

Streszczenie pracy doktorskiej

mgr Julia Kaźmierczak-Barańska

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych

Tytuł pracy: „Charakterystyka funkcjonalna białek z rodziny striatyn”

Mikrotubule stanowią wysoce dynamiczny element cytoszkieletu komórkowego i pełnią kluczowe funkcje w biologii komórki. Dynamika mikrotubul regulowana jest poprzez białka oddziałujące z mikrotubulami (MAP; microtubule associated proteins). Białka MAP są fosfoproteinami, których aktywność biologiczna regulowana jest za pomocą enzymów wewnątrzkomórkowych: kinaz i fosfataz.

Striatyna (i pozostałe białka z niewielkiej rodziny striatyn: SG2NA oraz zinedina) stanowi jedną z wielu możliwych w komórce, podjednostek regulatorowych kompleksu fosfatazy serynowo-treoninowej 2A (PP2A). Celem badań w ramach rozprawy doktorskiej mgr Kaźmierczak-Barańskiej było: (i) wyjaśnienie czy striatyna bierze udział w regulacji funkcji cytoszkieletu komórkowego oraz (ii) próba wyjaśnienia mechanizmu tej regulacji. Podjęte badania mają swoje źródło w obserwacji, iż striatyna kolokalizuje się z mikrotubulami w komórkach CHO (Chinese hamster ovary) i w płytkach krwi. Obserwacja ta stała się podstawą do badań realizowanych w ramach projektu NCN, pt.: „Wpływ striatyny na organizację mikrotubul w komórkach eukariotycznych” oraz projektu służącego rozwojowi młodych naukowców, w tym uczestników studiów doktoranckich, w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, pt: „Analiza oddziaływania striatyny z mikrotubulami oraz z białkami towarzyszącymi mikrotubulom w komórkach 293T”.

W pierwszym etapie badań sprawdzono czy striatyna oddziałuje z następującymi białkami: podjednostką katalityczną fosfatazy PP2A, tubuliną i białkami MAP (MAP2 i tau). W tym celu wykorzystano przeciwciała specyficznie rozpoznające badane białka. Uzyskane wyniki potwierdziły oddziaływanie striatyny z PP2A, wykazano oddziaływanie striatyny z białkiem MAP2 oraz stwierdzono brak oddziaływania z białkiem tau. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie bezpośredniego oddziaływania striatyny z tubuliną. Oddziaływanie to może mieć charakter pośredni, w którym uczestniczą białka MAP2, poprzez które striatyna może wpływać na dynamikę mikrotubul.

Kolejny etap badań polegał na zbadaniu w jaki sposób reagują komórki na obniżenie ekspresji striatyny. Badania te wykonano na modelowej linii komórek 293T. Za pomocą odpowiednio wyselekcjonowanych narzędzi jakimi są cząsteczki siRNA, przeprowadzono serię eksperymentów, w których efektywnie obniżono endogenną ekspresję striatyny. Następnie sprawdzono za pomocą specyficznych przeciwciał poziom ufosforylowania białka MAP2. Wykazano, że wyciszenie striatyny prowadzi do hiperfosforylacji MAP2. Następnie

stwierdzono, że obniżenie ekspresji genu striatyny w komórkach 293T spowodowało obniżenie ilości mikrotubul we frakcji cytoszkieletowej.

W związku ze stwierdzonym wpływem striatyny na organizację mikrotubul, oceniono także tempo proliferacji komórek z obniżoną ekspresją genu striatyny i zaobserwowano zahamowanie wzrostu w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zmierzono także aktywność kaspaz proapoptotycznych w komórkach 293T z wyciszonym genem striatyny. Wyciszenie striatyny spowodowało obniżenie aktywności kaspazy 3 i 7.

W kolejnych badaniach sprawdzono jaki wpływ na cykl komórkowy ma wyciszenie striatyny. Zaobserwowano, że obniżenie ekspresji genu striatyny w 293T prowadzi do akumulacji komórek w fazie G0/G1 i zmniejszenia ilości komórek w fazie S.

W ostatnim etapie zbadano czy wyciszenie wszystkich trzech genów białek z rodziny striatyn spowoduje dodatkowe obniżenie tempa proliferacji komórek 293T oraz silniejszy wpływ na cykl komórkowy w porównaniu do wyciszenia jednego genu - striatyny. Zarówno analiza tempa proliferacji jak i poziomu aktywności kaspaz 3 i 7 nie wykazała pogłębienia efektów obserwowanych dla wyciszenia striatyny. Natomiast analiza cyklu komórkowego wykazała, że obniżenie ekspresji wszystkich trzech genów z rodziny striatyn powoduje większe zmiany w rozkładzie komórek w poszczególnych fazach cyklu w porównaniu do efektu wywołanego przez wyciszenie genu striatyny. Zaobserwowano zwiększenie populacji komórek w fazie G0/G1, kosztem liczebności komórek w fazie S w porównaniu do komórek kontrolnych.

Podsumowując striatyna stanowiąca komponent regulatorowy holoenzymu PP2A, oddziałuje z białkami MAP2, uczestniczy w procesie defosforylacji białek MAP2 oraz za pośrednictwem tych procesów może wpływać na stabilność mikrotubul.