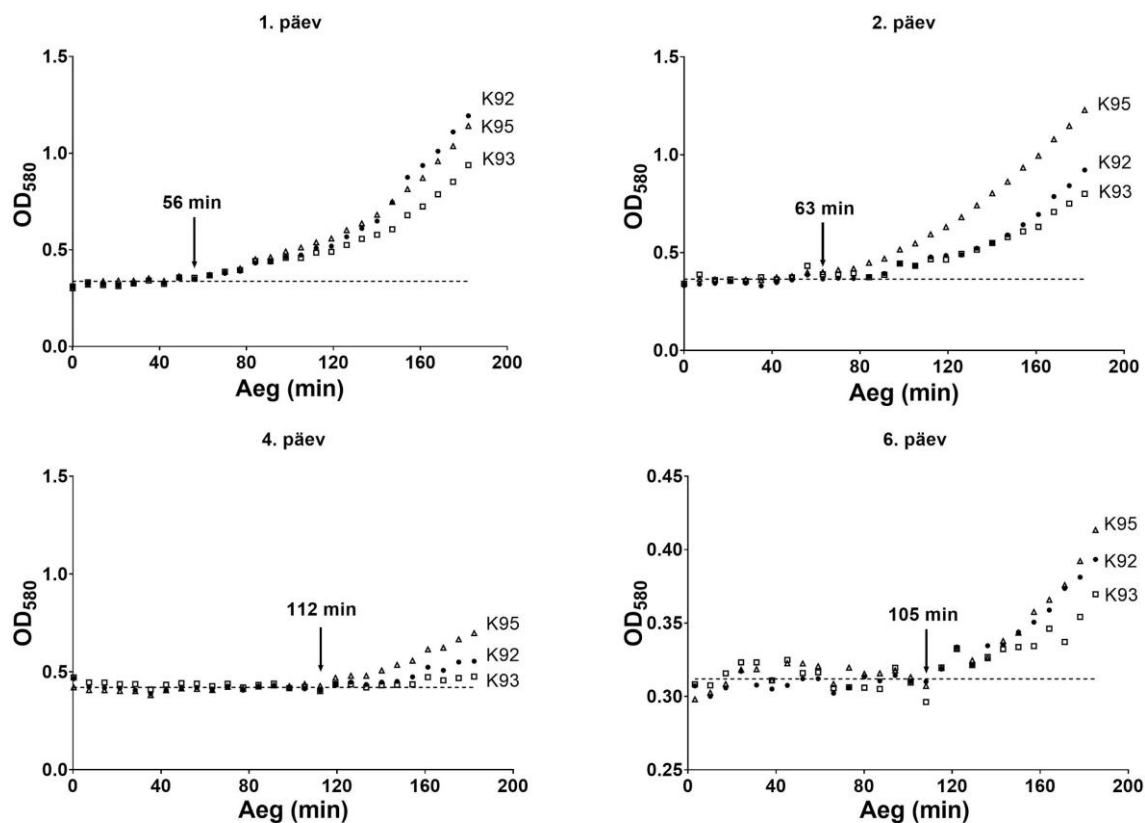
- Pin, C., Rolfe, M. D., Muñoz-Cuevas, M., Hinton, J. C., Peck, M. W., Walton, N. J., & Baranyi, J. (2009). Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC Systems Biology*, *3*, 108.
- Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M. A., & Gerdes, K. (2018). Ribosome Hibernation. *Annual Review of Genetics*, *52*, 321–348.
- Ramagopal, S. (1976). Accumulation of Free Ribosomal PrÖteins S1, L7, and L12 in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, *69*(1), 289–297.
- Régnier, P., & Portier, C. (1986). Initiation, attenuation and RNase III processing of transcripts from the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal protein S15 and polynucleotide phosphorylase. *Journal of Molecular Biology*, *187*(1), 23–32.
- Saint-Ruf, C., Garfa-Traoré, M., Collin, V., Cordier, C., Franceschi, C., & Matic, I. (2014). Massive Diversification in Aging Colonies of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *196*(17), 3059–3073.
- Schultz, D., & Kishony, R. (2013). Optimization and control in bacterial Lag phase. *BMC Biology*, *11*, 120.
- Sergiev, P., Aleksashin, N., Chugunova, A., Polikanov, Y., & Dontsova, O. (2018). Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nature Chemical Biology*, *14*, 226.
- Shajani, Z., Sykes, M. T., & Williamson, J. R. (2011). Assembly of bacterial ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 501–526.
- Shoji, S., Dambacher, C. M., Shajani, Z., Williamson, J. R., & Schultz, P. G. (2011). Systematic chromosomal deletion of bacterial ribosomal protein genes. *Journal of molecular biology*, *413*(4), 751–761.
- Slinger, B. L., Newman, H., Lee, Y., Pei, S., & Meyer, M. M. (2015). Co-evolution of Bacterial Ribosomal Protein S15 with Diverse mRNA Regulatory Structures. *PLoS Genetics*, *11*(12), e1005720.

