

Membránové rafty: historie a současnost

Signalizace přes membránové proteiny

LUKÁŠ
FALTEISEK

Abstract: Membrane rafts – history and the present by Lukáš Falteisek. The concept of spontaneous formation of lipid rafts in the plasma membrane of animal cells was established 20 years ago. Despite of intense effort the rafts were never directly observed. The concept started to be very complicated in order to explain various experimental results, that were infirming it. The formation of lipid envelopes around membrane proteins rather than spontaneous segregation of lipids has been suggested recently. The lipid envelope theory is in conformity with the experimental observations and may offer new experimental consequences.

Mgr. Lukáš Falteisek (*1983) vystudoval biologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Na této fakultě se v rámci doktorského studia zabývá protistologií a geomikrobiologií.

Je tomu už dvacet let, co bylo objeveno, že se chřipkový hemaglutinin v průběhu své cesty z ribozomu na plazmatickou membránu stává nerozpustným v roztocích slabých detergentů. Toto pozorování bylo v rozporu s tehdejšími představami o biologických membránách, o nichž se soudilo, že by se jakožto lipidové struktury měly v detergentu úplně rozpustit a uvolnit svůj proteinový obsah. Nenápadný objev, že je nějaký membránový protein pevně obalen lipidy, které nelze pomocí detergentů odmyt, spustil lavinu podobných pozorování a dal vzniknout jednomu z nejkontroverznějších (a publikačně nejuspěšnějších) konceptů buněčné biologie posledních dvaceti let – konceptu membránových raftů.

Koncept membránových raftů přišel včas

Pokud buňky rozpustíme v zředěném roztoku některých detergentů¹ a potom intenzivně centrifugujeme v sacharózovém gradientu,² většina biologického materiálu sedne na dno. Část membrán, obohacená o cholesterol, glykolipidy a některé proteiny, však detergentu odolá a v důsledku malé hustoty vyplave k hladině. Podle schopnosti „vyplavat“ se těmto nerozpustným útvarům začalo říkat rafty.³

Koncept membránových raftů přišel právě včas, aby pomohl vysvětlit záhadnou signalizaci přes glykosylfosfatidylinositolové proteiny. Ty jsou celé mimobuněčné a v membráně drží jen díky lipidické glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvě – v podstatě jako balonek na hydrofobním provázku. Při přípravě raftů tyto proteiny vyplouvají. A co víc, spolu s nimi vyplouvají i kinázy rodiny Src, které jsou naopak celé nitrobuněčné, ale také jsou kotveny do membrány pomocí hydrofobních „provázků“, tentokrát samotných mastných kyselin. Proto se záhy objevila hypotéza, že rafty existují již na membráně živých buněk a slouží tu jako „lepido“, které drží pohromadě glykosylfosfatidylinositolované receptory a s nimi spolupracující kinázy.

Postupně se ukázalo, že vyplouvá řada dalších membránových signálních proteinů, a hypotéza byla zobecněna: V raftech se soustřeďují vybrané signální molekuly, koncentrují se a oddělují od jiných. Rafty zřejmě vznikají v Golgiho komplexu, odkud jsou transportovány na plazmatickou membránu. Tam se do nich dostanou některé signální proteiny a rafty tu pak slouží například jako organizační centra transmembránové signa-

lizace. Spektrum proteinů a lipidů, získávaných při čištění raftů, se sice celkem výrazně liší podle použité metody a detergentu, ale to zpočátku nikoho neznepokojovalo.

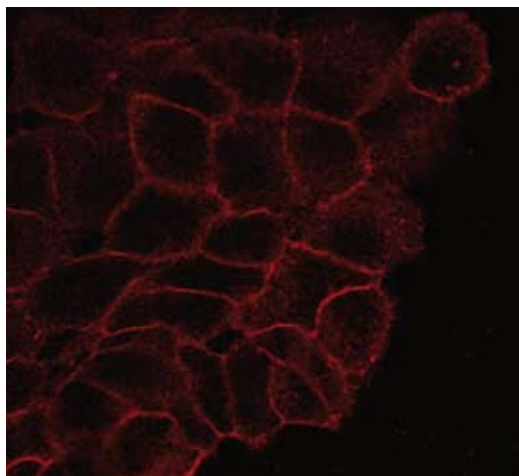
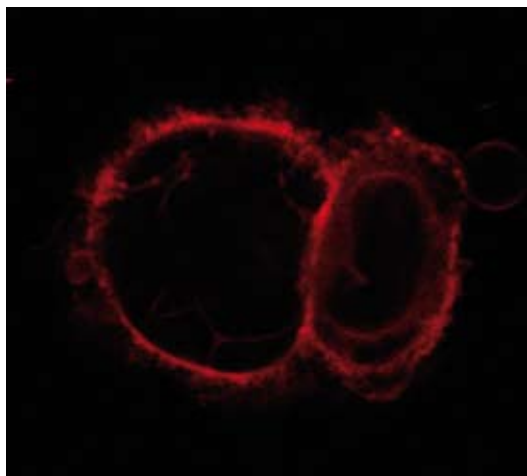
Pochybnosti – někdy rafty uvidíme, někdy ne

