

β -ARRESZTIN FEHÉRJE INTERAKCIÓS PARTENEREK KERESÉSE PROMISZKUUS BIOTIN LIGÁZ SEGÍTSÉGÉVEL

Soltész-Katona Eszter^{1,2}, Dr. Turu Gábor^{1,2}, Dr. Drahos László³, Bugyi Fanni³, Dr. Turiák Lilla³,
Dr. Ács András³, Szalai Laura^{1,2}, Porkoláb Edit¹, Dr. Hunyady László^{1,2}

¹ Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet

² MTA-SE Molekuláris Élettani Kutatócsoport

³ TTK - MS Proteomika Laboratórium

A G-fehérje kapcsolt receptor család és annak jelátviteli folyamatai az egyik legintenzívebben kutatott terület a molekuláris orvostudományokban, mivel számos betegség társítható ezekhez a receptorokhoz, valamint sokféle külső környezeti ingerre adott sejtválaszt közvetítenek. A jelátviteli útvonalak beindítása számos célfehérje expresszióját befolyásolja, mely változások jobb ismerete elengedhetetlen az adott ingerekre tapasztalható sejtválaszok megértéséhez. A β -arrestin fontos szabályozó fehérjéje valamennyi G-fehérje kapcsolt receptornak, és kulcsszereplő a receptorok deszenzitizációjában, valamint önálló módon is képes G-fehérje független jelátviteli útvonalakat elindítani. Állvány és regulator fehérjeként pedig számos más interakciós partnere is létezik.

Kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ hogy miként lehetne ezeket az interakciós partnereket azonosítani és sejtspecifikusan is elkülöníteni. Ehhez egy biotin ligáz expresszió alapuló fehérje izoláló rendszert használtunk, melyhez a nemrég felfedezett TurboID biotin ligáz alkalmaztuk, mivel molekuláris közelségben gyorsabb és hatékonyabb biotinizációt eredményez mint a korábban használt biotin ligázok (BirA, BioID). Vad típusú és egy mutáns β -arrestint jelöltünk TurboID ligáz enzimmel, melyeket Alpha_{1a} -adrenerg receptorral együtt kalcium foszfát kotranszfekcióval expresszáltunk HEK-293T sejtekben. A sejteket 1 h-ig stimuláltuk Alpha_{1a} -adrenerg receptor A611603 agonistával, így aktiválta a sejtekben a PKA és PKC fehérjéket, melyek számos jelátviteli útvonalban szerepelnek. Ezzel egyidejűleg a sejtek médiuma a megfelelő fehérje jelöléshez szükséges biotint tartalmazta. Interakció esetén a biotinizált fehérjék a sejtek feltárása után neutravidin gyöngyökhöz kötődnek és azokkal kinyerhetőek. a módszert teszteltük és validáltuk egy fluoreszcensen jelölt ismert β -arrestin fehérjepartnerrel. Stimulációt követően mérhető fluoreszcens jel növekedést tudtunk detektálni a gyöngyök felszínén.

Ahhoz hogy új β -arrestin partnereket azonosítsunk a neutravidin-gyöngyök felszínéről eluáltuk az összes izolált interakciós fehérjét, melyeket tömegspektrométeres vizsgálattal tudunk a továbbiakban azonosítani és kvantifikálni. Ehhez a kérélethez többféle mintaelőkészítési protokollok teszteltünk, majd a legjobbnak bizonyuló beállításokkal elvégeztünk több mérési sorozatot, a vad típusú és mutáns β -arrestinnel is. A mérésekben több, mint 1000 interakciós fehérjét sikerült kvantifikálni, ezen mérések részletesebb kiértékelése folyamatban van bioinformatikai módszerek alkalmazásával.