- Spillmann, S., & Nierhaus, K. H. (1978). The ribosomal protein L24 of *Escherichia coli* is an assembly protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *253*(19), 7047–7050.
- Srivatsan, A., & Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(2), 100–105.
- Sykes, M. T., Shajani, Z., Sperling, E., Beck, A. H., & Williamson, J. R. (2010). Quantitative proteomic analysis of ribosome assembly and turnover in vivo. *Journal of Molecular Biology*, *403*(3), 331–345.
- Zengel, J. M., & Lindahl, L. (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *47*, 331–370.
- Zhu, Y., Mustafi, M., & Weisshaar, J. C. (2020). Biophysical Properties of *Escherichia coli* Cytoplasm in Stationary Phase by Superresolution Fluorescence Microscopy. *mBio*, *11*(3).
- Tobin, C., Mandava, C. S., Ehrenberg, M., Andersson, D. I., & Sanyal, S. (2010). Ribosomes lacking protein S20 are defective in mRNA binding and subunit association. *Journal of Molecular Biology*, *397*(3), 767–776.
- Tonn, M. K., Thomas, P., Barahona, M., & Oyarzún, D. A. (2019). Stochastic modelling reveals mechanisms of metabolic heterogeneity. *Communications Biology*, *2*(1), 1–9.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2008). *Principles of Biochemistry*. Wiley.
- Wada, A. (1998). Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *3*(4), 203–208.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., & CSHLP, I. (2007). *Molecular Biology of the Gene* (6 edition). Pearson.
- Woodson, S. A. (2000). Recent insights on RNA folding mechanisms from catalytic RNA. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *57*(5), 796–808.

