

Białko EFR3A jako potencjalny partner flotyliny 2 oraz możliwy organizator tratw spoczynkowych

Przedmiotem niniejszej rozprawy jest próba określenia mechanizmu tworzenia i regulacji tratw błonowych w plazmolemnie komórek zwierzęcych. Według koncepcji zaproponowanej przez Simonsa i Ikonen błony żywych komórek nie są lateralnie homogenne i zawierają wysoce dynamiczne struktury takie jak: kompleksy białkowo - lipidowe (prekursory tratw < 10 nm) i nanodomeny (tratwy spoczynkowe > 10 nm). Prekursory tratw mogą łączyć się ze sobą tworząc tratwy błonowe zwane również „tratwami spoczynkowymi”, a te z kolei mogą tworzyć platformy sygnalizacyjne. Tratwy zbudowane są z lipidów fazy l_o , przede wszystkim z cholesterolu, i zestawu charakterystycznych białek. Zarówno tratwy spoczynkowe jak i mikrodomeny/platformy sygnalizacyjne poprzez wpływ na zmiany ruchliwości oraz zmiany konformacyjne wynikające z asocjacji/dysocjacji białek z tymi domenami regulują ich aktywność pełniąc kluczową rolę w regulacji wielu ważnych procesów biologicznych takich jak np. przekazywanie sygnałów pochodzących z receptorów czynników wzrostu związanych z proliferacją i kontrolą ruchliwości komórek. Uczestniczą też w transporcie lipidów i białek. Wszystkie te procesy sprawiają, że tratwy błonowe pełnią ważną rolę w procesach związanych z odpornością, interakcjach patogen-gospodarz a także w neoplazji.

Wcześniejsze badania zespołu Zakładu Cytobiochemii wskazują na to, że specyficzne interakcje białek z rodziny flotylin i białka MPP1 wydają się odpowiedzialne za organizację i regulację domeny tratwy błonowej w komórkach erytroidalnych. Dlatego w niniejszej pracy założono, że tworzenie sieci białkowej opartej na flotylinie oddziałującej z określonymi lipidami leży u podstaw mechanizmu tworzenia i regulacji domen tratw w komórkach, które nie ekspresjonują *MPP1* na wysokim poziomie. Flotyliny są wysoce konserwatywnymi peryferyjnymi białkami błonowymi. Białka te są wszechobecne w organizmach eukariotycznych i należą do rodziny białek, które charakteryzują się występowaniem domeny SPFH (stomatyna/prohibityna/flotyliny oraz HflK/C). Flotyliny są jednymi z głównych białek tratw błonowych, które są stale związane z nanodomenami i pozostają z nimi ściśle związane pomimo np. usunięcia cholesterolu z błony.

W niniejszej pracy zastosowano podejście powinowactwa oparte na unieruchomionej na złożu, rekombinowanej flotylinie 2 celem wyodrębnienia i zidentyfikowania partnera białkowego za pomocą techniki MS/MS. Zidentyfikowane tą techniką białko może być odpowiedzialne za organizację i regulację domeny tratw. Zastosowanie chromatografii powinowactwa pozwoliło zidentyfikować EFR3A jako potencjalne białko, które oddziałuje z flotyliną 2. Interakcję pomiędzy flotyliną 2 i EFR3A potwierdzono za pomocą tego samego podejścia, ale identyfikację przeprowadzono techniką western blot z użyciem przeciwciał przeciw EFR3A, a także za pomocą ko-immunoprecypitacji. Interakcja pomiędzy flotyliną 2 i EFR3A została również potwierdzona w teście „overlay assay” z użyciem rekombinowanego białka EFR3A i rekombinowanej flotyliny 2. Ponadto stwierdzono, że EFR3A jest stabilnym składnikiem frakcji DRM komórek HeLa a jego obecność okazała się wrażliwą na usunięcie cholesterolu z błony. Wyciszenie ekspresji genu *EFR3A* może wspierać hipotezę, że białko to jest stabilnym składnikiem domeny tratwowej i może być zaangażowane w organizację i regulację tej domeny. W komórkach z obniżonym poziomem EFR3A tzw. komórkach KnD zaobserwowano zmniejszenie uporządkowania błony plazmatycznej żywych komórek. Dotyczyło to również olbrzymich pęcherzyków błonowych błony plazmatycznej (GPMV) pochodzących z komórek z obniżonym poziomem EFR3A. Ponadto dane otrzymane metodą spektroskopowej korelacji fluorescencji (svFCS) wskazują na zwiększoną ruchliwość sondy tratwowej (fluoryzujący analog sfingomieliny) w komórkach KnD *EFR3A*. Konsekwencje wyciszenia genu *EFR3A* nie są efektem przypadkowym ale są specyficzne i ściśle powiązane z EFR3A. Jak wykazano po transfekcji komórek KnD *EFR3A* wektorem „rescue” kodującym EFR3A, błony żywych komórek w analizie FLIM i svFCS wykazały tendencję powrotną jeśli chodzi o parametry fizyko-chemiczne błony plazmatycznej/plazmolemy. W analizowanej drugiej linii komórkowej MCF7 obserwowano mniejszy wpływ wyciszenia genu EFR3A na płynność błony.

Wykazano również, że wyciszenie ekspresji EFR3A wpływa na zależne od EGF wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} . Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na interakcję flotyliny 2 i białka EFR3A, na temat której nie ma dotąd żadnych informacji w literaturze i bazach danych. Co więcej, według kilku kryteriów interakcja między flotyliną 2 a białkiem EFR3A wydaje się odpowiedzialną za organizację i regulację tratw błonowych. Wyniki otrzymane z analizy cytometrycznej, wskazują również na udział tej interakcji w regulacji co najmniej kilku procesów komórkowych w tym związanych z kontrolą cyklu komórkowego,

mianowicie obserwowano zwiększenie czasu trwania fazy cyklu G0/G1 i fazy S w porównaniu do komórek kontrolnych.

Opisana interakcja nie została dotychczas zaobserwowana. Według kryteriów przyjętych dla MPP1 białko EFR3A może okazać się „organizatorem” domeny tratwowej ponieważ:

- oddziałuje z flotyliną 2,
- jest białkiem błonowym lokalizującym się we frakcjach DRM a jego lokalizacja jest wrażliwa na usunięcie z błony cholesterolu.
- obniżenie poziomu ekspresji genu *EFR3A* powoduje zmniejszenie uporządkowania błony komórkowej.