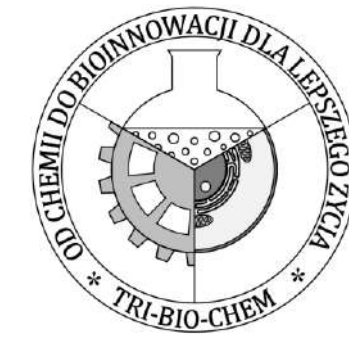


NOWE SPOJRZENIE NA STRUKTURĘ BIAŁKOWĄ PROMIENI ŁĄCZĄCYCH. ANALIZA PROTEOMICZNA KOMPLEKSÓW RS.

MARTA BICKA^{1,2}, EWA JOACHIMIAK², ANNA KONOPKA¹, DOROTA WŁOGA², EWA BULSKA¹

¹Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pasteura 1, 02-093 Warszawa
²Instytut Biologii Doświadczalnej Im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

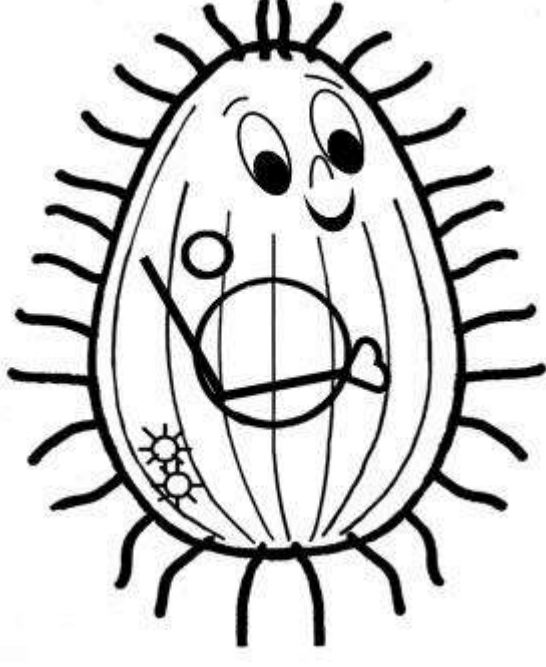


University of Warsaw
Biological and Chemical
Research Centre



nencki institute
of experimental biology

STRESZCZENIE



Rzęski ruchome: cylindryczne, wysoce wyspecjalizowane struktury o długości od kilku do kilkunastu mikrometrów.
Funkcje: u organizmów wielokomórkowych odpowiadają za przesuwanie płynów, drobin lub wydzielu, u organizmów jednokomórkowych umożliwiają ruch pojedynczych komórek.