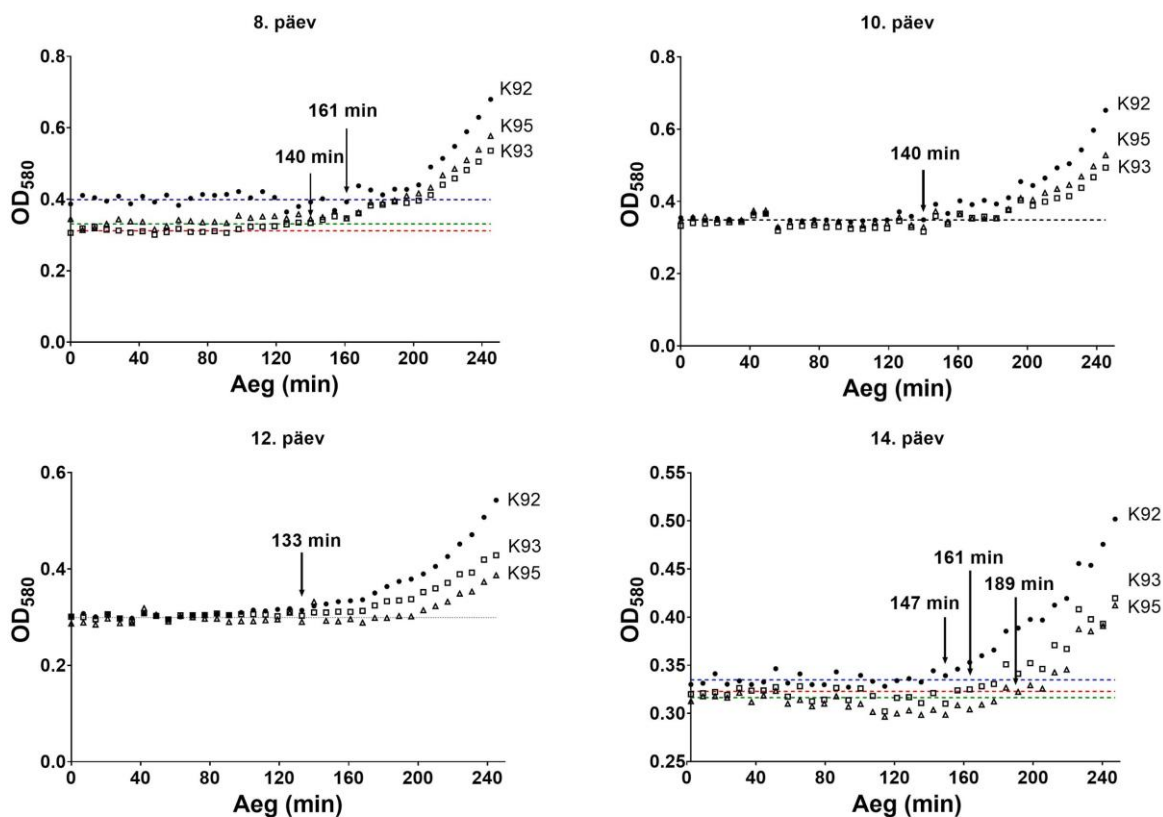
- Wower, I. K., Wower, J., & Zimmermann, R. A. (1998). Ribosomal protein L27 participates in both 50 S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19847–19852.
- Yoshida, H., Shimada, T., & Ishihama, A. (2018). Coordinated Hibernation of Transcriptional and Translational Apparatus during Growth Transition of *Escherichia coli* to Stationary Phase. *MSystems*, 3(5).
- Yoshida, H., Wada, A., Shimada, T., Maki, Y., & Ishihama, A. (2019). Coordinated Regulation of Rsd and RMF for Simultaneous Hibernation of Transcription Apparatus and Translation Machinery in Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics*, 10, 1153.

