

Badanie specyficzności substratowej niekanonicznej cytoplazmatycznej polimerazy poli(A) TENT5C w limfocytach B

Każda cząsteczka mRNA, będącego matrycą do syntezy białka, aby stać się dojrzałą cząsteczką, ulega specyficznym procesom obróbki. Jednym z nich jest poliadenylacja – zachodzący w jądrze komórkowym proces dodawania do 3' końca mRNA nukleotydów adeninowych niekodowanych w DNA, tzw. „ogona poli(A)”. Proces ten przeprowadzają enzymy – kanoniczne polimerazy poli(A). Jednakże, w komórkach zachodzi także proces cytoplazmatycznej niekanonicznej poliadenylacji polegający na wydłużaniu ogonów poli(A) przez niekanoniczne polimerazy poli(A).

Jedną z takich cytoplazmatycznych polimeraz poli(A) jest zidentyfikowane stosunkowo niedawno białko TENT5C. Gen kodujący to białko jest jednym z najczęściej mutowanych genów u pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego – nieuleczalny nowotwór komórek plazmatycznych, czyli skrajnie zróżnicowanych limfocytów B produkujących przeciwciała. Nasze pierwsze badania wykazały, że TENT5C hamuje rozwój komórek tego nowotworu i efekt ten jest zależny od jego aktywności enzymatycznej. Stąd, aby lepiej poznać rolę TENT5C, chcieliśmy zbadać dokładny mechanizm jego działania na modelu limfocytów B. Jak dotąd wykazaliśmy, że TENT5C wydłuża ogony poli(A) w mRNA kodujących przeciwciała, przez co czas życia tych mRNA jest dłuższy, a produkcja immunoglobulin jest bardziej wydajna. Natomiast myszy pozbawione tego genu wykazują osłabioną odpowiedź immunologiczną na wprowadzenie do organizmu, tzw. antygeny, cząsteczki indukującej reakcję układu immunologicznego. Dodatkowo TENT5C wpływa na tempo podziałów limfocytów B oraz ich różnicowania do komórek plazmatycznych. Całościowo, wskazuje to na istotną rolę TENT5C w odporności.

Jednakże, wiele pytań dotyczących mechanizmu determinującego sposób działania TENT5C w limfocytach B pozostaje otwartych. Jak TENT5C wybiera, które mRNA ma poliadenylować? Czy oddziałuje tylko ze swoimi substratami czy wiąże się z cząsteczkami RNA niespecyficznie, przeprowadzając poliadenylację wyłącznie wybranych? Jaka jest rola lokalizacji komórkowej TENT5C i jak utrata aktywności wpływa na lokalizację tego białka? Celem tego projektu jest znalezienie odpowiedzi na te pytania.

Żeby to osiągnąć wykorzystamy nowy model myszy transgenicznych wyrażających nieaktywne katalitycznie (zatem niezdolne do przeprowadzenia poliadenylacji) białko TENT5C w fuzji ze znacznikiem GFP (białko zielonej fluorescencji). Przeprowadzimy zaawansowane analizy molekularne, stosując dwa alternatywne podejścia, żeby wyizolować RNA, z którymi oddziałuje TENT5C a następnie zidentyfikować je wykorzystując sekwencjonowanie RNA. Wykorzystamy także mikroskopię fluorescencyjną, aby sprawdzić jak różni się lokalizacja komórkowa białka TENT5C w komórkach wyrażających aktywną lub nieaktywną formę tego białka.

Spodziewamy się, że realizacja tego projektu dostarczy nam odpowiedzi na powyższe pytania dotyczące mechanizmu działania niekanonicznej polimerazy poli(A) TENT5C w limfocytach B. Potwierdzimy oddziaływanie TENT5C z mRNA, które poliadenyluje, dowiemy się czy oddziałuje specyficznie ze swoimi substratami, a być może zidentyfikujemy nowe, dotychczas nieznanne substraty. Zweryfikujemy także rolę lokalizacji komórkowej TENT5C. Dzięki rozszyfrowaniu tych kwestii przybliżymy się do dokładnego zrozumienia mechanizmu działania i roli TENT5C w limfocytach B.