

Błony komórek eukariotycznych uorganizowane są w funkcjonalne domeny białkowo-lipidowe, z których największe zainteresowanie badaczy budzą tzw. tratwy błonowe. W przeciwieństwie do większości błony, która jest w fazie płynnej, domeny te stanowią fazę bardziej uporządkowaną. Podstawową formą tych domen w błonach komórek eukariotycznych są tratwy spoczynkowe o średnicy ok. 20 nm i połowicznym czasie życia ok. 1 sek. Są zatem niewidoczne w tradycyjnych mikroskopach optycznych i konfokalnych. Charakteryzuje je zwiększona zawartość cholesterolu i sfingolipidów oraz występowanie w nich kilku rodzajów białek błonowych, takich jak stomatyna, czy flotilliny, które są ich permanentnymi „mieszkańcami” oraz innych, często tylko czasowo z nimi związanych, wśród nich receptorów łącznie z receptorami czynników wzrostowych. Tratwy grupują, jak się uważa, receptory i ich partnerów w wielu szlakach sygnałowych, przez co biorą udział w regulacji wielu podstawowych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, wzrost oraz migracja jak również niektóre rodzaje endocytozy. Stanowią one także miejsce interakcji różnych patogenów, np. wirusów z komórką.

Jakkolwiek badania tratw trwają od ponad 20 lat problem biologicznego mechanizmu leżącego u podstaw ich organizacji i regulacji w błonie komórki nie stanowił dotąd przedmiotu intensywnych badań. Nasze poprzednie projekty doprowadziły do opisu nowego mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw organizacji spoczynkowych tratw błonowych w erytrocytach i komórkach pochodzących od ich prekursorów. Wykazaliśmy, że za proces ten odpowiada białko MPP1(membrane palmitoylated protein-1) i jego oddziaływanie z flotillinami. MPP1 jest głównym substratem palmitoilacji w erytrocytach a gen je kodujący ulega intensywnej ekspresji także w innych komórkach krwi i ich prekursorach, ale nie w wielu komórkach linii pochodzenia ludzkiego. Zatem, nie wyjaśniony pozostaje mechanizm leżący u podstaw organizacji tratw błonowych w komórkach, w których ekspresja genu *MPP1* jest niska. Wiedząc, że tratwy błonowe pełnią rolę w wielu procesach biologicznych, pytanie, które zadajemy to pytanie o mechanizm molekularny organizacji i regulacji spoczynkowych tratw błonowych w komórkach innych niż komórki krwi i ich prekursorów.

Nasza hipoteza zakłada, że mechanizm organizacji jest podobny do opisanego wyżej komórek, z tym że białko lub białka odpowiedzialne za organizację tych domen jest/są inne. Opierając się na naszych poprzednich rezultatach zakładamy, że jest to białko lub białka oddziałujące z flotilliną -1, -2 (lub ich heterodimerem), podobnie jak w przypadku białka MPP1. Zatem, planujemy przeanalizować „interaktom”, flotillin, czyli zidentyfikować białka komórkowe oddziałujące z flotillinami, stosując „pull down assay”(wyławianie), gdzie „przynętą” będzie rekombinowana flotillina-1 lub -2 związane ze złożem chromatograficznym. Innym podejściem standardowym jest zastosowanie drożdżowego systemu dwuhybrydowego, który na drodze mechanizmu genetycznego pozwala wykrywać białka oddziałujące z wybranym białkiem w komórce. Białka wiążące flotillinę-1 lub -2 poddamy identyfikacji przy pomocy zaawansowanych technik chemicznych i molekularnych a uzyskane wyniki poddamy weryfikacji stosując techniki biologii molekularnej i komórkowej. Wybrane w wyniku powyższych procedur białka przeanalizujemy pod kątem udziału w mechanizmie organizacji tratw błonowych poprzez unieczynnienia genu kodującego badane białko lub/i zmniejszenia poziomu jego syntezy stosując zaawansowane metody obrazowania zmian właściwości fizykochemicznych błony, takie jak: przede wszystkim FLIM (mikroskopia obrazowania czasu życia fluorescencji oraz svFCS (odmiana spektroskopii korelacji fluorescencji). Dokonamy analizy wpływu eliminacji/obniżenia poziomu badanego białka na funkcje błony komórek w hodowli, funkcje receptorów błonowych oraz ruchliwość komórek i ich przeżywalność. Dokonamy także charakterystyki interakcji rekombinowanych białek-kandydatów z flotillinami w systemach modelowych i rekonstruowanych błonach sztucznych, które pozwolą na uzyskanie informacji dotyczących molekularnego mechanizmu organizacji i regulacji spoczynkowych tratw błonowych.

Nasze wstępne badania zdają się potwierdzać słuszność hipotezy, bowiem stosując podejście „wyławiania” partnerów flotilliny-2 z pomocą techniki proteomicznej opartej na spektrometrii mas zidentyfikowaliśmy białko EFR3A, które spełnia kryteria „organizatora” tratw błonowych w komórkach HeLa. Jego interakcja z flotilliną-2 pozostawała jak dotąd nieznaną. Ważnym wnioskiem ze wspomnianych badań jest to, że wybrane podejście metodyczne oraz system weryfikacji funkcji w organizacji spoczynkowych tratw błonowych zostały sprawdzone z powodzeniem. Uzyskane w wyniku proponowanych badań dane powinny umożliwić zrozumienie molekularnych podstaw organizacji i regulacji spoczynkowych tratw błonowych a także, jak mniemamy ich roli w kontroli szlaków sygnalizacji komórkowej związanych z nowotworzeniem i przerzutowaniem. Może zatem przyczynić się do odkrycia „celu” dla nowych leków.

Proponowany projekt charakteryzuje się multidyscyplinarnym podejściem włączając metody biologii molekularnej i komórkowej, klasycznej biochemii a przede wszystkim biofizyki, głównie zaawansowanych metod obrazowania komórek. Nasze doświadczenie w pionierskich badaniach nad mechanizmem organizacji tratw spoczynkowych w komórkach erytroidalnych pozwala przewidywać uzyskanie rezultatów zmierzających do sformułowania oryginalnego, ogólnego modelu ważnego zjawiska biologicznego.