Raftová hypotéza má tu výhodu, že je logická, v základní podobě i jednoduchá a nabízí vysvětlení některých do té doby záhadných jevů. Od samého začátku ji ovšem provázejí i zásadní potíže. Typické membránové rafty se nikdy nepodařilo přesvědčivě pozorovat na živé buňce. Pokud vytvoříme umělou membránu se stejným složením, jaké má cytoplazmatická membrána lidské buňky, samovolně se na ní vytvoří domény mikrometrových rozměrů, které lze fluorescenčně označit a pozorovat pod mikroskopem. Vlastnosti těchto domén odpovídají tomu, jak si představujeme membránové rafty. Pokud však stejným způsobem fluorescenčně obarvíme a pozorujeme živou buňku, žádné rafty neuvidíme. Membrána bude obarvena stejnorodě. Domény, které svou barvitelostí odpovídají raftům, se zatím podařilo pozorovat jen za uměle vytvořených podmínek – na buňkách, které byly poškozeny (např. organickým rozpouštědlem) a začaly na povrchu vytvářet velké membránové váčky. Tento děj je znám jako projev blížící se smrti buněk a váčky mají jiné vlastnosti než normální membrána, například jim chybí podmembránový skelet. Navíc se na nich rafty tvoří jen za nefyziologicky nízké teploty.

Elegantní vypořádání s neveselou situací

Raftová hypotéza se s touto neveselou situací vypořádala celkem elegantně. Její příznivci konstatovali, že biochemické důkazy existence raftů jsou dostatečně přesvědčivé a potíže s jejich zviditelněním jsou způsobeny tím, že buňka obsahuje velký počet malých raftů, jejichž rozlišení je pod možnostmi optické mikroskopie. Elektronovou mikroskopii nelze použít, protože drastické podmínky v komoře mikroskopu nejsou slučitelné se zachováním tak křehkých struktur, jakými jsou membránové rafty nejspíše jsou.

Další argumenty proti představě membránových raftů jako organizačních center buněčné signalizace přinesly funkční experimenty. Do buněčné membrány byly vnášeny podobné molekuly jako zmíněné kotvené receptory, které byly pomocí vhodných mastných kyselin zacíleny buď do „raftové“, nebo



do „neraftové“ membrány. Signály přenášely v obou případech téměř stejně.

Ještě větší problém přinesl raftové hypotéze výsledek experimentu, při němž byl mimo rafty zacílen raftový signální protein LAT. Pokud pomocí bodové mutace odstraníme jednu jeho membránovou kotvu, protein změní lokalizaci a přestane plnit své funkce. To by bylo v pořádku. Problém vznikl, když byl vytvořen protein, který má signální část z proteinu LAT a membránovou kotvu z neraftového signálního proteinu LAX. Tento hybridní protein přenáší signály stejně jako nemutovaný LAT, a přitom se v raftech nenalézá. I s tímto tvrdým oříškem si raftová hypotéza poradila. Její zastánci navrhli, že existují těžké rafty, které vypadají podobně jako ty klasické, plní podobné funkce, ale kvůli většímu obsahu proteinů při ultracentrifugaci⁴ nevyplavou do raftové frakce. Proto si jich předtím nikdo nevšiml. Autor fúzního proteinu LAT tedy náhodou sáhl po membránové kotvě, která nezacílila LAT mimo rafty, jak chtěl, ale do těžkých raftů. Nikdo zatím přesvědčivě neprokázal jejich existenci a jejich předpokládané vlastnosti ani nenechávají mnoho možností, jak to při současném stavu poznání učinit.