# LISAD

## LISA 1

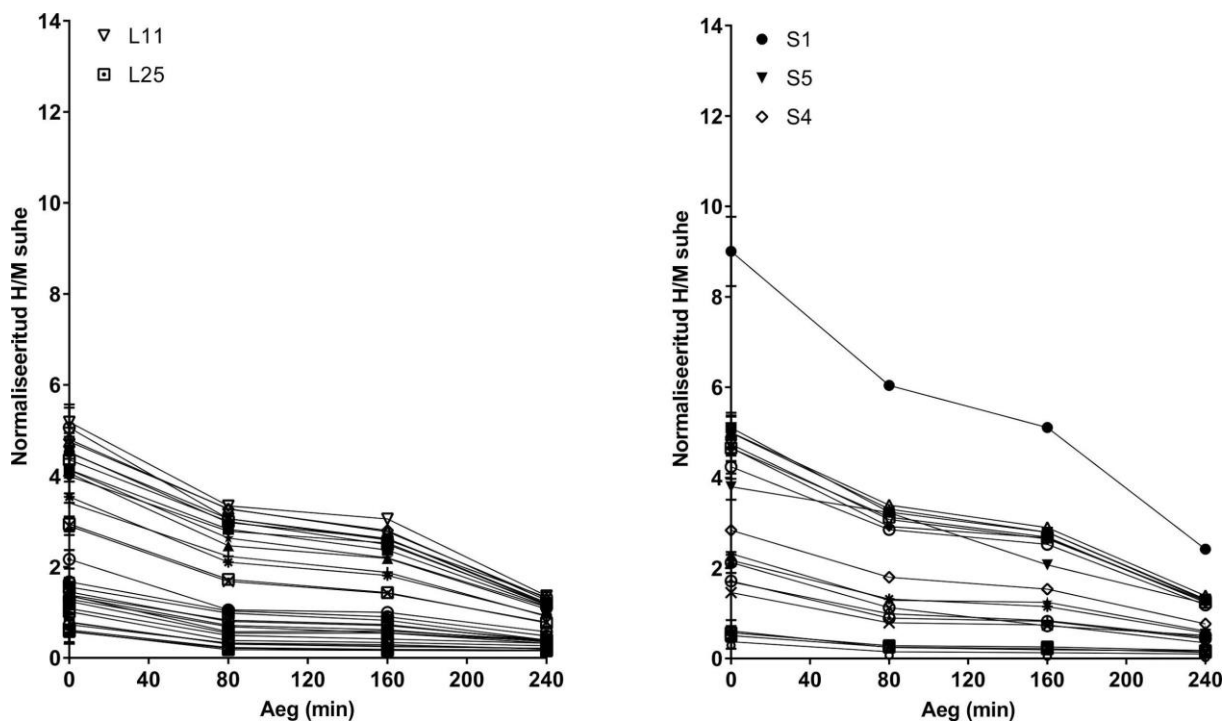


**Joonis 8.** Lag-kasvufaasi pikkus rakukultuuri eri vanuse puhul. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva MOPS söötmes. Iga kahe päeva järel võeti rakukultuuri proov, millest tehti ümberkülv ( $OD_{600} = 0,08$ ) mikrotiiterplaadile ning kasvatati üleöö. Katset tehti kolmes bioloogilises korduses. Mõõdetud  $OD_{580}$  esitati graafikul punktidenä. Esimeste 60 minuti punktide ning kolme bioloogilise korduse vahel võeti keskmine ning esitati joonisel punktiirjoonega. Lag-kasvufaasi lõpp määrati visuaalselt kohas, kus on kõrvalekalle punktiirjoonest. Joonise y-teljel on esitatud  $OD_{580}$  ning x-teljel on aeg minutites. Joonisel on kujundatud 1-, 2-, 4- ning 6-päevase rakukultuuri lag-kasvufaasi pikkused. Bioloogiliseid korduseid esitati joonisel järgnevalt: K92 - ring; K93 - ruut; K95 - kolmnurk.