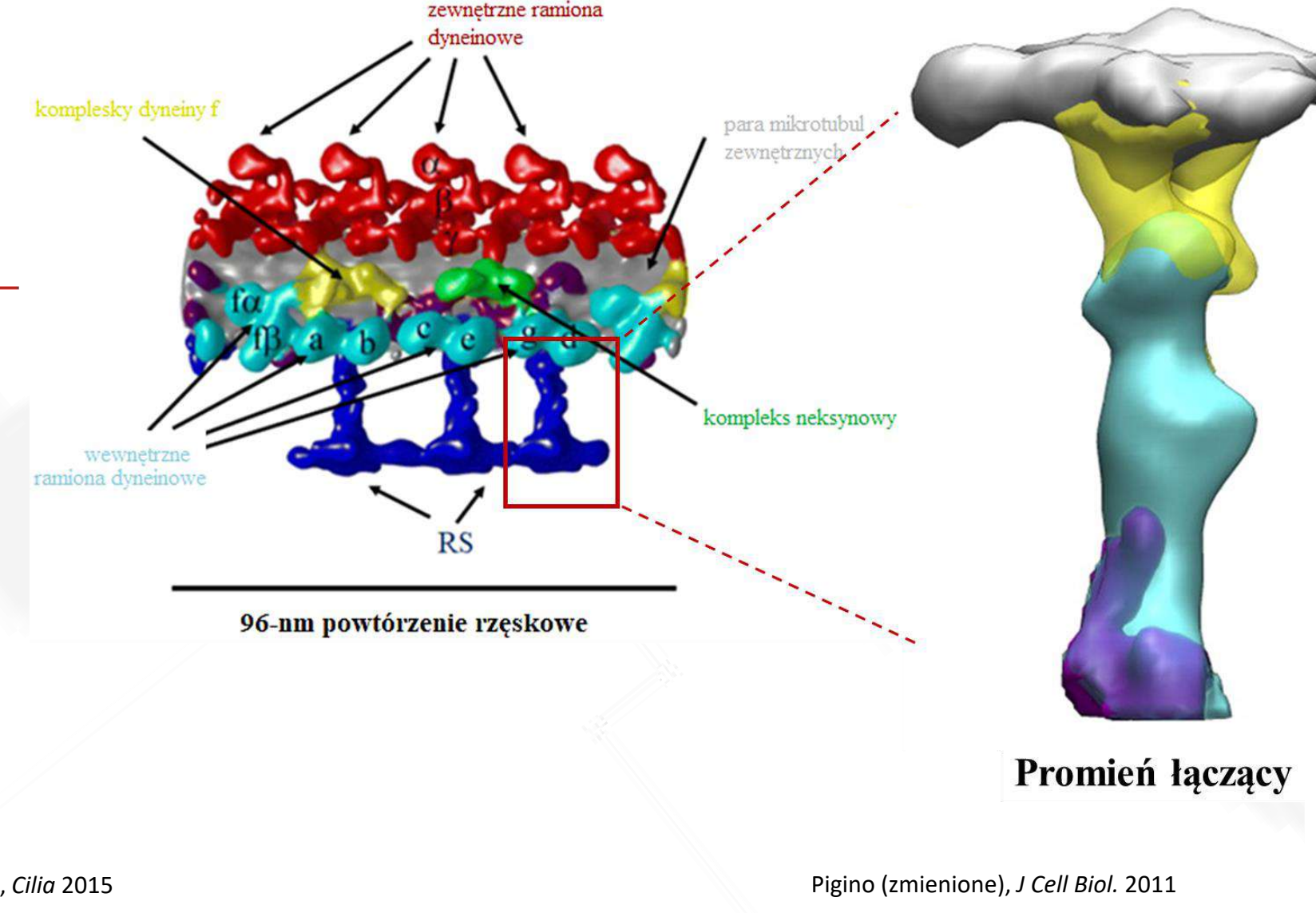
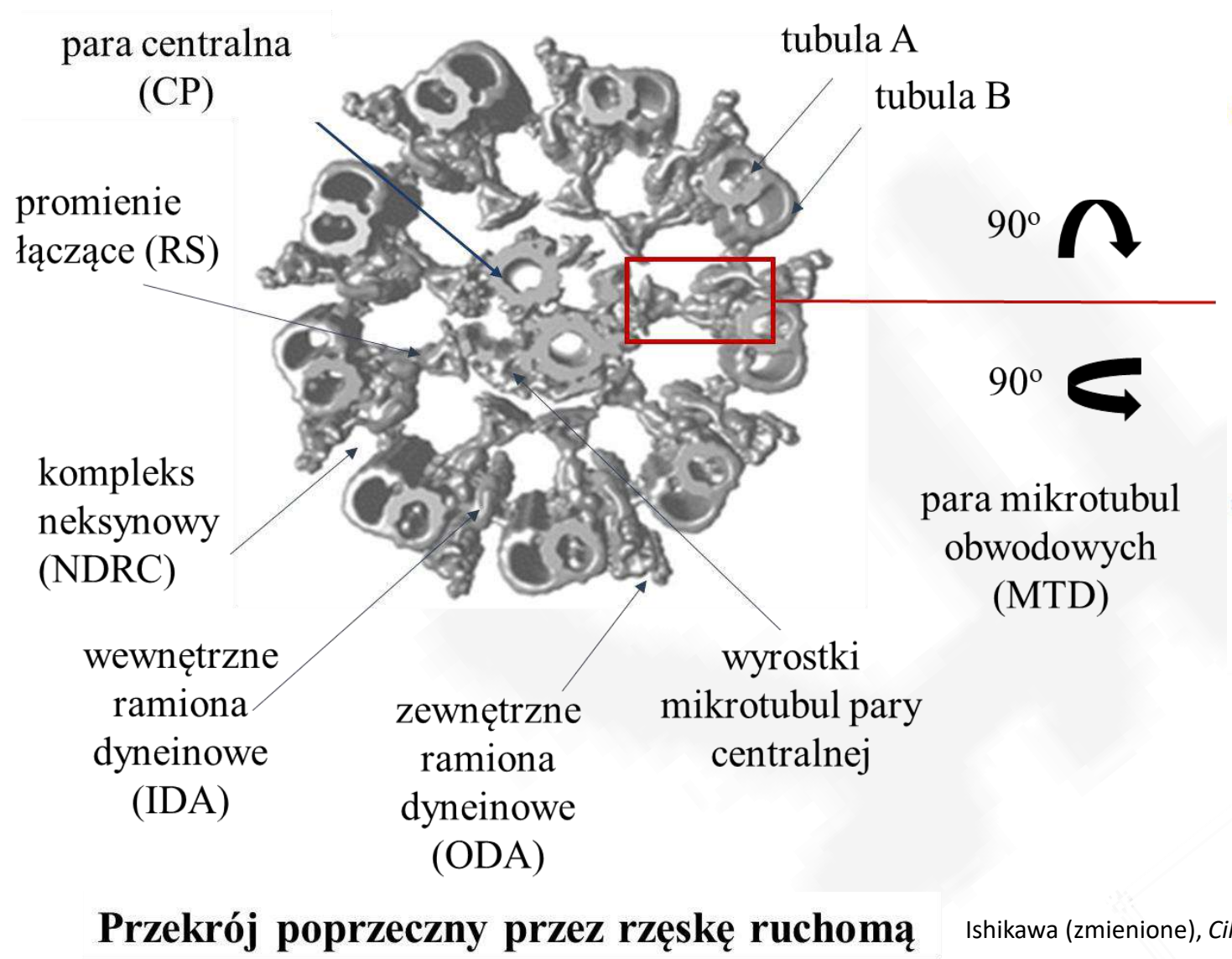
U ludzi brak, niedorozwój lub niewłaściwe funkcjonowanie rzęsek powoduje tzw. ciliopatie.

