

## Streszczenie popularnonaukowe

Dobowe badania metabolomiczne wykazały, że duża część metabolitów zmienia się ilościowo wraz z porą dnia. Najbardziej rytmicznymi metabolitami, jakie zaobserwowano, są lipidy, w tym fosfatydyloinozytyle (PtdIns). PtdIns mogą być modyfikowane przez kinazę i fosfatazę w celu wytworzenia siedmiu różnych fosfoinozytydów (PI). Pomimo ich niewielkiej ilości, PI kontrolują wiele aspektów sygnalizacji komórkowej. W rzeczywistości biorą udział w aktywacji wielu białek i szlaków kontrolujących cykl życiowy komórki. Ponadto, w zależności od bodźców, poziomy i rozkład PI wykazują szeroki zakres zmienności. Nadal nie wiadomo, czy rozkład ten jest zgodny z określonym wzorcem okołodobowym w warunkach podstawowych czy w odpowiedzi na różne bodźce. Co więcej, wpływ tej dynamiki na różne aspekty codziennej sygnalizacji komórkowej i fizjologii, nie był jeszcze przedmiotem badań. Fosfataza fosfoinozytydów kierunkuje i usuwa określone grupy fosforanowe z PI. Jednym z enzymów biorących udział w metabolizmie PI jest inozytol 5'-fosfataza SHIP2. SHIP2 reguluje odpowiedź komórkową na czynnik wzrostu, endocytozę, różnicowanie komórek i onkogenezę. Kilka obserwacji sugeruje bezpośredni związek między sygnalizacją PI a zegarem dobowym. Co więcej, wstępne dane z naszego laboratorium pokazują, że usunięcie lub zahamowanie SHIP2 zmienia ekspresję i oscylacje genów zegarowych. Dlatego białko to zostanie wykorzystane jako model do badania, zależnych od pory dnia, zmian metabolizmu i wzajemnej konwersji PI w regulacji powyższego procesu fizjologicznego. Ten projekt ma trzy główne cele. **W pierwszym** planujemy szczegółowo zbadać, w jaki sposób modyfikacja potranslacyjna i subkomórkowa dystrybucja SHIP2 regulują różne aspekty okołodobowych zmian w transkrypcji. Za pomocą RNA-seq i bioinformatyki zbadamy procesy transkrypcyjne i posttranskrypcyjne, w które to białko jest bezpośrednio zaangażowane. Mutageneza in vitro zostanie wykorzystana do zbadania, w jaki sposób aktywność fosfatazy lipidowej i funkcja adaptacyjna SHIP2 modulują jądrową strukturę subkomórkową, taką jak plamki jądrowe i modyfikacje chromatyny. Frakcjonowanie komórkowe połączone ze standardową spektrometrią mas zostanie wykorzystane do zbadania roli organizacji i dynamiki plamek jądrowych SHIP2. Ponadto, organizacja chromatyny, taka jak posttranslacyjne modyfikacje histonów, zostanie zbadana za pomocą immunoprecypitacji chromatyny i wysokoprzepustowego sekwencjonowania. W połączeniu, eksperymenty te określą dokładną funkcję SHIP2 w regulacji transkrypcji zegara molekularnego. **W drugim celu** zbadamy rolę SHIP2 w transdukcji sygnału za pośrednictwem czynników wzrostu. Wykorzystamy mutagenezę in vitro do zbadania, w jaki sposób fosforylacja SHIP2 za pośrednictwem czynników wzrostu wpływa na jego aktywność 5-fosfatazy lipidowej przy użyciu kodowanych genetycznie sond fluorescencyjnych i obrazowania komórek. Wpływ tych modyfikacji na funkcję adaptera SHIP2 zostanie zbadany za pomocą koimmunoprecypitacji i standardowej spektrometrii mas. Następnie zostanie przeprowadzona analiza fosfoproteomu umożliwiająca odkrycie aktywności różnych szlaków sygnałowych, w które to białko jest bezpośrednio zaangażowane. Bioczujniki i reportery okołodobowe w połączeniu z obrazowaniem żywych komórek umożliwią określenie dokładnej funkcji SHIP2 we wzroście i różnicowaniu komórek. Przeprowadzone zostaną również badania funkcjonalne w celu oceny różnych domen SHIP2 i ich partnerów w regulacji tych procesów. **W trzecim celu** skupimy się na roli SHIP2 i jego różnych formach w sygnalizacji komórek rakowych. Mutageneza in vitro, stabilne strategie knockdown i nadekspresji zostaną wykorzystane do zbadania roli SHIP2 we wzroście komórek rakowych, migracji i wzroście niezależnym od zakotwiczenia. W tym miejscu zostaną również omówione zmiany w tych procesach zależne od pory dnia. Rola i aktywność szlaków sygnałowych odkrytych w celu 1 i 2 zostaną tutaj szczegółowo omówione. Ich funkcjonalny udział we wzroście nowotworu i oporności na terapię zostanie przeprowadzony przy użyciu modeli heteroprzyszczepów nowotworowych jako systemu in vivo. Jako, że rola fosfoinozytydów w regulacji różnych aspektów fizjologii okołodobowej została zbadana, wyniki tego projektu zapewnią przyszłe możliwości terapii kombinatorycznej w leczeniu chorób, takich jak nowotwory.