

Popularnonaukowe streszczenie projektu

Fosfogliceromutaza, zwana w skrócie PGAM, jest białkiem uczestniczącym w jednym z podstawowych procesów metabolicznych w komórkach żywych organizmów – glikolizie. Jej rola w komórce wykształciła się już na bardzo wczesnym etapie ewolucji życia, co ilustruje fakt, że PGAM z organizmu człowieka i bakterii *E. Coli* mają sekwencje aminokwasową identyczną w około 50%. Proces glikolizy i funkcja związanych z nim białek zostały opisane w latach trzydziestych i czterdziestych, i wydawało się, że PGAM nie skrywa już przed nauką żadnych tajemnic. Tym większe było zdziwienie badaczy, gdy odkryto obecność PGAM w jąderkach – podstrukturach jąder komórkowych odpowiedzialnych za syntezę RNA wchodzącego w skład rybosomów. Wyniki badań sugerują, że PGAM znajdująca się w jąderkach może brać udział w regulacji tego, czy i jak często komórki ulegają podziałom. Dzielenie się komórek jest procesem wymagającym niesłychanie precyzyjnej regulacji. Zarówno zbyt częste, jak i zbyt rzadkie podziały komórkowe są charakterystyczne w przebiegu wielu chorób. Niekontrolowane podziały komórkowe leżą u podstaw chorób nowotworowych, natomiast przedwczesny zanik podziałów komórkowych, zwany inaczej starzeniem się komórek, odpowiada ze częścią objawów chorób takich jak cukrzyca typu II, WZW C oraz za niektóre negatywne skutki starzenia się organizmu. Im lepiej poznane są mechanizmy regulujące dowolnych proces w komórce, tym większa jest potencjalna ilość sposobów, na które człowiek mógłby w te procesy ingerować. Wiedza na temat roli jąderkowo zlokalizowanej PGAM w kontroli podziałów komórkowych pozwoli, być może, na opracowanie innowacyjnych terapii skierowanych przeciw wyżej wymienionym przypadłościom. Ponieważ PGAM, podobnie jak wszystkie składniki komórek żywych, nie działa nigdy sama, niezbędnym krokiem na drodze do tej wiedzy jest identyfikacja jej partnerów – białek i innych cząsteczek, z którymi PGAM oddziałuje w jąderkach. Wstępne badania pozwoliły już wytypować najlepszych kandydatów, ale jak każdy wynik badania naukowego należy to potwierdzić za pomocą alternatywnych metod. W tym projekcie planujemy zastosować metodę chromatografii powinowactwa, w której PGAM zostanie połączona z granulkami żelu i w ten sposób unieruchomiona wewnątrz szklanej kolumny. Przez kolumnę zostanie przepuszczony ekstrakt z jąderek, a cząsteczki oddziałujące z PGAM pozostaną razem z nią w żelu. Następnie kolumna zostanie przepłukana roztworem powodującym uwolnienie związanych substancji. Otrzymamy w ten sposób mieszaninę partnerów PGAM. Identyfikacji poszczególnych białek w mieszaninie mamy zamiar dokonać przy pomocy spektrometrii mas. Technika ta polega na rozbiciu cząsteczek na mniejsze, naładowane elektrycznie fragmenty, których masy zostają zmierzone. Każde białko rozpada się na fragmenty o charakterystycznej masie, tworząc coś w rodzaju molekularnego odcisku palca. Porównanie wzoru fragmentacji próbki z bazą danych pozwala na określenie, z jakim białkiem mamy do czynienia. Dodatkowo identyfikację białek potwierdzimy za pomocą techniki Western Blot, która stosuje specyficznym wiążące dane białko przeciwciała. Oddziaływania zidentyfikowanych partnerów z PGAM potwierdzimy korzystając z techniki MST – termoforezy w skali mikro, która wykorzystuje różnice w prędkości ucieczki kompleksów i ich wolnych składników z miejsca roztworu podgrzanego laserem. Technika ta pozwala nie tylko określić czy dane białka oddziałują ze sobą, ale także obliczyć siłę ich wiązania. Potwierdzone w poprzednich etapach oddziaływania mamy zamiar następnie pokazać na preparatach z hodowli komórkowych. W tym celu wykorzystamy technikę FRET. W technice tej używa się dwóch rodzajów przeciwciał połączonych z różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, z których każde specyficznym wiąże jedno badane białko. Barwniki dobrane są tak, aby w odpowiednio bliskiej odległości mogły przekazywać sobie energię wzbudzenia. Jeśli badane białka znajdują się w komórce na tyle blisko, że mogą ze sobą oddziaływać, nastąpi przekazanie energii i przy wzbudzeniu jednego barwnika obserwować będziemy fluorescencję drugiego. Zaplanowane techniki pozwolą na zidentyfikowanie partnerów wiążących PGAM w jąderkach z dużym prawdopodobieństwem oraz wstępną charakteryzację tych oddziaływań. Stworzy to niezbędne podstawy do dalszych badań na rolę, jaką PGAM odgrywa w jąderkach i sposobu, w jaki zaangażowana jest w regulację podziałów komórkowych.