Cel pracy: Identyfikacja podjednostek kompleksów rzęskowych i ich analiza funkcjonalna.

Wykorzystywane metody: biologia molekularna, biochemia, chemiczna analiza instrumentalna (nanoUHPLC-ESI-(ORBITRAP)MS/MS).

Metody identyfikacji oraz analizy białek RS: metoda BiolD (ang. *Proximity-dependent Biotin Identification*), umożliwiająca identyfikację białek znajdujących się w odległości do 10 nm od badanego białka, znakowanego enzymem, ligazą BirA*. Metoda ko-immunoprecypitacji, której podstawę stanowią oddziaływania między białkami partnerskimi (pośrednie lub bezpośrednie). Globalna, różnicowa analiza całych proteomów rzęsek (tzw. ciliomów) bez znakowania trwałymi izotopami pierwiastków.

Budowa rzęski ruchomej i promieni łączących



Identyfikacja białek promieni łączących z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas

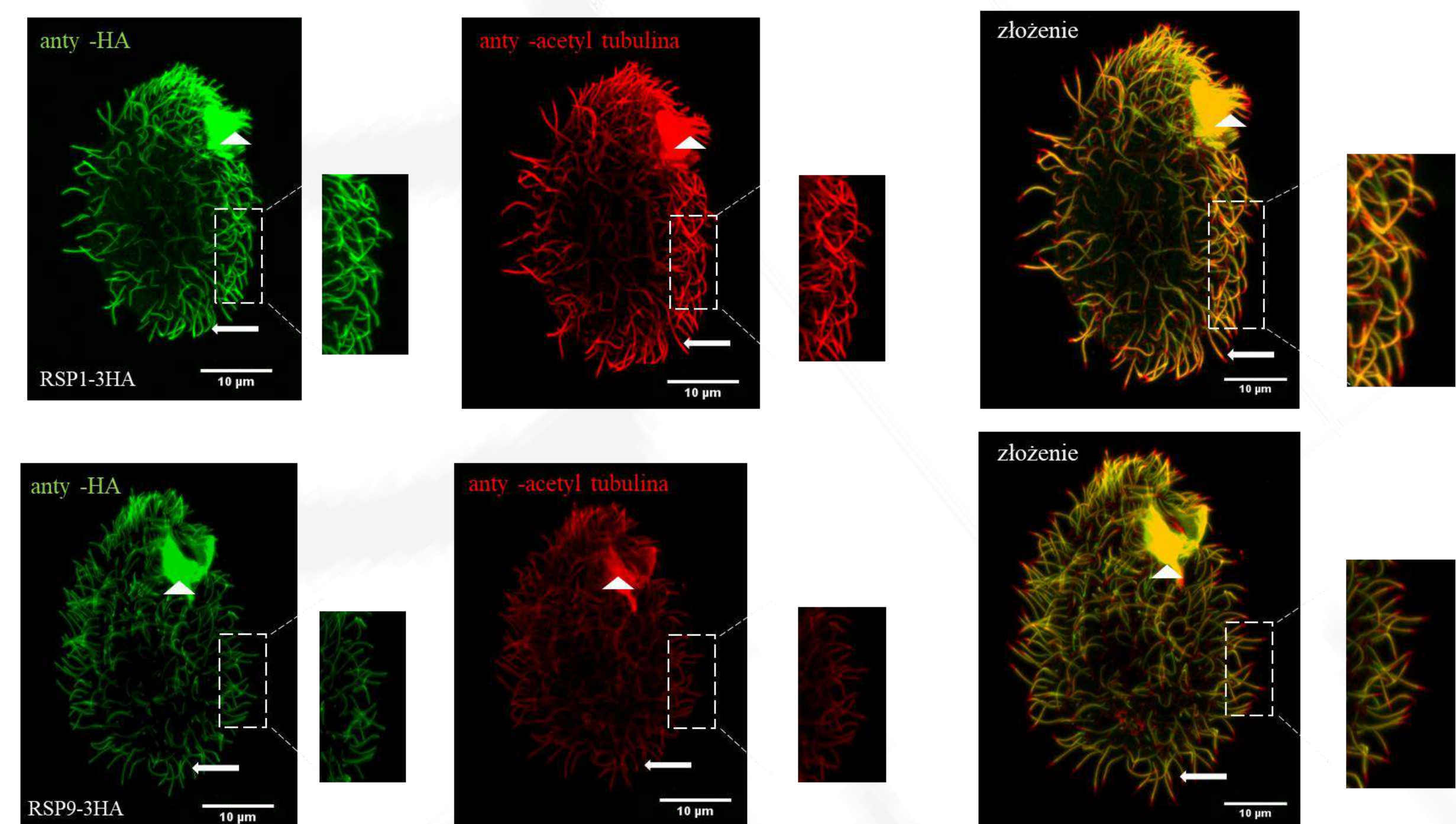
Metoda BiolD

Nazwa białka	Liczba zidentyfikowanych peptydów łącznie/unikatowe								
	RSP3 A-BirA*	RSP3B-BirA*	RSP3C-BirA*	RSP4 A-BirA*	RSP4C-BirA*	FAP61-BirA*	FAP91-BirA*	FA206-BirA*	
RSP1	4/4	1/1	0/0	3/3	0/0	0/0	1/1	0/0	
RSP2	38/33	18/18	3/3	27/27	21/21	14/13	15/15	9/9	
RSP3A	24/22	6/6	0/0	5/5	7/7	0/0	0/0	0/0	
RSP3B	16/16	11/11	9/7	8/8	6/6	5/5	7/7	5/5	
RSP3C	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	15/14	15/15	11/11	
RSP4A	24/22	12/11	2/2	22/19	19/17	1/1	3/3	0/0	
RSP4B	0/0	2/2	0/0	4/4	0/0	1/1	3/3	1/1	
RSP4C	12/10	2/2	0/0	10/9	9/9	0/0	0/0	0/0	
RSP8	0/0	4/4	1/1	4/4	0/0	11/11	6/6	10/9	
RSP9	10/9	7/7	3/3	9/8	7/7	8/7	5/5	3/3	
RSP10	9/9	4/4	0/0	8/8	6/6	1/1	1/1	0/0	
