

KAMILA PRYMAS, KATARZYNA KWIATKOWSKA

*Pracownia Biologii Molekularnej Błony Komórkowej
Zakład Biologii Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: k.prymas@nencki.gov.pl
k.kwiatkowska@nencki.gov.pl*

DOMENY BŁONOWE KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH I PROKARIOTYCZNYCH I ICH UDZIAŁ W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁU*

WSTĘP

Model mozaikowej budowy błony komórkowej, zaproponowany w 1972 r. przez Sintera i Nicolsona zakładał, że jest to dwuwarstwa lipidowa, w której białka są swobodnie rozmieszczone (SINGER i NICOLSON 1972). Jej istotnym uzupełnieniem stała się koncepcja samoistnego wyłaniania się w błonie specyficznych obszarów, nonodomen, nazywanych tratwami błonowymi, którą na początku lat 90. ubiegłego wieku wysunął Kai Simons (SIMONS i IKONEN 1997). Po wielu latach intensywnych badań i kontrowersji, jakie ta koncepcja wzbudzała, obecnie przyjmuje się, że tratwy błonowe to liczące kilka nanometrów, dynamiczne (trwające milisekundy) skupiska cholesterolu, lipidów z resztami nasyconych kwasów tłuszczowych (głównie sfingolipidów) i wybranych białek, które wyodrębniają się z otaczającego je środowiska glicerofosfolipidów (LINGWOOD i SIMONS 2010). Formowanie nanodomen jest napędzane przez interakcje pomiędzy cholesterolem i długimi łańcuchami nasyconych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo stabilizują je wiązania wodorowe powstające między sfingolipidami. Lipidy w obrębie nanodomen są gęsto upakowane, ale dzięki obecności cholesterolu zachowują stosunkowo dużą swobodę ruchów bocznych, istotną dla aktywności biologicznej nonodomen. Zjawisko powstawania tratw w błonie komórkowej naśladuje proces obserwowany w błonach modelowych, nazywany separacją faz, pod-

czas którego sfingolipidy i cholesterol formują samorzutnie fazę uporządkowaną (Lo), a glicerofosfolipidy zawierające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych tworzą fazę nieuporządkowaną (Ld) (AHMED i współaut. 1997). Z uwagi na ogromną różnorodność lipidów i białek w błonie komórkowej, wielorakie interakcje pomiędzy nimi modulują formowanie nanodomen w komórkach spoczynkowych, ale też sprawiają, że w trakcie stymulacji komórek zlewają się one w większe, funkcjonalne platformy (KUSUMI i współaut., 2012). Takie platformy odgrywają istotną rolę m.in. w przekazywaniu sygnału przez receptory błonowe w komórkach układu odpornościowego (HOREJSI i HRDINKA 2014). Domeny sfingolipidowo-cholesterolowe formują się też w obrębie aparatu Golgiego, uczestnicząc w transporcie białek i lipidów z tego miejsca do błony komórkowej. Są również istotne dla polaryzacji komórek i endocytozy. Tratwy błonowe mają podobny skład lipidowy jak kaweole, które są wpukleniami błony komórkowej, stabilizowanymi przez białka kaweoliny-1, -2 i -3. Struktury te występują licznie w mięśniach szkieletowych, adipocytach, komórkach nabłonka, śródbłonka i fibroblastach. Zaangażowane są w proces transcytozy, reakcję komórek na odkształcenia, a także, ze względu na obecność syntazy tlenu azotu, kaskady sygnałowe niektórych receptorów (ARIOTTI i PARTON 2013). W leukocytach poziom ekspresji kaweoliny jest niski i kaweole mogą się w nich nie formować. W niniejszej pracy po-

*Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/08/A/NZ3/00850.

mijamy zatem wątek kaweoli w komórkach układu odpornościowego, skupiając się na dobrze udokumentowanym udziale tratw błonowych w różnorodnych reakcjach obronnych organizmu. Omawiamy też dane wskazujące na istnienie domen błonowych bakterii, które różnią się składem lipidowym i białkowym od tratw błonowych komórek eukariotycznych. Dane te pozwalają sądzić, że heterogenna organizacja błony komórkowej jest zachowanym ewolucyjnie sposobem zapewnienia lokalnego zagęszczenia wybranych receptorów oraz lipidów i białek uczestniczących w kaskadach sygnałowych uruchamianych przez te receptory, co ułatwia sprawną reakcję komórki na bodźce zewnętrzne.

