

09. IDENTIFICATION OF PROTEINS INTERACTING WITH PLUS ENDS OF MICROTUBULES FORMING CILIARY DISTAL SEGMENT AND THEIR FUNCTIONAL ANALYSIS

Supervisor: Ewa Joachimiak, PhD Dsc.
Laboratory: Laboratory of Cytoskeleton and Cilia Biology
www: <https://nencki.edu.pl/laboratories/laboratory-of-cytoskeleton-and-cilia-biology/>

Background

Joubert Syndrome (JS), a rare hereditary neurodevelopmental disorder is a ciliopathy caused by primary cilia dysfunction. It was recently linked to mutations in ARMC9, TAGARAM1, and CEP104, proteins residing in the cilium distal domain, a poorly characterized ciliary sub-structure.

Based on ultrastructural, proteomic, and functional differences, cilium can be divided into three segments: proximal (the transition zone), middle (ciliary shaft), and distal (cilia tip, CT). While the structure, composition, and function of the transition zone and ciliary shaft are well documented, little is known about the ciliary tip. It is suggested that ciliary tip is involved in the regulation of ciliary signals transduction (e.g. Sonic hedgehog, Shh) and cilia assembly, stability, and elongation. In unicellular organisms ciliary tip defects reduce cell motility. The proteins forming the ciliary tip structure are mostly unknown. ARMC9 and TOGARAM1 are ciliary tip proteins that reside at the plus ends of the ciliary doublet microtubules and play a role in the regulation of their length.

Aim

The goal of this project is identification of other proteins residing in the cilia distal domain including those that interact with ARMC9 and TOGARAM. For this, we will engineer transgene cells expressing tagged ARMC9 and TOGARM1 proteins and identified new cilia tip components by performing BioID assays enabling identification of proteins in close vicinity to ARMC9 and TOGARM1 and coIP assays to find proteins forming stable complex with ARMC9 or TOGARM1. The presence of the identified candidate proteins in the ciliary tip will be verified by immunofluorescence. The interactions between ARMC9 or TOGARAM and newly identified proteins (direct versus indirect) will be analyzed using pull-down and/or in-situ cross-link assays. Finally, to understand the role of newly identified ciliary distal domain proteins, we will engineer knockout cell lines and analyze their phenotype.

Requirements

- strong background in cell biology,
- basic skills in microscopy and molecular biology as well as experience in cell culture,
- strong motivation to work, good organizational skills, team work skills, attention to detail,
- ability to communicate fluently in English

09. IDENTYFIKACJA BIAŁEK ZWIĄZANYCH Z KOŃCAMI PLUS MIKROTUBUL DYSTALNEJ DOMENY RZĘSKI I ICH ANALIZA FUNKCJONALNA

Promotor: Dr hab. Ewa Joachimiak
Pracownia: Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek
www: <https://nencki.edu.pl/laboratories/laboratory-of-cytoskeleton-and-cilia-biology/>

Opis

Syndrom Jouberta, rzadka dziedziczna choroba neurorozwojowa, jest ciliopatią związaną z dysfunkcją rzęski pierwotnej. W ostatnim czasie wykazano, że choroba ta związana jest z mutacjami w białkach ARMC9, TAGARAM1, and CEP104, które lokalizują się w słabo scharakteryzowanej części dystalnej rzęski.

W budowie rzęski wyróżnia się trzy główne segmenty: proksymalny (ang. transition zone), środkowy (ang. ciliary shaft) i dystalny (ang. cilia tip). Struktura, skład białkowy i funkcje proksymalnego i środkowego segmentu rzęski są stosunkowo dobrze udokumentowane, podczas gdy niewiele wiadomo na temat segmentu dystalnego rzęski. Do tej pory zidentyfikowano tylko kilka białek budujących strukturę segmentu dystalnego rzęski. Dostępne dane sugerują, że białka te zaangażowane są w przekazywanie sygnałów (np. szlak Sonic hedgehog, Shh), regulację biogenezy rzęski, kontrolę długości całej rzęski oraz długości segmentu dystalnego. U organizmów jednokomórkowych uszkodzenie części dystalnej rzęski spowalnia ruch komórki. Białka tworzące część dystalną rzęski w większości są nieznanne. Białka ARMC9 i TOGARAM1, wykryte na końcu dystalnym rzęsek, lokalizują się na końcach plus mikrotubul dubletów peryferyjnych i biorą udział w regulacji długości rzęski.

Cel projektu

Celem projektu jest identyfikacja nowych białek oddziałujących z końcami plus mikrotubul budujących segment dystalny rzęski, w tym białek oddziałujących z ARMC9 i TOGARAM1. W tym celu, zostaną uzyskane linie komórek zdolne do produkcji białek ARMC9 i TOGARAM1 jako białek fuzyjnych z odpowiednią etykietką. Badania przeprowadzone na tych komórkach umożliwią identyfikację białek znajdujących się w najbliższym sąsiedztwie białek ARMC9 i TOGARAM1 (doświadczenia typu BioID) oraz białek bezpośrednio lub pośrednio z nimi oddziałujących (koimmunoprecypitacja). Obecność nowo zidentyfikowanych białek w rejonie dystalnym rzęski będzie weryfikowana metodą immunofluorescencji pośredniej. Oddziaływanie (bezpośrednie lub pośrednie) pomiędzy białkiem ARMC9 lub TOGARAM1 a nowo zidentyfikowanymi białkami końca dystalnego będzie badane przy użyciu metod pull-down i cross-linking. Następnie otrzymamy mutanty pozbawione nowo zidentyfikowanych białek rzęskowych, które są specyficznie obecne w końcu dystalnym rzęski i przeanalizujemy wpływ tych delecji na funkcjonowanie rzęsek i komórek.

Wymagania

- dobra znajomość biologii komórki,

- umiejętność posługiwania się podstawowymi metodami mikroskopowymi i biologii molekularnej oraz doświadczenie w hodowli komórek są mile widziane, ale niekonieczne,
- silna motywacja do pracy, zdolności organizacyjne, umiejętność pracy w zespole, staranność, zwracanie uwagi na szczegóły,
- dobra znajomość języka angielskiego.