RSP14	18/17	3/3	0/0	3/3	4/2	0/0	0/0	0/0	
RSP16A	16/15	6/6	0/0	7/6	6/6	4/4	4/4	2/2	
RSP16B	0/0	2/2	0/0	1/1	0/0	7/7	7/7	8/8	
FAP91	0/0	5/4	2/2	0/0	0/0	14/13	11/11	6/6	
FAP206	0/0	1/1	0/0	1/1	0/0	9/9	9/9	11/11	
FAP61	0/0	3/3	2/1	5/5	0/0	31/27	26/24	8/7	
FAP251	0/0	4/4	1/1	0/0	0/0	19/18	22/22	9/9	
AK1	39/33	15/14	4/4	27/24	26/25	14/14	9/9	7/7	
AK7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
AK8	21/19	13/12	2/2	9/9	6/6	22/18	20/18	18/16	
AK9	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3	
RSP7	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	11/11	9/9	2/2	
FAP54	3/2	0/0	0/0	6/6	14/12	0/0	0/0	0/0	
FAP46	55/52	0/0	0/0	21/20	20/19	0/0	0/0	0/0	

Ko-immunoprecypitacja

Nazwa białka	Liczba zidentyfikowanych peptydów łącznie/unikatowe				
	RSP3A-3HA	RSP3B-3HA	RSP4A-3HA	RSP4B-3HA	RSP4C-3HA
RSP1	1/1	5/4	16/9	0/0	1/1
RSP2	27/20	72/32	55/32	0/0	1/1
RSP3A	24/22	46/26	25/17	5/5	0/0
RSP3B	8/7	42/20	25/16	2/2	1/1
RSP3C	23/12	4/3	23/20	2/2	4/4
RSP4A	12/10	36/18	67/25	6/6	2/2
RSP4B	16/11	1/1	22/14	2/2	1/1
RSP4C	1/1	36/18	30/18	2/2	1/1
RSP8	10/7	1/1	14/11	3/3	0/0
RSP9	10/9	52/16	55/32	9/7	0/0
RSP10	8/6	18/10	19/11	2/2	0/0
RSP14	4/4	40/18	23/17	0/0	2/2
RSP16A	8/8	19/11	14/10	2/2	0/0
RSP16B	4/4	0/0	8/6	0/0	1/1
FAP91	4/3	0/0	18/12	3/3	0/0
FAP206	10/9	0/0	10/7	6/6	0/0
FAP61	0/0	2/2	6/6	2/2	0/0
FAP251	0/0	1/1	16/14	9/8	17/16
AK1	21/18	12/12	29/23	18/18	0/0
AK7	1/1	0/0	2/2	3/3	0/0
AK8	18/14	36/19	30/18	7/7	15/5
AK9	5/5	5/5	16/16	4/4	9/9
RSP7	4/3	0/0	1/1	1/1	0/0
FAP54	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
FAP46	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0