TRATWY BŁONOWE KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH I ICH FUNKCJA W KOMÓRKACH UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

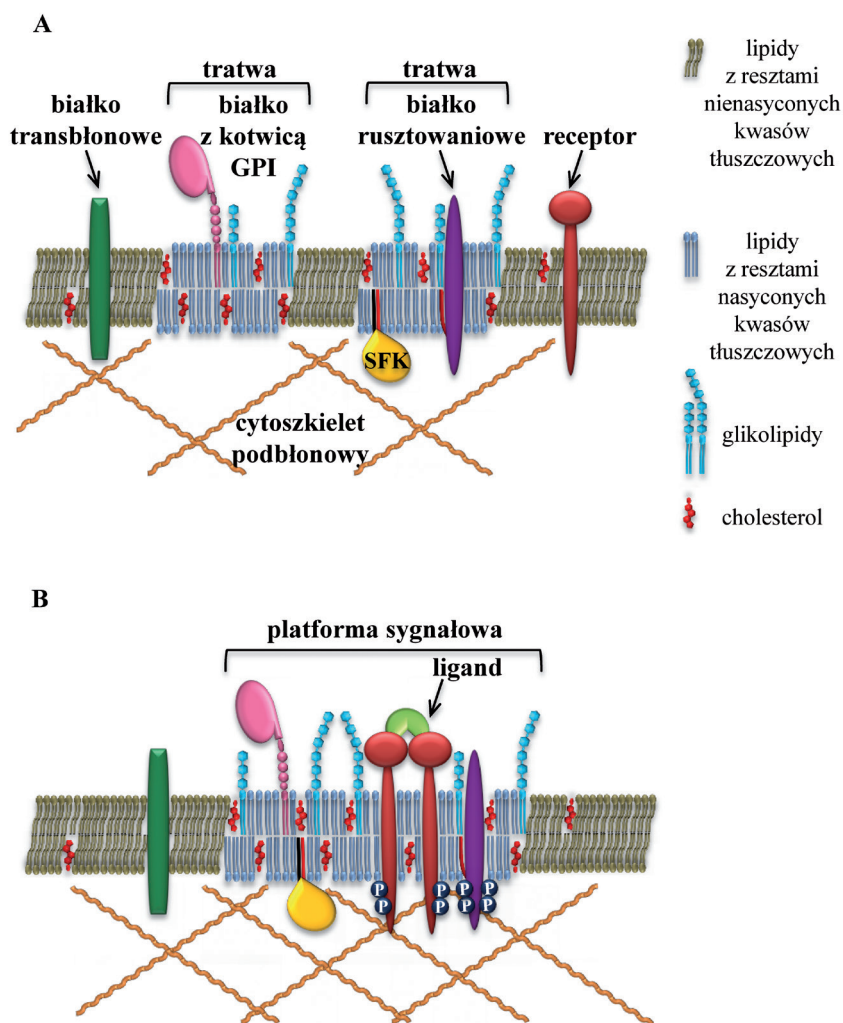
W obrębie tratw (nanodomen) błonowych występuje wybrana grupa białek, a ich asocjacja z nanodomenami jest regulowana przez kilka mechanizmów. Jeden z nich wykorzystuje ściśle upakowanie lipidów oraz zwiększoną grubość tych rejonów błony, która wynika z lokalnej dominacji sfingolipidów zawierających reszty długich i nasyconych kwasów tłuszczowych. Ze względu na dopasowanie struktury przestrzennej, w rejonie tratw skupiają się zatem białka, które są zakotwiczone w błonie poprzez reszty nasyconych kwasów tłuszczowych (Ryc. 1A). Należą do nich białka wyposażone w łącznik glikozylofosfatydylinozytolowy (GPI), który utrzymuje je w zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Jednym z nich jest CD14, białko powierzchniowe makrofagów i innych komórek mieloidalnych, które wiąże endotoksynę bakteryjną, lipopolisacharyd (LPS). Interakcja CD14 z LPS ułatwia przeniesienie cząsteczek LPS z tego białka na receptor Toll-podobny 4 (TLR4), aktywację receptora i jego endocytozę (ZANONI i współaut. 2011). Skutkiem tych procesów jest uruchomienie reakcji zapalnej zmierzającej do zwalczania infekcji. Reakcja obronna uruchamiana przez LPS należy do repertuaru tak zwanej wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego i jest intensywnie badana z powodu szkodliwych skutków jej potencjalnego rozregulowania. Nadmierna reakcja na LPS prowadzi bowiem do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, sepsy, ciężkiej sepsy i szoku septycznego kończącego się w 30–50% przypadków śmiercią (PŁO-CIENNIKOWSKA i współaut. 2015a).