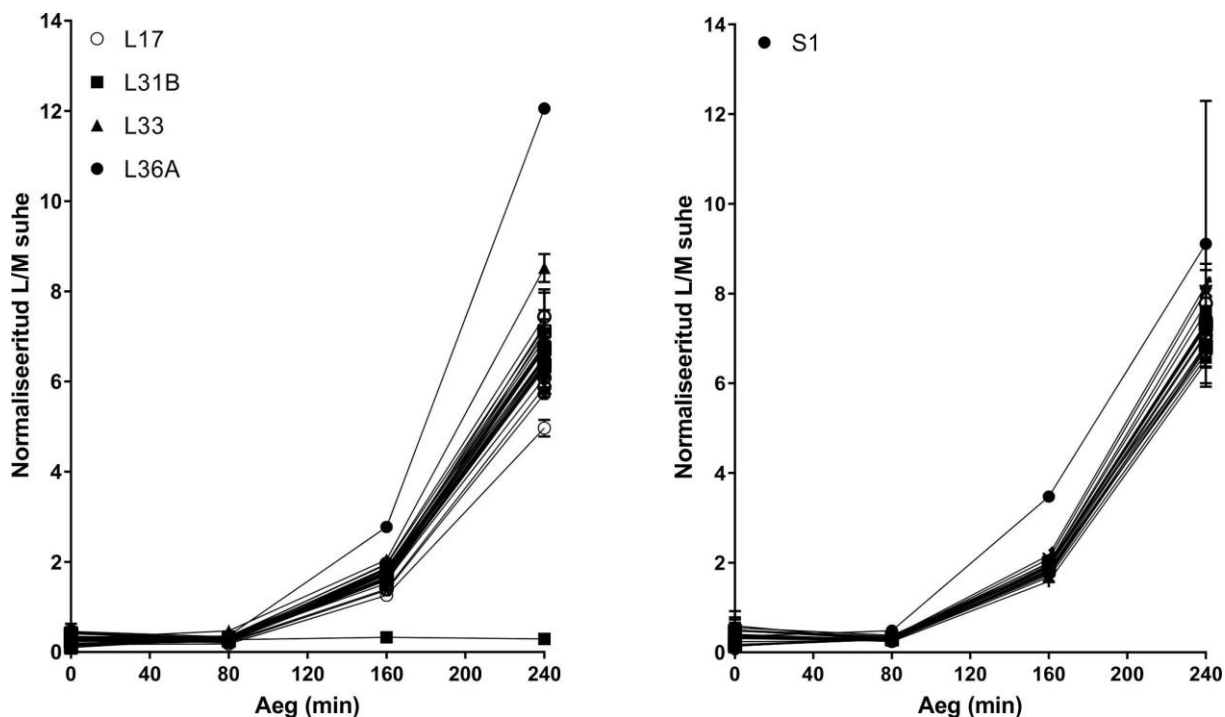
**Joonis 9.** Lag-kasvufaasi pikkus rakukultuuri eri vanuse puhul. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva MOPS söötmes. Iga kahe päeva järel võeti rakukultuuri proov, millest tehti ümberkülv ( $OD_{600} = 0,08$ ) mikrotiiterplaadile ning kasvatati üleöö. Katset tehti kolmes bioloogilises korduses. Mõõdetud  $OD_{580}$  esitati graafikul punktidenä. Esimeste 60 minuti punktide ning kolme bioloogilise korduse vahel võeti keskmine ning esitati joonisel punktiirjoonega. Lag-kasvufaasi lõpp määrati visuaalselt kohas, kus on kõrvalekalle punktiirjoonest. Joonise y-teljel on esitatud  $OD_{580}$  ning x-teljel on aeg minutites. Joonisel on kujundatud 8-, 10-, 12- ning 14-päevase rakukultuuri lag-kasvufaasi pikkused. Bioloogiliseid korduseid esitati joonisel järgnevalt: K92 - ring; K93 - ruut; K95 - kolmnurk.

## LISA 3



**Joonis 10.** Statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valke lagundatakse lag-kasvufaasi jooksul. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva „raskes“ MOPS söötmes (H).. Seejärel rakukultuur inokuleeriti „kergesse“ MOPS söötmesse (L) ( $OD_{600} = 0,08$ ) ning koguti proovid 0 min, 80 min, 120 min, 160 min ja 240 min möödudes. Rakukultuuri proteoomi proovid analüüsiti qMS meetodiga. Normaliseeritud H/M suhe näitab raskete r-valkude kogust standardi suhtes. Standardiks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgistatud arginiini ( $[^{13}C]_6H_{14}N_4O_2$ ) ja lüsiini ( $C_6H_{10}[^2H]_4N_2O_2$ ) (M). Joonisel on esitatud kõigi r-valkude H/M suhe muutus lag-kasvufaasi jooksul. Joonise x-teljel on aeg minutites ning y-teljel on normaliseeritud H/M suhe. 0 minuti ja 240 minuti puhul esitati kahe bioloogilise korduse keskmine ning väärtuste vahemik. 80 minuti ja 160 minuti puhul on esitatud ühe bioloogilise korduse H/M suhe.

