

Rola fosfatazy CacyBP/SIP w regulacji funkcji białka NPM1 w j drze komórkowym

Cel bada / hipoteza:

Białka to główne składniki komórek odpowiedzialne za prawidłowy przebieg wszystkich procesów biologicznych. Swoje funkcje w komórce pełni zazwyczaj dzięki wzajemnym oddziaływaniom i formowaniu bardziej złożonych kompleksów. Co więcej, białka poddawane są różnym modyfikacjom chemicznym, które wpływają na zmiany ich aktywności biologicznej, lokalizacji oraz inne własności parametry. Białko NPM1 (zwane również nukleofosmin lub B23) zaangażowane jest w szerokie spektrum procesów komórkowych, zwłaszcza tych zachodzących w jądrze, bardziej wyspecjalizowanej części jądra komórkowego, gdzie pełni ono rolę w biogenezie rybosomów, a także w procesach wzrostu i proliferacji komórek. Aktywność NPM1 zależy od tego, czy jest ono ufosforylowane, tzn. czy ma kowalencyjnie przyłączone grupy fosforanowe. Za przebieg fosforylacji odpowiadają białka enzymatyczne zwane kinazami. Ufosforylowane NPM1 jest aktywne i może przemieszczać się z cytoplazmy do jądra i odwrotnie. Jak dotychczas, zidentyfikowano kilka kinaz odpowiedzialnych za fosforylację /aktywację białka NPM1. Niewiele jednak wiadomo na temat enzymów, zwanych fosfatazami, odpowiedzialnych za defosforylację /dezaktywację NPM1. Celem niniejszego projektu jest wykazanie, czy białko odkryte w naszym laboratorium, zwane CacyBP/SIP może regulować funkcję NPM1 w jądrze komórkowym. W ostatnim czasie pokazaliśmy, że CacyBP/SIP jest nową fosfatazą, co oznacza, że defosforyluje inne białka, a zatem może defosforylować NPM1. Co więcej, zarówno CacyBP/SIP, jak i NPM1 są zlokalizowane w jądrze komórkowym. Pokazaliśmy też, że białka te wpływają na proliferację komórek oraz, że poziom obydwu białek jest znacznie podwyższony w komórkach nowotworowych. Przyspieszona proliferacja komórek nowotworowych jest ich nieodłącznym cechem, co sprawia, że rozprzestrzeniają się one po całym organizmie tworząc przerzuty. Biorąc pod uwagę te wszystkie fakty, zakładamy, iż badanie roli oddziaływania pomiędzy CacyBP/SIP i NPM1 oraz zaangażowanie CacyBP/SIP w regulację aktywności NPM1 jest interesującym obiektem badań. Zatem, w celu udowodnienia hipotezy, że CacyBP/SIP może wpływać na aktywność NPM1 i jego funkcję w jądrze komórkowym, planujemy odpowiedzieć na 3 główne pytania:

1. Czy CacyBP/SIP i NPM1 mogą współpracować ze sobą?
2. Czy CacyBP/SIP, zidentyfikowane wcześniej jako fosfataza dla kinazy ERK1/2 defosforyluje NPM1?
3. Czy CacyBP/SIP wpływa na zmiany lokalizacji NPM1 oraz jego zdolności do wiązania z RNA?

Metodologia badawcza:

W celu realizacji projektu zostaną wykonane do wiadczenia z zastosowaniem hodowli komórkowych oraz z zastosowaniem oczyszczonych białek. Wykorzystanie zarówno komórek jak i białek oraz wielu różnorodnych technik biochemii i biologii molekularnej pozwoli uzyskać powtarzalne i wiarygodne wyniki. Jednorodne białko CacyBP/SIP zostanie oczyszczone z bakterii zaindukowanych do produkcji tego białka na zwińkszonej skali. NPM1 będzie zakupione, gdy jest ono dostępne komercyjnie. Oddziaływanie CacyBP/SIP z NPM1 będzie analizowane metodami powszechnie stosowanymi takimi jak: ko-immunoprecypitacja, rozdział w elu poliakrylamidowym czy immunodetekcja. W celu określenia ko-lokalizacji, tj. współwystępowania obydwu tych białek w komórce, zastosowana będzie technika mikroskopii konfokalnej. W celu określenia, czy CacyBP/SIP i NPM1 współpracują ze sobą wykonane zostaną do wiadczenia z użyciem oczyszczonych białek, takie jak: chromatografia powinowactwa, test ELISA czy sieciowanie chemiczne. Aby sprawdzić, czy CacyBP/SIP defosforyluje NPM1 zostanie zastosowana metoda rozdziału białek w dwóch kierunkach (elektroforeza 2D) oraz immunodetekcja. W elektroforezie 2D będą analizowane zarówno lizaty z komórek jak te białka oczyszczone. Sprawdzimy też, czy i jak interakcja CacyBP/SIP wpływa na funkcję NPM1. Z uwagi na fakt, że NPM1 w zależności od stopnia ufosforylowania wiąże się z RNA oraz przemieszcza się z jądra do cytoplazmy i odwrotnie, wpływ CacyBP/SIP na lokalizację NPM1 oraz jego wiązanie z RNA zostaną zanalizowane odpowiednio przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz metody EMSA-RNA.

Uzasadnienie podjęcia danej tematyki badawczej:

Jak dotychczas nie było badane oddziaływanie pomiędzy CacyBP/SIP i NPM1. Zidentyfikowano jedynie jedną fosfatazę odpowiedzialną za defosforylację NPM1. Z uwagi na fakt, że obydwa białka występują w jądrze komórkowym oraz że CacyBP/SIP jest nową fosfatazą, badania nad interakcją CacyBP/SIP-NPM1 są ważne z punktu widzenia roli obu białek w proliferacji komórek. Wyniki uzyskane podczas realizacji niniejszego projektu, dotyczące interakcji pomiędzy CacyBP/SIP i NPM1, defosforylacji NPM1 przez CacyBP/SIP, wewnątrzkomórkowej lokalizacji NPM1 oraz wpływu CacyBP/SIP na wiązanie się NPM1 z RNA, z pewnością znacząco poszerzą wiedzę dotyczącą funkcji obu tych białek w jądrze, a tym samym w proliferacji komórek. Ponieważ sugeruje się, że NPM1 może być nowym celem terapii przeciwnowotworowej, uzyskane wyniki mogą mieć w przyszłości zastosowanie praktyczne.