W wewnętrznej monowarstwie tratw skupiają się białka potranslacyjnie modyfikowane przez odwracalne przyłączenie reszty 16-węglowego, nasyconego kwasu palmi-

tynowego (CHAMBERLAIN i SHIPSTON 2015). Wśród nich znajdują się podjednostki α białek G oraz grupa kinaz tyrozynowych z rodziny Src, które są równocześnie modyfikowane przez nieodwracalne, kotranslacyjne przyłączenie reszty innego nasyconego kwasu tłuszczowego, 14-węglowego kwasu mirystynowego (Ryc. 1A). Aktywność kinaz z rodziny Src jest kluczowa dla transdukcji sygnału przez grupę receptorów, nazywanych dalej immunoreceptorami, które są zaangażowane w szereg reakcji układu odpornościowego. Grupa ta obejmuje receptor limfocytów T (TCR), receptor limfocytów B (BCR), receptory dla przeciwciał IgE (receptor Fcε I), które są obecne w komórkach tucznych i bazofilach oraz receptory dla IgG (receptory Fcγ), występujące w neutrofilach, monocytach i makrofagach. Oprócz białek podbłonowych, takich jak kinazy z rodziny Src, także niektóre białka transbłonowe są palmitoilowane, co umożliwia im akumulację w obrębie tratw. Typowym przykładem są tu białka adaptorowe LAT i NTAL oraz białko PAG, posiadające reszty tyrozynowe i motywy aminokwasowe zaangażowane w interakcje z innymi białkami. Białka te działają jak rusztowania ułatwiające formowanie się wielobiałkowych kompleksów sygnałowych immunoreceptorów, a białko PAG dodatkowo uczestniczy w regulacji aktywności kinaz z rodziny Src (STEPANEK i współaut. 2014). Obecnie uważa się, że palmitoilacja, skład aminokwasowy i długość domeny transbłonowej, a także zdolność do oligomeryzacji są czynnikami decydującymi o asocjacji białek transbłonowych z tratwami (DIAZ-ROHRER i współaut. 2014). W przeciwieństwie do modyfikacji białka przez palmitoilację, preferencyjna interakcja domeny transbłonowej białka z nienasyconym glicerofosfolipidem, fosfatydyloetanoloaminą, może decydować o jego wykluczeniu z tratw. Z drugiej strony, palmitoilowane białka współuczestniczą w formowaniu się tratw błonowych. Wykazano, że palmitoilacja białka erytrocytarnego MPP1, które nie jest białkiem transbłonowym, ale oddziałuje z warstwą wewnętrzną błony erytrocytu, decyduje o domenowej organizacji tej błony. Zaburzenia palmitoilacji MPP1 są przyczyną jednej z form anemii (ŁACH i współaut. 2012). Kontrowersyjny jest udział białek cytoszkieletu aktynowego w formowaniu nanodomen komórek spoczynkowych, natomiast ugruntowany jest pogląd na jego współudział w przebudowie tratw, towarzyszącej aktywacji komórek (KUSUMI i współaut. 2012, RAGHUPATHY i współaut. 2015). Istotną rolę w organizacji i przebudowie tratw mogą odgrywać też flotyliny, białka występujące powszechnie w komórkach eukariotycznych, w tym grzybach i roślinach,