Lokalizacja białek promieni łączących w komórkach *Tetrahymena*



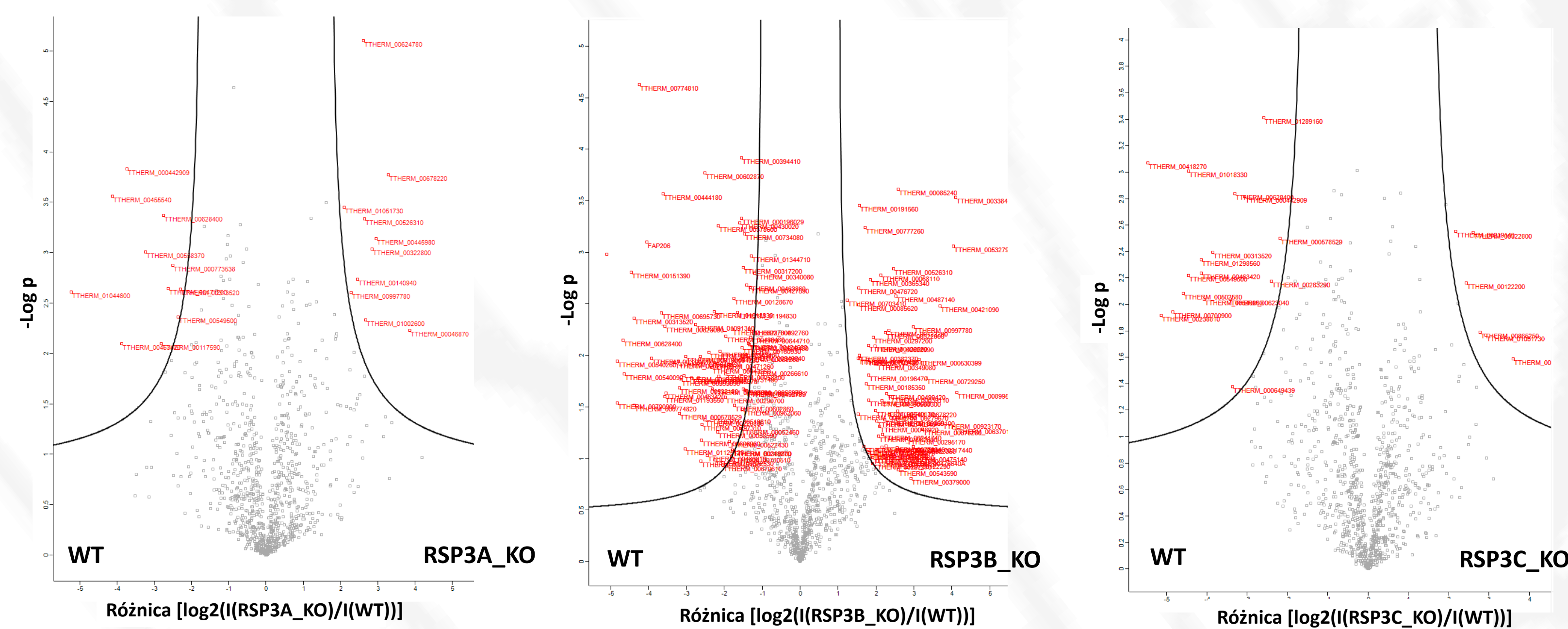
Barwienie immunocytochemiczne oraz obrazowanie przy użyciu mikroskopu konfokalnego komórek produkujących białka RSP1-3HA lub RSP9-3HA wykazało, że analizowane białka lokalizują się wzdłuż całej długości rzęsek za wyjątkiem jej końca. Lokalizację białka fuzyjnego z etykietą HA uwidoczniono znakując utrwalone komórki przeciwciałami anti-HA.



Wśród biotylinowanych białek rzęskowych zidentyfikowano białka zachowane ewolucyjnie, które znajdują się w pobliżu białek promieni łączących oraz białek kompleksu CSC. Metoda ko-immunoprecypitacji umożliwiła identyfikację białek, które w sposób bezpośredni lub pośredni oddziałują z białkami RS.