Všimněme si nápadné podobnosti neustálých změn původně jednoduchého raftového paradigmatu se zaváděním hypercyklů, které měly za úkol zachránit geocentrickou teorii vesmíru, když se hroutila pod náporom zpřesněných dat o pohybu planet...

Rozporuplné výsledky

Náš tým experimentoval s lokalizací fosfodiesterázy 8a (PDE8a), která je zakotvena v biologických membránách pomocí dvou lipidových kotev, kyseliny myristové a palmitové. Porovnání buněčné lokalizace mutovaných forem, které jednu nebo druhou z těchto kotev postrádaly, s původním proteinem ukázalo zajímavý fakt. Odstranění jedné kotvy (palmitátu) způsobí skoro úplný přesun proteinu z plazmatické membrány na endoplazmatické retikulum (o endoplazmatickém retikulu viz např. Vesmír 79, 24, 2000/1). Podobně se chovají i dvě kinázy z rodiny Src, z nichž jedna přirozeně nese obě kotvy a druhá jen jednu. Zdá se, že dvě kotvy neslouží ani tak k raftovému zacílení

proteinu, jako k jeho zacílení na správnou membránu obecně.

Rozporné výsledky přinesly pokusy zjistit rafty měřením účinnosti FRET,⁵ což je nezářivý přenos energie mezi dvěma molekulami fluorescenčního barviva. Jak se projeví v praxi? Když excitujeme jednu z těchto barviček (pokud jsou různé, tak tu krátkovlnnější), nesvíti ona, ale ta druhá. Hlavní aplikace FRET v biologii využívá fakt, že jeho účinnost klesá se šestou mocninou vzdálenosti obou molekul, takže nezářivý přenos energie probíhá prakticky jen mezi molekulami ležícími v největší blízkosti. Proto se zmíněná metoda hodí k detekci případných membránových raftů. Jejich malá velikost, původně stanovená na základě neúspěchů optické mikroskopie, předurčuje složky raftů k tomu, aby mezi nimi probíhal nezářivý přenos energie se zřetelně vyšší účinností než mezi „neraftovými“ složkami membrán.

V literatuře lze nalézt experimenty s FRET se zcela rozpornými výsledky, řada pokusů je očividně zatížena metodickými chybami. Někteří novější měření jsou však velmi kvalitní a jejich hlavním závěrem je, že mnohé membránové proteiny okolo sebe skutečně mají malý okresek membrány se změněnými vlastnostmi. Tyto proteiny se ale uvnitř svých obalů navzájem neshlukují, takže jim obaly neslouží jako základny pro vzájemné interakce. Navíc mají navzájem dosti odlišné složení a různou afinitu k různým jiným obalům. Nezdá se, že by na membráně vznikaly samovolně, spíše se tvoří okolo zanořující se části proteinu. Raftová hypotéza reagovala na studie s FRET i další poznatky tím, že zvýšila počet předpokládaných typů raftů, které ovšem stále mají typicky raftové vlastnosti.

Solvatační hypotéza

Očividně různá extrahovatelnost membránových proteinů, rozmanitost jejich kotvicích struktur i výsledky pokusů využívajících FRET jasně ukazují, že se okolo proteinů děje s membránami něco zvláštního. Hypotéza membránových raftů na to reagovala jako první, ale jak s přibývajícím poznatkem přibývají další typy raftů, začíná být těžkopádná a vzdaluje se možnosti experimentálního ověření. Zajímavější pohled na věc můžeme odvodit ze zdánlivě banálního faktu: Když

1. Barvení lidských epitelálních buněk linie HeLa pomocí fluorescenčních lipidů, které se selektivně koncentrují v předpokládané „raftové“ (vlevo) či „neraftové“ (vpravo) membráně, poskytuje téměř homogenní signál. Různé skvrny a tečky okolo membrány jsou způsobeny tím, že buňky vytvářejí na svém povrchu různé záhyby a chlupy. Ty se na tenkém řezu z konfokálního mikroskopu projeví právě takto.