oraz w komórkach prokariotycznych. Analiza bioinformatyczna wykazała, że flotyliny należą do dużej i zachowanej ewolucyjnie rodziny białek SPFH, której nazwa wywodzi się od białek stomatyny, prohibityny, flotyliny i HflK/C. Ich cechą wspólną jest obecność domeny o tej samej nazwie, znanej również jako domena PHB, z uwagi na jej występowanie w białku prohibitynie. Dzięki obecności dwóch hydrofobowych fragmentów domena SPFH umożliwia białkom tej rodziny wbudowanie do błony komórkowej i

błony innych organelli. Dodatkowo, flotyliny komórek eukariotycznych oddziałują z warstwą wewnętrzną błony komórkowej dzięki palmitoilacji i mirystoilacji. Flotyliny tworzą oligomery, a dzięki zdolności do interakcji z szeregiem innych białek, w tym z białkami cytoszkieletu aktynowego, mogą ułatwiać ich akumulację w obrębie tratw błonowych, a także uczestniczyć w endocytozie i transporcie białek do błony komórkowej (OTTO i NICHOLS 2011, STUERMER 2011).



Ryc. 1. Tratwy (nanodomeny) błonowe komórek eukariotycznych i ich reorganizacja w trakcie aktywacji immunoreceptorów.

(A) W komórkach spoczynkowych w błonie komórkowej formują się nanodomeny sfingolipidowo-cholesterolowe, w obrębie których skupiają się białka zakotwiczone przez łącznik GPI oraz białka palmitoilowane, takie jak kinazy tyrozynowe z rodziny Src (SFK) i białka rusztowaniowe, na przykład LAT. Reszty kwasu palmitynowego i mirystynowego, którymi acylowane są białka zaznaczone są odpowiednio kolorem czerwonym i czarnym. Immuoreceptory, a także większość innych białek transbłonowych zlokalizowana jest poza tratwami. (B) Wiązanie przez receptory wielowartościowych ligandów, takich jak antygeny lub przeciwciała, indukuje ich mikroagregację i asocjację z tratwami, które jednocześnie zlewają się w platformy sygnałowe tych receptorów. Dochodzi do fosforylacji receptorów i białek rusztowaniowych (P), katalizowanej przez kinazy Src i uruchomienia specyficznych kaskad sygnałowych. Powstające skupiska tratw są stabilizowane przez ich interakcję z podbłonowym cytoszkieletem aktynowym. Na podobnej zasadzie może dochodzić do uruchomienia szlaków sygnałowych przez białka z kotwicą GPI, w czasie ich mikroagregacji w błonie (wg LINGWOOD i SIMONS 2010, KUSUMI i współaut. 2012).

