

Lateralna organizacja błony komórkowej utrzymywana jest poprzez obecność tratw błonowych, dynamicznych struktur białkowo-lipidowych, których istotną rolę wykazano w wielu procesach biologicznych. Pomimo wielu lat badań, wciąż nie wiadomo jakie mechanizmy regulują ich tworzenie. Uważa się, że formowanie tratw błonowych jest wynikiem licznych oddziaływań lipid-białko, lipid-lipid oraz białko-białko. Obecna hipoteza zakłada, iż oddziaływania te inicjują łączenie się niewielkich, kilkucząsteczkowych kompleksów białek i lipidów w większe, stabilne i funkcjonalne tratwy błonowe. Obecność białek w tratwach błonowych regulowana jest przeważnie poprzez ich modyfikacje kwasami tłuszczowymi, a jedną z najczęściej występujących jest palmitylacja. Najnowsze badania wykazują, iż palmitylacja białek jest odpowiedzialna nie tylko za ich lokalizację w tratwach błonowych, ale może brać udział również w stabilizacji tych domen. Przedmiotem naszych badań jest palmitylowane białko MPP1 (Membrane Palmitoylated Protein 1), które jest peryferyjnym białkiem należącym do rodziny białek MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase). Wykazano, że białko MPP1 pełni rolę molekularnego przełącznika, regulującego tworzenie funkcjonalnych tratw błonowych w komórkach erytroidalnych. Wyciszenie ekspresji genu *MPP1* w komórkach erytroidalnych powodowało zaburzoną organizację tratw błonowych skorelowaną z obniżeniem płynności błony komórkowej oraz zahamowaną aktywacją szlaków sygnałnych receptorów zależnych od tratw błonowych. Podobne wyniki uzyskano przy zahamowaniu procesów palmitylacji komórkowej, co sugeruje możliwą rolę palmitylacji białka MPP1 w mechanizmie organizacji tratw błonowych. Dalsze badania nad rolą białka MPP1 w tworzeniu tratw błonowych doprowadziły do scharakteryzowania flotyliny 1 i flotyliny 2, białkowych markerów tratw, jako bezpośrednich partnerów białka MPP1. Na podstawie powyższych wyników postawiliśmy hipotezę mówiącą, iż palmitylacja białka MPP1 jest kluczowa w wiązaniu się tego białka z błoną, a następnie w formowaniu funkcjonalnych tratw błonowych, opartych na kompleksach flotylinowych. Jakkolwiek, jednym z niewyjaśnionych zagadnień pozostaje to, czy palmitylacja białka MPP1 uczestniczy w tworzeniu tratw błonowych, czy działa jedynie jako sygnał kierujący białko do tratw. MPP1 zawiera cztery reszty cysteinowe w pozycjach 94, 179, 242 oraz 454, z których cysteinę 242 wskazano jako potencjalne miejsce palmitylacji. Jednak nasze najnowsze dane wskazują, że białko MPP1 posiada kilka palmitylowanych reszt cysteinowych. Wynik ten rodzi bardzo ciekawe pytanie, czy palmitylacja poszczególnych reszt oraz konfiguracja/wzorzec palmitylacji może mieć istotny wpływ na właściwości fizykochemiczne błon. Innym interesującym zagadnieniem jest to, czy palmitylacja wszystkich cystein jest konieczna dla procesu tworzenia tratw błonowych, czy może modyfikacja poszczególnych reszt wpływa w różny sposób na funkcję białka MPP1. Dlatego głównym celem tego projektu jest szczegółowe scharakteryzowanie roli palmitylacji białka MPP1 w kontekście jego potencjału organizowania tratw błonowych w błonach żywych komórek oraz modelowych systemach błonowych. Pierwszym etapem badań będzie identyfikacja miejsc palmitylacji poprzez przygotowanie serii mutantów C/A białka MPP1 z zamienionymi resztami cysteinowymi na reszty alaninowe oraz ich nadekspresję w komórkach z wyciszoną ekspresją endogennego białka MPP1. Następnie przy użyciu metod APE (Acyl-PEG Exchange) oraz Acyl-RAC (Resin-Assisted Capture), zostanie sprawdzony poziom ich palmitylacji. Z kolei zdolność wiązania do błony/tratw błonowych poszczególnych mutantów C/A zostanie sprawdzona poprzez analizę lokalizacji tych białek w wyizolowanych frakcjach DRM (Detergent Resistant Membranes) oraz obrazowanie mikroskopowe ich kolokalizacji z określonymi fazami błonowymi w pęcherzykach GPMV (Giant Plasma Membrane Vesicles). Wytypowane w wyniku tych eksperymentów mutanty, zostaną następnie wykorzystane do dalszych badań: m.in. płynności błony żywych komórek oraz pęcherzyków GPMV z wykorzystaniem techniki obrazowania czasu życia fluorescencji – FLIM (Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy). Kolejny etap projektu będzie obejmował badania z wykorzystaniem rekombinowanego białka MPP1 i jego mutantów C/A oraz błon modelowych jakimi są olbrzymie jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (LUV). Zdolność wiązania rekombinowanych białek z pęcherzykami LUV o różnym składzie lipidowym zostanie sprawdzona przy użyciu testów flotacji oraz interferometrii biowarstwy (BLI). Ostatnim etapem będzie analiza zmiany właściwości fizykochemicznych liposomów inkubowanych z rekombinowanym białkiem MPP1 lub jego mutantami, poprzez wyznaczenie współczynnika generalnej polaryzacji (GP) sond fluorescencyjnych, czułych na zmiany uporządkowania lipidów. Zaproponowany plan badań ma na celu odpowiedzieć na bardzo ważne pytanie, w jaki sposób palmitylacja białka MPP1 wpływa na organizację lateralną błony żywych komórek. Ze względu na fakt, że wiele procesów komórkowych zależy od obecności funkcjonalnych tratw błonowych, problem dotyczący ich powstawania jest niezwykle istotny. Co więcej, zrozumienie mechanizmu tworzenia tratw błonowych i roli palmitylacji białek w tym procesie może doprowadzić do wyjaśnienia mechanizmów różnych chorób powiązanych z nieprawidłową palmitylacją białek (a tym samym organizacją tratw), w tym chorób neurodegeneracyjnych lub niektórych nowotworów.