Różnicowa analiza ilościowa proteomów rzęskowych

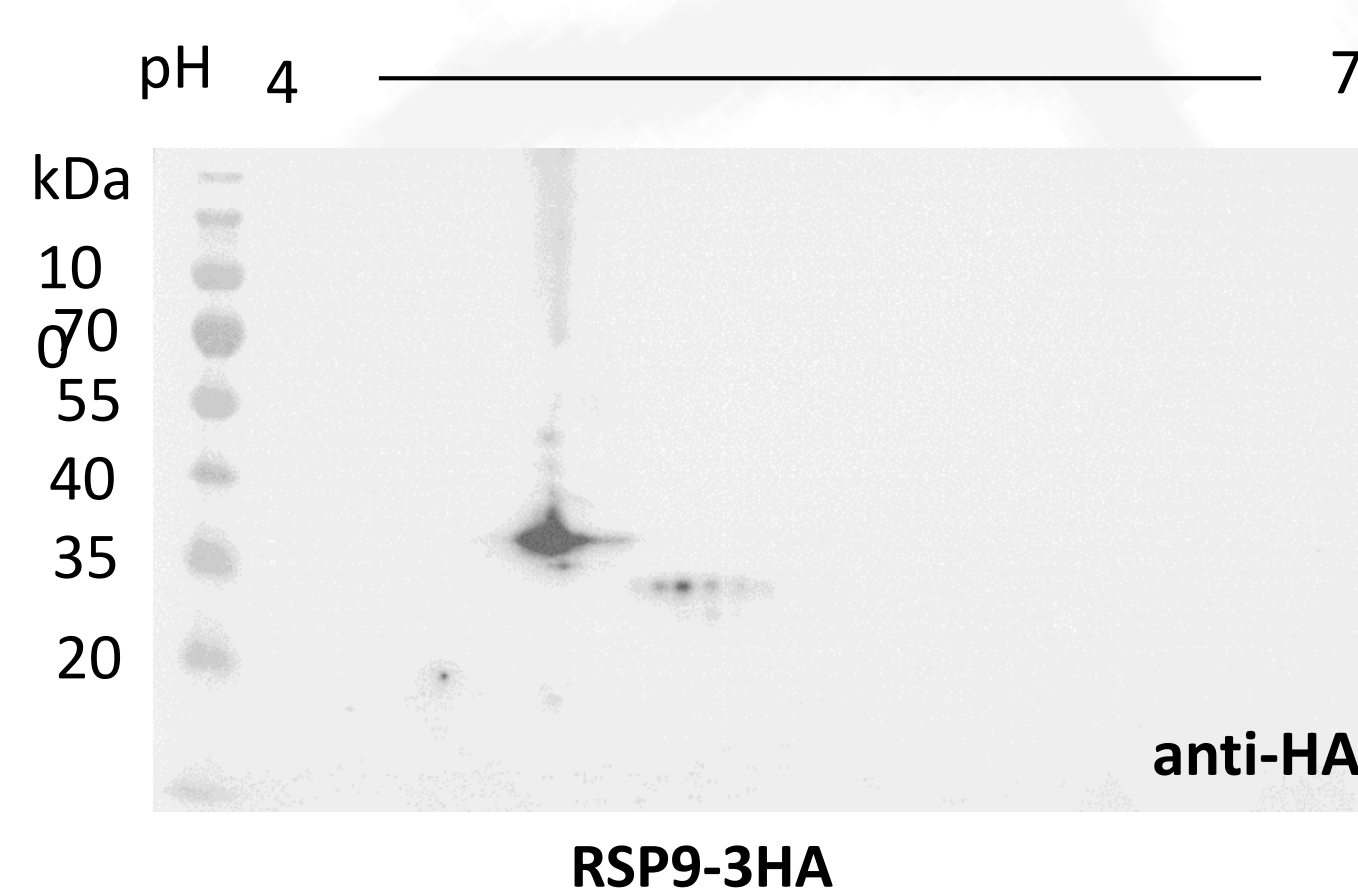
Wykresy typu Volcano plot dla białek



Przeprowadzono analizę ilościową całych proteomów rzęsek, w celu porównania proteomu rzęskowego komórek szczepu dzikiego i ciliomów mutantów z delecją genów kodujących wybrane białka rzęskowe. Wykonano dwustronny test t-Studenta (FDR < 1%; s0=1).

Przedstawiono wykresy typu volcano plot prezentujące białka o zmniejszonej ekspresji u mutantów z delecją genów kodujących białka RSP3 w porównaniu do komórek szczepu dzikiego.

Analiza izoform białek promieni



Analiza izoform białek promieni łączących przy użyciu dwukierunkowej elektroforyzy żelowej. Z uzyskanych badań wynika, że analizowane białka występują w rzęskach w postaci kilku izoform, co może wskazywać na obecność modyfikacji potranslacyjnych.

