

# **Wpływ białka MPP1 na organizację tratw spoczynkowych w błonach komórkowych**

## **STRESZCZENIE**

Intensywne badania struktury błony komórkowej wykazały, iż zaproponowany w latach siedemdziesiątych przez Singera i Nicolsona model płynnej mozaiki wymaga uaktualnienia, z powodu braku homogenności w płaszczyźnie lateralnej. Wykazano, iż zawiera ona wysoce dynamiczne struktury, jak nano- i mikrodomeny. Domeny te, zwane tratwami błonowymi, powstają oraz są stabilizowane dzięki licznym oddziaływaniom pomiędzy lipidami (głównie cholesterolem oraz sfingomieliną) budującymi błonę, białkami błonowymi i lipidami, a także pomiędzy samymi białkami zlokalizowanymi w obrębie dwuwarstwy. Są to wysoce dynamiczne struktury, które ciągle tworząc się oraz rozpadając, umożliwiają rozdzielanie w czasie oraz przestrzeni, licznym procesów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórek oraz całego organizmu. W błonie komórkowej występują tzw. prekursorzy tratwowe (nanodomeny), będące niewielkimi (ok. 10 nm), uporządkowanymi, dynamicznymi kompleksami białek oraz lipidów, wzbogacone w sterole oraz sfingolipidy. Struktury te, oligomeryzując, mogą łączyć się ze sobą w większe, stabilne kompleksy, tzw. tratwy spoczynkowe (mikrodomeny), zdolne do aktywacji wielu istotnych procesów komórkowych takich jak: transdukcja sygnału od receptorów błonowych do wnętrza komórki, fuzja błon, fagocytoza itp. O ile w ostatnich latach prowadzono bardzo intensywne badania dotyczące budowy i funkcji tratw błonowych oraz wpływu czynników determinujących lokalizację białek w tratwach błonowych, o tyle sam biologiczny mechanizm leżący u podstaw dynamicznej organizacji tratw spoczynkowych w błonie komórkowej nie został dotąd opisany.

Wcześniejsze badania naszej grupy z zastosowaniem standardowych metod analizy tratw błonowych, pozwoliły opisać jeden z pierwszych mechanizmów, w którym pojedyncze białko nie tylko lokalizuje się w tratwach, lecz co ważniejsze, odpowiada za ich powstawanie w błonach erytrocytów oraz ich prekursorów. Zidentyfikowanym przez nas białkiem kluczowym dla lateralnej organizacji błony erytrocytów jest białko MPP1. Należy ono do rodziny białek MAGUK i podlega posttranslacyjnej modyfikacji, jaką jest palmitoilacja. Opisaną dotąd funkcją białka MPP1 jest uczestnictwo w tworzeniu szkieletu błonowego erytrocytu, a dokładniej w budowie, razem z glikoforyną C oraz białkiem 4.1, kompleksu potrójnego przytwierdzającego szkielet spektrynowy do błony komórkowej. Nasze ostatnie

badania wykazały, iż palmitoilacja białka MPP1 jest procesem niezbędnym do prawidłowej organizacji błony komórkowej erytrocytów oraz komórek linii erytroidalnych. Jako że metody stosowane dotychczas mogą budzić pewne kontrowersje (np. izolacja frakcji DRM), a także nie pozwalają na jednoznaczną analizę właściwości fizykochemicznych błony komórkowej, w niniejszej pracy podjęto próbę szczegółowej charakterystyki wpływu białka MPP1 na organizację błony, wykorzystując układ modelowy, jaki stanowią, pochodzące z żywych komórek, pęcherzyki błonowe – GPMVs odpowiadające składem białkowo-lipidowym, jak się zakłada, natywnej błonie komórkowej.

Ze względu na niewielki rozmiar (~ 20 nm) oraz wysoką dynamiczność tratwy błonowej stanowią nie lada wyzwanie podczas prób ich zobrazowania oraz oczyszczania. Większość dostępnych obecnie metod nie pozwala osiągnąć wystarczającej rozdzielczości, pozwalającej obrazować pojedyncze domeny, stąd też w ostatnim czasie opracowano techniki, które umożliwiają pośrednią, lecz odzwierciedlającą natywną strukturę błony, szczegółową analizę jej organizacji. Metody te wykorzystują pęcherzyki powstające bezpośrednio z błony komórkowej, które, ze względu na brak szkieletu komórkowego, wykazują zjawisko separacji faz, umożliwiające zaawansowane analizy mikroskopowe lateralnej organizacji błony oraz jej właściwości fizykochemicznych. Badania prowadzone w niniejszej pracy wykorzystują jedną z najnowszych metod indukcji olbrzymich pęcherzyków błonowych, GPMVs, do analizy wpływu białka MPP1 na płynność błony komórek pochodzenia erytroidalnego. Wykazano, że w komórkach, w których z zastosowaniem technologii lentiwirusowej stabilnie wyciszono ekspresję genu *MPP1* stopień uporządkowania błony izolowanych pęcherzyków jest w znacznym stopniu obniżony w stosunku do pęcherzyków otrzymywanych z komórek kontrolnych. Zmianę płynności błony pęcherzyków zaobserwowano stosując zarówno technikę mikroskopii dwufotonowej pozwalającej wyznaczyć wartość GP błon znakowanych za pomocą sondy fluorescencyjnej laurdan-C, jak i w mikroskopowym pomiarze czasu życia fluorescencji (FLIM) sondy di-4 wrażliwej na jej uporządkowanie. Ponadto, wykorzystując zdolność pęcherzyków GPMVs do separacji na dwie płynne fazy:  $l_d$  oraz  $l_o$ , pod wpływem obniżonej temperatury, wykazano, że białko MPP1 zaangażowane jest w molekularny mechanizm kontroli przejścia fazowego lipidów dwuwarstwy, co w błonie natywnej może odpowiadać powstawaniu tratw spoczynkowych. Inaczej mówiąc, wynik ten sugeruje udział białka MPP1 w koalescencji nanodomien w większe, stabilniejsze oraz funkcjonalne tratwy spoczynkowe.