## LISA 4



**Joonis 11.** Uute r-valkude süntees lag-kasvufaasis. *Escherichia coli* MG1655 SILAC tüve kasvatati 16 päeva „raskes“ MOPS söötmes (H). Seejärel inokuleeriti rakukultuur „kergesse“ MOPS söötmesse (L) ( $OD_{600} = 0,08$ ) ning koguti proovid 0 min, 80 min, 120 min, 160 min ja 240 min möödudes. Rakukultuuri proteoomi proovid analüüsiti qMS meetodiga. Normaliseeritud L/M suhe näitab raskete r-valkude koguse standardi suhtes. Standardiks olid 70S ribosoomid, mis sisaldasid stabiilsete isotoopidega märgistatud arginiini ( $[^{13}C]_6H_{14}N_4O_2$ ) ja lüsiini ( $C_6H_{10}[^2H]_4N_2O_2$ ) (M). Joonisel on esitatud kõigi r-valkude L/M suhe muutus lag-kasvufaasi jooksul. Joonise y-teljel on aeg minutites ning y-teljel on normaliseeritud L/M suhe. 0 minuti ja 240 minuti puhul esitati kahe bioloogilise korduse keskmine ning väärtuste vahemik. 80 minuti ja 160 minuti puhul on esitatud ühe bioloogilise korduse L/M suhe.

## LISA 5

**Tabel 1.** Statsionaarsest kasvufaasist pärit r-valkude erinevus kordades lag-kasvufaasi 0 minuti ja 160 minuti vahel.

50S alaühiku r-valgud				30S alaühiku r-valgud			
	0 min	160 min	Erinevus kordades		0 min	160 min	Erinevus kordades
L1	4.86	2.62	1.85	S1	9.77	5.11	1.91
L2	1.36	0.71	1.91	S2	5.35	2.79	1.92
L3	4.20	2.37	1.77	S3	5.44	2.80	1.94
L4	4.25	2.19	1.94	S4	2.88	1.53	1.88
L5	4.94	2.63	1.88	S5	4.09	2.07	1.97
L6	4.38	2.53	1.73	S6	4.83	2.67	1.81
L7	4.94	2.59	1.91	S7	4.51	2.53	1.78
L9	4.67	2.49	1.87	S8	4.94	2.68	1.84
L10	5.06	2.77	1.82	S9	1.62	0.84	1.93
L11	5.57	3.06	1.82	S10	5.38	2.90	1.86
L13	2.70	1.42	1.90	S11	2.30	1.15	2.00
L14	5.50	2.80	1.96	S12	1.45	0.74	1.95
L15	1.08	0.55	1.97	S13	1.70	0.82	2.06
L16	0.97	0.59	1.64	S14	0.42	0.26	1.66
L17	1.34	0.73	1.83	S15	1.89	0.72	2.62
L18	0.73	0.42	1.76	S16	0.38	0.22	1.78
L19	3.50	1.82	1.93	S17	5.13	2.64	1.94
L21	4.21	2.20	1.92	S18	2.29	1.24	1.84
L22	1.96	1.00	1.96	S19	0.37	0.19	1.93
L23	3.52	1.88	1.87	S20	0.22	0.13	1.71
L24	0.46	0.25	1.86				
L25	2.78	1.44	1.94				
L27	0.49	0.26	1.87				
L28	1.17	0.62	1.89				
L29	0.97	0.55	1.76				
L30	0.51	0.29	1.74				
L31B	1.56	0.90	1.72				
L32	0.32	0.17	1.86				
L33	0.35	0.19	1.82				
L34	0.31	0.17	1.86				
L35	0.82	0.34	2.42				
L36A	1.35	0.82	1.64				

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Anna Liigus (sünnikuupäev: 10.03.1996),

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

***Escherichia coli* ribosomaalsete valkude dünaamika lag-kasvufaasis,**

mille juhendajad on Aivar Liiv ja Kaspar Reier,

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.

Tartus, 10.08.2020