WNIOSKI

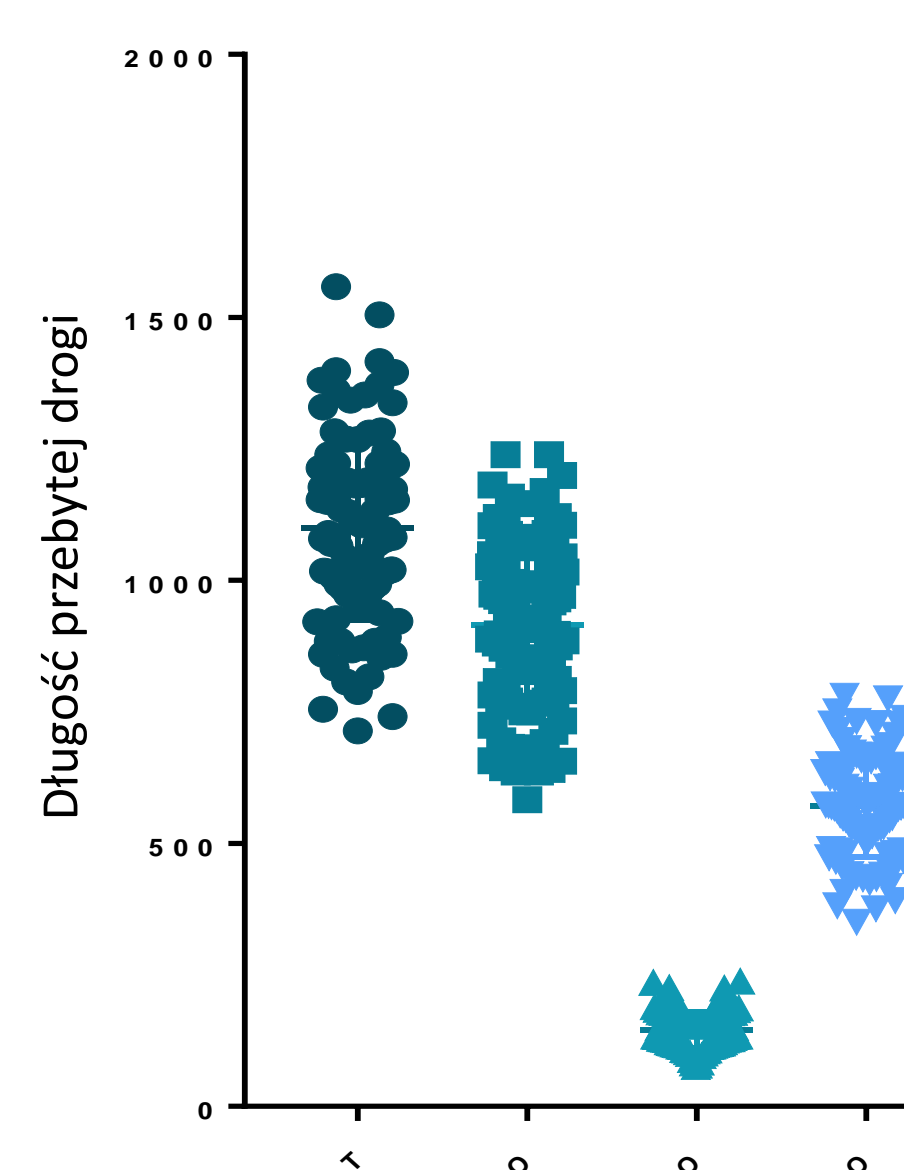
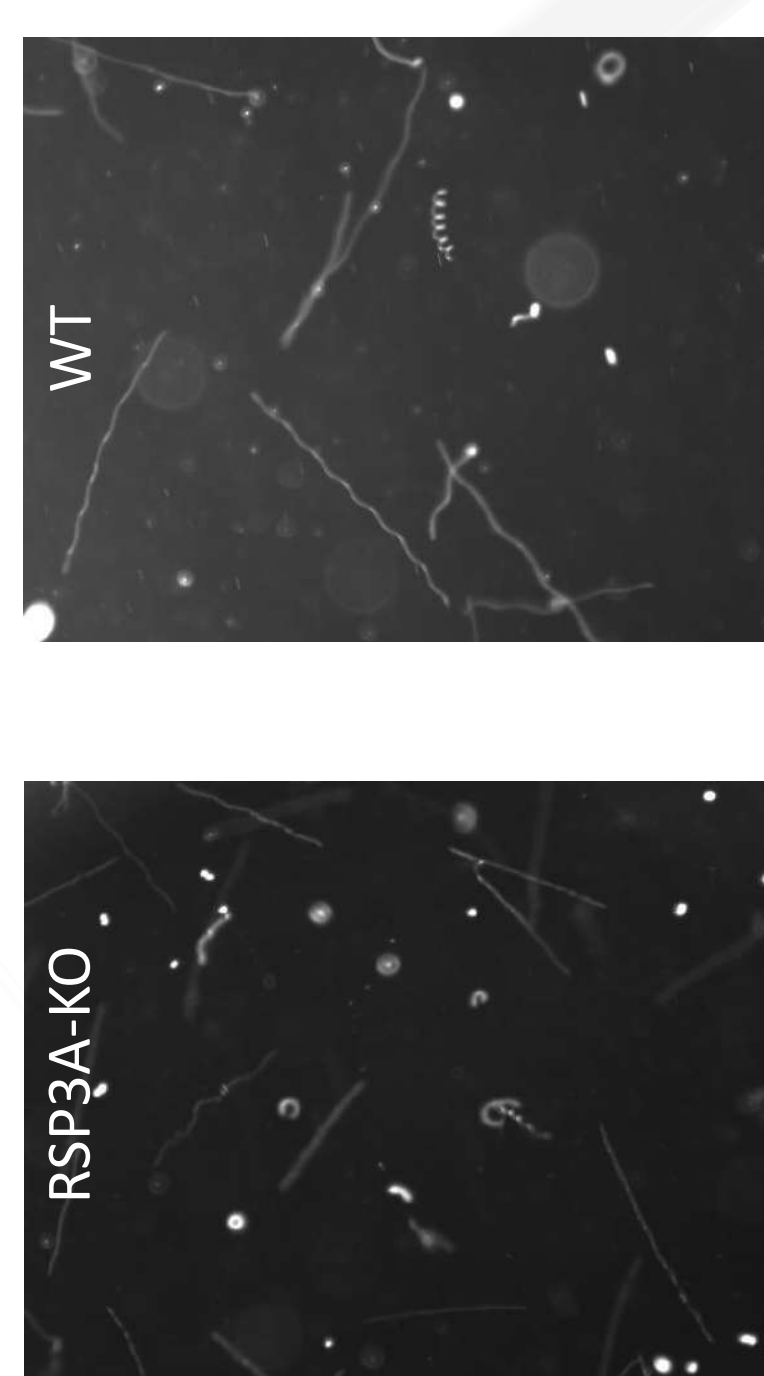
Białka RSP1 oraz RSP9, budujące główkę promieni łączących lokalizują się wzdłuż całej długości rzęsek ruchomych, za wyjątkiem ich końca.