W kolejnym etapie badań wykazano, iż obserwowane zmiany właściwości fizykochemicznych błon pęcherzyków w rzeczywistości są rezultatem oddziaływania białka

MPP1 z błoną komórkową, nie wynikają natomiast z jego wpływu na inne procesy mogące mieć odzwierciedlenie w jej strukturze, jak choćby zmiany w obrębie składu dwuwarstwy. Zarówno analiza składu lipidowego, jak i płynności dwuwarstwy lipidowej, uzyskiwanej z lipidów ekstrahowanych z pęcherzyków GPMVs, nie wykazały żadnych istotnych różnic. Ponadto, analiza płynności błon pęcherzyków otrzymywanych z komórek z wyciszoną ekspresją MPP1, w których na powrót przywrócono jego ekspresję, opierająca się na pomiarach czasu życia fluorescencji sondy di-4 w izolowanych pęcherzykach, potwierdza jego kluczową rolę w lateralnej organizacji błony.

Stwierdziwszy, że białko MPP1 bezpośrednio wpływa na właściwości fizykochemiczne błony, takie jak jej płynność, postanowiono sprawdzić, czy zależne od białka MPP1 zmiany w lateralnej strukturze błony komórkowej mają odzwierciedlenie w prawidłowym funkcjonowaniu tratw spoczynkowych. W tym celu w dalszej części pracy podjęto próbę analizy transdukcji sygnału od receptorów błonowych, których aktywacja zależy od stabilnych tratw błonowych. Wykazano, iż szlaki sygnałowe związane z aktywacją dwóch „tratwozależnych” receptorów z rodziny RTK, receptora insulinowego (IR) oraz receptora czynnika komórek macierzystych (c-kit), są zaburzone w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko MPP1. Co ciekawe aktywacja samych receptorów, obserwowana jako ich autofosforylacja, zachodzi bez zmian, jednak dalszy przekaz sygnału zostaje w znacznym stopniu zahamowany (obserwuje się redukcję poziomu fosforylacji efektorowej kinazy z rodziny MAP – Erk1/2). Dodatkowo wykazano, iż zaburzenie transdukcji sygnału następuje na poziomie aktywacji GTPazy należącej do rodziny małych białek G, białka Ras, którego aktywność uzależniona jest od poprawnej asocjacji z tratwami błonowymi. W komórkach z wyciszoną ekspresją *MPP1* nie następuje wymiana nukleotydu GDP na GTP w cząsteczce białka Ras, przez co dalsza transdukcja sygnału jest niemożliwa. Uzyskany wynik dobitnie potwierdza kluczową rolę białka MPP1 w regulacji powstawania prawidłowych, funkcjonalnych tratw spoczynkowych, od których zależy wiele kluczowych procesów komórkowych. Jest to też po raz pierwszy opisana zależność aktywacji białka H-Ras od MPP1.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwoliły jednoznacznie wykazać wpływ białka MPP1 na lateralną organizację błony komórek erytroidalnych. Dane uzyskane dla modelu natywnej błony komórkowej, jaki stanowią pęcherzyki GPMVs, wskazują na kluczową rolę białka MPP1 w regulacji płynności błony komórkowej oraz właściwości fizykochemicznych separujących ciekłych faz lipidowych. Ponadto analiza aktywacji „tratwozależnych” receptorów wskazuje na to, iż zmiany te spowodowane są udziałem MPP1

w tworzeniu funkcjonalnych mikrodomen. Uzyskane wyniki sugerują, że białko MPP1 wpływa na zmianę układu fazowego, najprawdopodobniej powodując asocjację/oligomeryzację nanokompleksów oraz stabilizację tratw spoczynkowych. Wstępne badania prowadzone w naszym laboratorium wskazują na oddziaływanie białka MPP1 z nanokompleksami zbudowanymi z cholesterolu oraz białek z rodziny flotylin, będącymi markerami tratw błonowych. Biorąc pod uwagę fakt istotnej roli tratw błonowych w regulacji kluczowych procesów komórkowych, przedstawione w niniejszej pracy wyniki umożliwiają zrozumienie naturalnego mechanizmu powstawania domen w błonie komórkowej, a ponadto otwierają nowe możliwości scharakteryzowania podobnych mechanizmów w innych typach komórek.