Oddzielną grupę białek stanowią receptory, takie jak wspomniane wcześniej immunoreceptory, które asocjują z trawami przejściowo, w czasie aktywacji przez właściwe im ligandy. Jednocześnie, labilne nanodomeny, obecne w komórkach spoczynkowych, zlewają się w większe struktury - platformy sygnałowe, które są stabilizowane przez interakcję z cytoszkieletem podbłonowym (KUSUMI i współaut. 2012). Skupienie receptorów oraz białek i lipidów zaangażowanych w ich szlaki sygnałowe umożliwia szybkie i efektywne uformowanie wielocząsteczkowych kompleksów sygnałowych wokół aktywowanych receptorów, transdukcję sygnału i uruchomienie wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych wywołujących pożądaną reakcję komórki (Ryc. 1B). W przypadku immunoreceptorów, sygnałem do asocjacji z trawami jest ich mikroagregacja, do której dochodzi w trakcie wiązania ligandów. Receptor TCR rozpoznaje peptydy pochodzące z patogenów atakujących organizm oraz wiąże antygeny nowotworowe, prezentowane przez inne komórki w formie kompleksów z białkami głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC). Receptor BCR wiąże obce antygeny w formie natywnej (nieprzetworzonej), bez udziału MHC. Natomiast receptory Fc ϵ I i Fc γ wiążą fragmenty Fc przeciwciał, odpowiednio klasy IgE lub IgG, które rozpoznają i „znakują” (opłaszczają) alergeny lub patogenne mikroorganizmy (GOŁĄB i współaut. 2012). Aktywowane immunoreceptory, po asocjacji z trawami, znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie zlokalizowanych tu kinaz z rodziny Src, które fosforylują reszty tyrozynowe receptorów, przekształcając je w miejsca wiązania kolejnych kinaz tyrozynowych z rodziny Syk/Zap70. Kinazy obu rodzin fosforylują też skupione w obrębie traw białka adaptorowe, takie jak LAT, które umożliwiają wiązanie i skupienie wokół aktywowanych receptorów kolejnych enzymów, w tym białek o aktywności GTPazy i fosfolipazy Cy (BRDICKA i współaut. 2002). W konsekwencji, uruchomione kaskady reakcji enzymatycznych wywołują między innymi aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów w jądrze. W obrębie powstającego kompleksu sygnałowego wiązane są również inne białka, które sprzyjają lokalnej polimeryzacji aktyny i reorganizacji podbłonowego cytoszkieletu aktynowego (TAVANO i współaut. 2006). W przypadku receptora TCR propagacja uruchomionych sygnałów prowadzi ostatecznie do uformowania na bazie traw błonowych tzw. synapsy immunologicznej. Powstaje ona w miejscu kontaktu limfocyta i komórki prezentującej antygen i warunkuje długotrwałą aktywację limfocyta, uruchomie-

nie produkcji cytokin lub eliminację zakażonej przez wirusy lub zmienionej nowotworowo komórki (RAZZAQ i współaut. 2004). Aktywowany receptor BCR indukuje produkcję przeciwciał rozpoznających związany przez niego antygen. Aktywacja receptora Fc ϵ I wywołuje natomiast reakcję alergiczną - egocytozę histaminy i cytokin, a aktywacja receptorów Fc γ fagocytozę patogenów prowadzącą do ich degradacji (GOŁĄB i współaut. 2012).

Sfingolipidy traw także biorą udział w przekazywaniu sygnału przez receptory błonowe komórek układu odpornościowego. Badania nad mechanizmami aktywacji immunoreceptora Fc γ IIa ujawniły, że mikroagregacja tego receptora, wywołana przez wiązanie przeciwciał prowadzi do aktywacji kwasnej sfingomielinazy na powierzchni błony komórkowej. Enzym ten hydrolizuje sfingomielinę, jeden z lipidów budujących trawy, produkując ceramid. Z uwagi na silne tendencje do samoagregacji, ceramid ułatwia przemieszczenie receptora Fc γ IIa w błonie i jego asocjację z trawami oraz ich zlewanie się w platformy sygnałowe receptora. Podobny mechanizm opisano między innymi dla receptora CD95 inicjującego śmierć komórki przez apoptozę (ABDEL-SHAKOR i współaut. 2004, ZHANG i współaut. 2009). Ponadto, zarówno ceramid, jak i jego pochodne, kontrolują aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych, stających się elementami kaskad sygnałowych uruchamianych przez receptory błonowe, w tym receptor TLR4 (JÓZEFOWSKI i współaut. 2010).

