



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Determination of protein synthesis on a proteomic scale

Kramer, G.

Publication date
2011

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Kramer, G. (2011). *Determination of protein synthesis on a proteomic scale*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

SAMENVATTING

Ons inzicht in de complexe regulering van cellulaire fysiologie heeft veel baat gehad bij verschillende genomwijde analyses van transcripten, eiwitten en metabolieten. Genomwijde studies hebben aangetoond dat transcript niveaus niet altijd direct overeenkomen met cellulaire eiwitniveaus, zoals menigeen misschien had verwacht. Eiwit expressie kan afgezien van regulatie middels transcriptie ook gereguleerd worden gedurende de translatie van een transcript naar een eiwit. Afgezien van de translationele controle worden cellulaire eiwitniveaus ook door de halfwaardetijd van eiwitten bepaald. *Hoofdstuk 1* geeft een overzicht van post-transcriptionele regulatie, welke eiwitaanmaak en afbraak beïnvloedt. Het bepalen van eiwitsynthese en afbraak voor grote aantallen eiwitten tegelijkertijd zal van onschatbare waarde zijn om te kijken waar en hoe post-transcriptionele regulatie optreedt. Op het moment is het genomwijd bepalen van eiwitsynthese snelheden en halfwaardetijden lastig. Dit in het bijzonder wanneer kortstondige veranderingen in synthese of afbraak gedetecteerd dienen te worden gedurende cellulaire adaptatie. Over het algemeen wordt eiwitsynthese en -afbraak bepaald door middel van 'pulse-chase' labelen, m.b.v. radio-isotopen. Hoewel deze aanpak met radio-isotopen een hoge temporele resolutie biedt, is het lastig deze te gebruiken met een op massaspectrometrie gebaseerde proteomics aanpak. Helaas heeft het gebruik van stabiele-isotopen (in plaats van radio-isotopen), hoewel optimaal voor massaspectrometrie, een beperkte temporele resolutie, hetgeen wordt veroorzaakt door de bulk van ongelabelde eiwitten. De detectie van gelabelde eiwitten wordt speciaal bemoeilijkt wanneer korte pulse-label tijden gebruikt worden.

Niet natuurlijke aminozuren vormen een alternatief voor stabiele-isotopen. Zij geven compatibiliteit met massaspectrometrie en hoge temporele resolutie. De methionine analoog azhal is zo een pulse-label, waarvoor reeds incorporatie in eiwitten door *E. coli*, zoogdiercellijnen en gekweekte insectcellen is aangetoond. Niet natuurlijke aminozuren kunnen een hogere temporele resolutie bereiken ondanks korte labeltijden door selectieve verrijking van gelabelde eiwitten of peptiden uit de ongelabelde achtergrond. Azhal gelabelde moleculen worden verrijkt door middel van covalente binding aan affiniteits harsen door 'click chemie' gericht op de azide groep van azhal. Dit vergemakkelijkt gevoelige massaspectrometrische detectie van laag abundante azhal gelabelde peptiden of eiwitten.

Hoofdstuk 2 beschrijft the fysiologische respons van twee prokaryote model organismen (*E. coli* en *B. subtilis*) op azhal. Verder worden de effecten van inbouw van azhal in verscheidene recombinante eiwitten onderzocht. *E. coli* groeit even goed op azhal als methionine gedurende de eerste 30 minuten na vervanging, waarna de groeisnelheid langzaam afneemt. Daarentegen vertoont *B. subtilis* een initiële 'lag' fase en een duidelijk lagere groeisnelheid. Drie fotoactieve eiwitten (PYP, AppA en YtvA) gelabeld met azhal lijken normaal te vouwen. Echter, na belichting herstellen deze eiwitten met een ietwat veranderde snelheid vanuit aangeslagen toestand naar grondtoestand in vergelijking met hun

methionine bevattende tegenhangers. In tegenstelling tot de foto-eiwitten kan azhal gelabeld LacZ niet gemaakt worden, waarschijnlijk door verkeerde vouwing en versnelde afbraak van het eiwit als gevolg van azhal inbouw.