Zastosowanie metody BiolD oraz ko-immunoprecypitacji w połączeniu z analizą instrumentalną umożliwiło identyfikację biotylinowanych białek będących potencjalnymi partnerami białek badanych oraz białek które bezpośrednio lub pośrednio oddziałują z białkami RS.

Mutanty komórek *Tetrahymena* pozbawione białek RSP3 pływają wolniej niż komórki typu dzikiego. Delecja białka RSP3B znacząco zmniejszyła prędkość pływania komórek *Tetrahymena*.

Różnicowa analiza ilościowa proteomów mutantów *Tetrahymena* pozbawionych jednego z białek trzonu dostarczyła informacji na temat zmiany ekspresji białek rzęskowych oraz wzbogaciła wiedzę na temat partnerów białek badanych oraz białek które bezpośrednio lub pośrednio oddziałują z białkami RS.

Brak białek promieni obniża tempo pływania komórek



Białko	Średnia liczba zidentyfikowanych peptydów				q-value	Różnica	Różnica			
	WT	RSP3A_KO	RSP3B_KO	RSP3C_KO			RSP3A_KO/WT	RSP3B_KO/WT	RSP3C_KO/WT	
RSP2	45,5	29	24,7	33,3	4,62E-01	-0,50	1,96E-02	-1,54	3,11E-01	-0,74
RSP3A	18	0	8,7	13,7	2,40E-04	-5,23	7,48E-02	-1,12	7,10E-01	-0,22
RSP3B	23	27,3	0	25,7	4,99E-01	0,41	1,04E-03	-5,10	6,05E-01	0,30
RSP3C	42	28,7	32,7	0	9,07E-01	-0,06	2,20E-01	-0,53	8,50E-04	-5,47
RSP8	14,5	4,7	1	1,7	4,44E-02	-2,31	1,80E-02	-4,38	4,04E-03	-3,86
RSP16A	30	14,3	15,3	21,3	4,06E-02	-2,62	2,16E-02	-2,25	9,68E-02	-1,59
RSP16B	19	20,3	17,3	6,7	8,80E-01	-0,08	3,40E-01	-0,40	1,22E-03	-5,13
FAP91	33,5	29	17,3	6,7	6,78E-01	-0,21	2,54E-01	-0,54	5,64E-01	-0,34
FAP206	33	21,7	4,3	19	8,79E-01	-0,08	7,93E-04	-4,04	6,66E-01	-0,22

W tabeli przedstawiono przykładowe wyniki różnicowej analizy ilościowej dla wybranych białek rzęskowych.

Projekt nr POWR.03.02.00-00-1007/16-00 realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. This research was supported by OPUS12 2017/25/B/NZ3/01609 grant from National Science Centre, Poland.