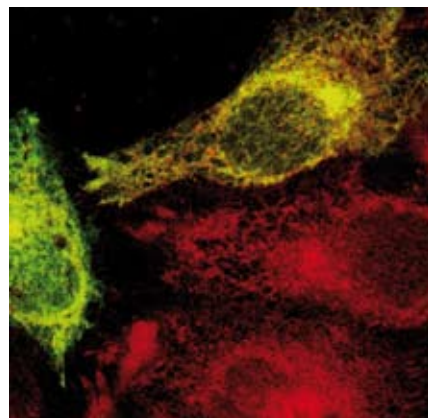
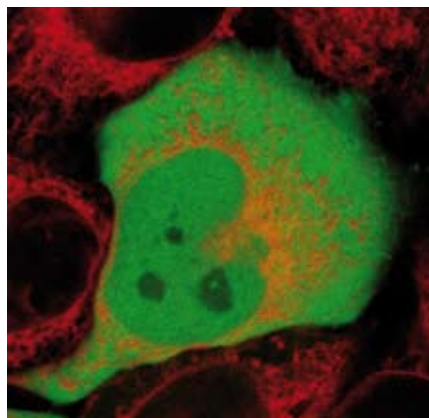
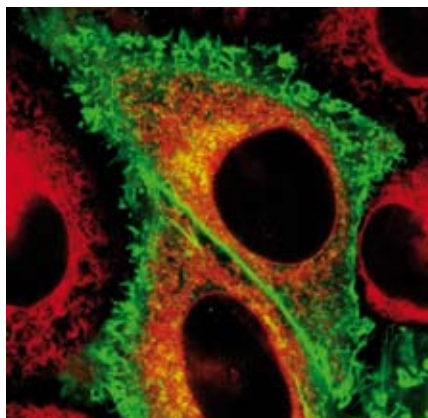
1) Jako jsou např. Triton X-100, NP 40 či Brij 58.

2) Použití hustotních gradientů. V praxi nemusí být zachován předpoklad, že sedimentace probíhá v homogenním prostředí. Vzorky lze centrifugovat v přítomnosti určité inertní látky (sacharóza, CsCl), jejíž koncentrace, a tím i hustota roztoku vzrůstají směrem ke dnu kyvety. Toto použití hustotního gradientu pomáhá lepšímu rozdělení jednotlivých složek vzorku.

3) Někteří výzkumné týmy prosazovaly jiná označení, např. GEM (glykolipid enriched microdomains), tedy o glykolipidy obohacené mikrodomény.

4) Ultracentrifugace je nezbytnou součástí izolace proteinů, nukleových kyselin a buněčných organel. První ultracentrifuga byla vyvinuta švédským biochemikem Svedbergem, dosahovala rychlosti 80 000 otáček za minutu.

5) FRET - fluorescence resonance energy transfer.



2. Tytéž buňky donucené vneseným genem k tomu, aby produkovaly zelený fluorescenční protein, zakotvený různými způsoby do membrány. Je vidět, že zatímco kombinované působení dvou membránových kotví (myristylace a palmitylace) pošle protein na cytoplazmatickou membránu (vlevo), samotná myristylace jej zacílí na endoplazmatické retikulum (uprostřed – je vidět dvě transfekované a minimálně dvě netransfekované buňky). Fluorescenční protein bez kotvy je volně v cytoplasmě (vpravo). Červeně je označeno endoplazmatické retikulum. Všechny snímky byly fotografovány na živých buňkách konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2.

se protein zanoří do cytoplazmatické membrány, bude mít různou afinitu k různým jejím složkám. To přirozeně povede k zvýšení koncentrace některých lipidů v jeho bezprostředním okolí. Membrána se proteinu přizpůsobí, podobně jako se voda svou strukturou přizpůsobuje třeba rozpuštěnému iontu.

Tento jev je znám dlouho a vlastně by bylo divné, kdyby se nic takového nedělo. Je však překvapivé, jak málo je spojován s membránovými rafty. Přitom by mohl vysvětlit výsledky detergentů, mikroskopie i FRET. Zajímavé je, že zcela v souladu se solvatační hypotézou jsou i speciální případy, kdy na buňce můžeme najít velké a pozorovatelné rafty. Ty tvoří třeba membrána kaveol („jamek“, kam se zanořují některé receptory), membrána některých obalených virů pučících z buňky nebo membrána imunologické synapse (místo kontaktu dvou imunitních buněk). Vesměs jde o okrsky membrány prošpikované transmembránovými proteiny, a tedy i jejich obaly. To, že lze pomocí transmembránových peptidů vytvo-

řit doménu na umělé membráně, je již experimentálně ověřeno.

