

Badanie oddziaływania kwasu fosfatydowego z białkiem mTOR oraz wpływ cholesterolu na tę interakcję

STRESZCZENIE

Białko mTOR należy do jednych z najważniejszych białek w komórce, ponieważ jest zaangażowane w kontrolę jej wzrostu. Jedną z cząsteczek aktywujących mTOR jest kwas fosfatydowy (PA). Aktywacja następuje poprzez jego wiązanie się z domeną FRB białka. Mechanizm tej aktywacji pozostaje jednak niewyjaśniony. Niektóre badania wskazują, że aktywność mTOR zależy od źródła PA. Zasugerowano, że PA utworzone na drodze różnych szlaków syntezy w żywej komórce różnią się strukturą łańcuchów acylowych, stąd ich zróżnicowana zdolność do wiązania i aktywowania białek. Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie, czy długość łańcucha acylowego PA i stopień jego nasycenia są determinantami specyficzności wiązania PA przez mTOR. Ponadto projekt zakładał zbadanie wpływu cholesterolu na oddziaływanie PA z mTOR. Wiadomym jest, że cholesterol odgrywa kluczową rolę w formowaniu tratw lipidowych, zatem jego obecność może sprzyjać powstawaniu niehomogenności lateralnej w błonie i lokalnej koncentracji PA, a to z kolei może indukować wiązanie z białkiem.

Praca wykorzystwała do badań modelowe systemy błonowe, a do projektu wybrano trzy różne kwasy fosfatydowe, odzwierciedlające główne pule PA w komórce. W serii eksperymentów porównano zdolność wiązania domeny FRB z pęcherzykami lipidowymi zawierającymi różne PA z cholesterolem i bez, przy użyciu testu flotacji i mikroskopii konfokalnej. Mikroskop konfokalny został również wykorzystany w technice FRAP, co pozwoliło ocenić, czy obserwowane różnice w oddziaływaniu FRB z PA o różnej strukturze korelują z różnym zachowaniem się FRB na powierzchni błony. Ponadto wykorzystano metodę BLI do analizy kinetycznej i porównania oddziaływania na poziomie molekularnym w czasie rzeczywistym. Określono również podstawowe parametry kinetyki wiązania, takie jak stała szybkości asocjacji (K_a), stała szybkości dysocjacji (K_d) i równowagowa stała wiązania (K_D).