Receptor TLR4 jest jednym z najlepiej poznanych receptorów zaangażowanych w mechanizmy wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego, którego aktywację wiąże się z trawami błonowymi. Wynika to z faktu lokalizacji w obrębie traw białka CD14, które w najbardziej typowej sytuacji wiąże cząsteczki LPS, sprzyjając ich zagęszczeniu na powierzchni komórek. CD14 ułatwia przeniesienie cząsteczek LPS na białko MD2 związane na stałe z domeną zewnątrzkomórkową receptora TLR4. Po związaniu LPS, kompleks TLR4/MD2 ulega dimeryzacji, a do cytoplazmatycznej sekwencji sygnałowej receptora TLR4 wiążą się kolejno dwie pary białek adaptorowych: TIRAP i MyD88 oraz TRAM i TRIF (PARK i współaut. 2009). W konsekwencji uruchomiane są kaskady sygnałowe, które prowadzą do produkcji cytokin prozapalnych i interferonów typu I, co z kolei ułatwia zwalczanie infekcji (KAWAI i AKIRA 2011). Ostatnio wykazano, że rola CD14 wykracza poza przenoszenie cząsteczek LPS na TLR4/MD2. Interakcja CD14 z LPS prowadzi do mikroagregacji CD14 w błonie komórkowej, prawdopodobnie pocią-

gając za sobą agregację tratw, w których to białko jest zlokalizowane. Mikroagregacja CD14 jest sygnałem indukującym lokalną produkcję fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu [PI(4,5)P₂] w obrębie tratw (PŁOCIENNIKOWSKA i współaut. 2015b). PI(4,5)P₂ jest lipidem, z którym wiąże się białko TIRAP, wspomniane wcześniej, kluczowe białko adaptorowe receptora TLR4, inicjujące formowanie się kompleksu sygnałowego tego receptora w błonie komórkowej. Ponadto, pochodne PI(4,5)P₂, powstające w wyniku jego hydrolizy i fosforylacji, warunkują endocytozę aktywowanego receptora TLR4, a to z kolei umożliwia uruchomienie szlaku sygnałowego tego receptora w błonie endosomów. Z tych względów zależna od białka CD14 akumulacja PI(4,5)P₂ jest wymagana do maksymalnej produkcji cytokin prozapalnych w komórkach stymulowanych przez LPS (PŁOCIENNIKOWSKA i współaut. 2015b). W obrębie tratw błonowych, oprócz CD14, skupione są także inne białka, które uczestniczą w rozpoznaniu LPS i w kaskadach sygnałowych uruchamianych przez TLR4. Należą do nich wspomniane kinazy tyrozynowe z rodziny Src, kwaśna sfingomielinaza, receptory CD44 i CD36 (PŁOCIENNIKOWSKA i współaut. 2015a), potwierdzając znaczenie tych obszarów błony komórkowej dla aktywacji komórek przez LPS.

Dane wskazujące na asocjację aktywowanych receptorów komórek układu odpornościowego z tratwami błonowymi opierają się na wynikach różnorodnych badań. Istotnych informacji na ten temat dostarczyły analizy biochemiczne, które prowadziły do wyizolowania fragmentów błon nierozpuszczalnych w detergentach niejonowych, takich jak Triton X-100. Skład lipidowo-białkowy otrzymanej frakcji, określanej jako DRM (ang. detergent-resistant membrane) jest zbliżony do składu tratw błonowych lub tratw łącznie z kaweolami, jeśli frakcjonowane są komórki zawierające te struktury. To podejście metodyczne oparte jest na wynikach badań błon modelowych, które wykazały, że z uwagi na gęste upakowanie lipidów w rejonach błony wzbogaconych w sfingolipidy i cholesterol, cząsteczki detergentów niejonowych nie mogą wnikać pomiędzy te lipidy (LONDON i BROWN 2000). Te fragmenty błony nie ulegają zatem dezintegracji w trakcie lizy komórek w detergentcie i można je następnie wyizolować poddając lizat wirowaniu w gradiencie gęstości. Z uwagi na dużą zawartość lipidów, a małą białka, a zatem niską gęstość właściwą, frakcja DRM przemieszcza się do górnych rejonów takiego gradientu, separując się od białek pozostałych fragmentów błon i białek cytozolowych, pozostających w rejonach gradientu o większej gęstości wła-