In *Hoofdstuk 3* wordt een alternatieve aanpak voor affiniteitzuivering gepresenteerd. Deze verrijking is gebaseerd op veranderingen in retentie tijd na een selectieve reactie van de azide groep met tris(2-carboxy-ethyl)-phosphine. Deze reactie geeft maar liefst vier verschillende reactie producten in azhal bevattende peptiden of eiwitten, waarvan drie hier voor het eerst beschreven worden. Selectief gemodificeerde peptiden verrijkt door de retentietijd verschuiving worden vervolgens geïdentificeerd door tandem-MS. Op deze manier worden 527 *E. coli* eiwitten representatief voor alle belangrijke Gen Ontologie categorieën geïdentificeerd met maar 15 minuten azhal labelen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de kwantitatieve toepassing van de chromatografische verrijkingmethode. iTRAQ wordt gebruikt om azhal gelabelde peptiden uit verschillende groeicondities te kwantificeren, wat veranderingen in nieuwe eiwit vorming weergeeft. De initiële fase na een verandering in groeitemperatuur van 37 °C naar 44 °C in *E. coli* wordt bestudeerd. Meting van de relatieve hoeveelheden van 344 nieuw gemaakte eiwitten in de 15 minuten volgend op de verandering in groeitemperatuur toont dat bijna 20% toe- of afneemt met een factor van twee of meer. De meeste gereguleerde eiwitten welke gevonden worden zijn chaperones of proteases zoals verwacht bij deze verandering in groeicondities. Bovendien waren de veranderingen in vorming van nieuwe eiwitten in overeenstemming met eerdere studies uitgevoerd met radio-isotopen. Daarnaast is de analytische aanpak uitgebreid, om ook veranderingen in totale eiwitniveaus op dezelfde tijdschaal te bepalen. Hiervoor worden de kwantitatieve data van de niet verschoven -azhalvrije- bevattende peptiden gebruikt. Vergelijking van de veranderingen in zowel eiwit niveaus als synthese snelheden maakt de identificatie van 'stabiele' en 'labiele' eiwitten mogelijk. De grote meerderheid van de gemeten eiwitten vertegenwoordigen stabiele eiwitten, slechts 5 eiwitten hadden een hoge afbraaksnelheid onder de gebruikte groeiomstandigheden.

De uitgebreide aanpak wordt ook in *Hoofdstuk 5* gebruikt om de relatieve translatiesnelheid te bepalen gedurende 10 minuten na een verandering van aeroob naar anaeroob milieu. De meerderheid van eiwitten met verhoogde synthesesnelheden onder deze condities waren direct betrokken bij glycolyse of bij cellulaire paden die stilstand van de glycolyse door redox onbalans moeten voorkomen. Nieuw gevormde eiwitten die werden gekwantificeerd volgend op een hiteschok (*Hoofdstuk 4*) dan wel na plotselinge anaerobiose (*Hoofdstuk 5*) zijn ook vergeleken met microarray studies uitgevoerd onder vergelijkbare omstandigheden. Hieruit bleek -voor de eerste maal- dat regulatie volgend op een temperatuurstoename voornamelijk transcriptioneel is, terwijl na zuurstof depletie translationele regulatie bij een aanzienlijk aantal eiwitten lijkt op te treden. Dit toont het nut

van pulse-labelen met azhal om translationele regulatie op te sporen.

Hoofdstuk 6 behandelt de sterke en zwakke punten van pulse-labelen met azhal zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken. De aanpak wordt vergeleken met pulse-labelen met zowel radio- als stabiele-isotopen en andere technieken die genen proberen te identificeren welke post-transcriptionele regulatie ondergaan. Toekomstige technische ontwikkelingen in zowel affiniteitzuivering als chromatografische verrijking worden geïntroduceerd. Samengaand met voortgaande reductie van label tijden door deze verbeteringen, zal de analyse van synthese snelheid en stabiliteit van honderden eiwitten m.b.v. azhal-labeling de studie van cellulaire proteoom dynamiek verder helpen verdiepen.