Obalení částic rozpuštěné látky molekulami rozpouštědla

Nabízí se otázka, zda solvatace dokonce nebrání tvorbě velkých raftů, které samovolně vznikají na umělých membránách nebo na buňkách za nefyziologických podmínek, ale na zdravých buňkách až nápadně chybějí. Další zajímavá, testovatelná, i když zatím čistě fiktivní možnost vyplývá z faktu, že solvatační obaly jsou v dynamické rovnováze s okolní membránou a jejich velikost bude záviset na koncentraci určitého lipidu v membráně. Pokud solvatace skutečně ovlivňuje vzájemnou afinitu proteinů, její regulací by buňka mohla velmi jemně ladit citlivost různých receptorů na své membráně, ze složení membrány by se stal integrující prvek, odrážející „náladu“ buňky.

Raft, tedy lipidový obal, v našem pojetí přestává být přístavem, kde se koncentrují lodě, jež by se na volném oceánu těžko hledaly, a stává se z něj spíš něco jako oblek, podle něhož potenciální partner může usoudit, zda se s jeho majitelem chce bavit či ne. ☺

Článek vznikl za podpory Grantové agentury UK, projekt č. 130307.

K DALŠÍMU ČTENÍ

- Skibbens J. E., Roth M. G., Matlin K. S.: Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts, *J. Cell. Biol.* 108(3), 821–832, 1989
- Baumgart T., Hammond A. T., Sengupta P., Hess S. T., Holowka D. A., Baird B. A., Webb W. W.: Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *PNAS* 104(9), 3165–3170, 2006
- Wang T., Leventis R., Silviu J. R.: Artificially Lipid-anchored Proteins Can Elicit Clustering-induced Intracellular Signaling Events in Jurkat T-Lymphocytes Independent of Lipid Raft Association, *JBC* 280(24), 22839–22846, 2005
- Zhu M., Shen S., Liu Y., Granillo O., Zhang W.: Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development, *J. Immunol.* 174(1), 31–35, 2005
- Abankwa D., Vogel H.: A FRET map of membrane anchors suggests distinct microdomains of heterotrimeric G proteins, *J. Cell. Sci.* 120, 2953–2962, 2007
- Gombos I., Steinbach G., Pomozi I., Balogh A., Vámosi G., Gansen A., László G., Garab G., Matkó J.: Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells, *Cytometry A* 73(3), 220–229, 2008
- Rinia H. A., Boots J. W., Rijkers D. T., Kik R. A., Snel M. M., Demel R. A., Kiliaan J. A., van der Eerden J. P., de Kruijff B.: Domain formation in phosphatidylcholine bilayers containing transmembrane peptides: specific effects of flanking residues, *Biochemistry* 41(8), 2814–2824, 2002

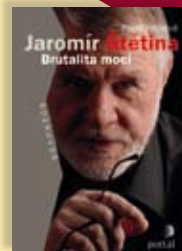
www.portal.cz

P. Hájková

Jaromír Štětina – Brutalita moci

Nová kniha rozhovorů mapuje především posledních šest let života Jaromíra Štětiny, který se z válečného zpravodaje stal senátorem. Zabývá se zejména brutalitou moci, násilím, ovládnutím druhých. Předobrazem je jedenáct alegorických soch ctností a neřestí z Kuksu. Na pozadí současných i minulých událostí se Štětina zamýšlí nad jednotlivými ctnostmi a neřestmi.

váz., 240 s., 329 Kč



Karel Hviždala Interviewer

Rozhovor s M. M. Marešovou

Karel Hviždala vydal na dvacet knižních rozhovorů, v nichž zůstává v pozadí. V této knize se tentokrát odkrývá interviewer, Karel Hviždala, a její spoluautorka podává svědectví o přemýšlivém člověku, který hloubkou záběru svého tázání a vědní směruje proti trendu dnešní doby s její orientací na povrchnost.

váz., 288 s., 349 Kč

Žádejte v knihkupectvích nebo objednávejte: Portál, s. r. o., tel. 283 028 203, e-mail: obchod@portal.cz
Knihkupectví Portál: Praha 1, Jindřišská 30; Praha 8, Klapkova 2; Brno, Dominikánské nám. 8; Plzeň, Prokopova 19

INZERCE

portál