ściwej. Analizy składu frakcji DRM wykazały w ich obrębie akumulację białek z kotwicą GPI, takich jak CD14, i białek palmitoilowanych w tym kinaz z rodziny Src. Istotne jest także, że frakcja DRM izolowana z limfocytów, komórek tucznych lub monocytów była wzbogacona w aktywowane immunoreceptory, a także białka ich kaskad sygnałowych (SHEETS i współaut. 1999, KWIATKOWSKA i współaut. 2003). Wyniki te potwierdzają tezę, że immunoreceptory w wyniku aktywacji i mikroagregacji asocjują z tratwami błonowymi, gdzie ulegają fosforylacji, i uruchamiają właściwą odpowiedź komórki. Analiza składu białkowego i lipidowego frakcji DRM wymaga jednak ostrożności, gdyż kompozycja wyizolowanej frakcji zależy od użytego detergentu, jego stężenia, temperatury i czasu lizy, a także typu komórek (SHOGOMORI i BROWN 2003). Na przykład, aktywowany przez LPS receptor TLR4 izolowany był we frakcji DRM monocytów, ale nie makrofagów (TRIANTAFILOU i współaut. 2002, DHUNGANA i współaut. 2009). Frakcja DRM jest zatem wzbogacona w składniki tratw lipidowych, ale nie jest z nią tożsama. Uważa się jednak, że zmienność składu frakcji DRM może odzwierciedlać różnorodny skład i organizację tratw błonowych w komórkach (LEVENTAL i współaut. 2011, HOREJSI i HRDINKA 2014).

Techniczne ograniczenia analiz biochemicznych sprawiają, że wyjątkowo cenne w badaniach nad organizacją tratw w natywnych błonach komórkowych stają się analizy mikroskopowe. Z uwagi na nanometrową wielkość tratw w komórkach spoczynkowych, badania te zyskały nowy asumpt w wyniku rozwoju mikroskopii wysokorozdzielczej (OWEN i GAUS 2013). Obserwacje takie unocznili na przykład związki pomiędzy formowaniem się nanoskupisk receptora TCR i białek z kotwicą GPI a aktywacją przez te białka szlaków sygnałowych (SUZUKI i współaut. 2012, PAGEON i współaut. 2016). Obrazowanie lokalizacji białek w błonie komórkowej jest często skorelowane z ilościową analizą współwystępowania białek i lipidów tratw. Zastosowanie analizy transferu energii fluorescencji wykazało asocjację receptora TLR4, białka CD14 i gangliozydu tratw GM1 w monocytach stymulowanych przez LPS (TRIANTAFILOU i współaut. 2002). Inkorporacja barwnika fluorescencyjnego Laurdanu, którego maksimum fluorescencji zmienia się w zależności od stopnia uporządkowania dwuwarstwy lipidowej, potwierdziła heterogenną budowę błony komórkowej (OWEN i współaut. 2012).

Jak wspomniano wcześniej, formowanie się tratw błonowych zależy od interakcji cholesterolu i sfingolipidów. W związku z tym, zaburzenia przekazywania sygna-

lu przez receptory, które są następstwem zmian poziomu tych lipidów w komórkach, interpretowane są jako potwierdzenie udziału tratw w tym procesie. Obniżenie poziomu cholesterolu hamuje asocjacje receptorów FcεI, FcγIIa, TCR i TLR4 z frakcją DRM, przeciwdziałając jednocześnie indukowanej przez ich ligandy fosforylacji tyrozynowej białek, zmianom poziomu jonów wapnia w cytoplazmie i produkcji cytokin. Natomiast podniesienie zawartości cholesterolu w błonie komórkowej wywiera efekt przeciwny (HOREJSI i HRDINKA 2014, PŁOCIENNIKOWSKA i współaut. 2015a). Podobnie, istotne znaczenie palmitoilacji białek dla ich funkcjonowania w obrębie tratw błonowych stymuluje badania mierzące do wyjaśnienia dynamiki tego procesu w czasie aktywacji receptorów. Badania takie zostały ułatwione przez opracowanie metod detekcji palmitoilacji, które przewyższają czułością stosowaną do tej pory technikę znakowania komórek radioaktywnym kwasem palmitynowym. Pierwsza z nich polega na przyżyciowym znakowaniu komórek pochodną kwasu palmitynowego, modyfikowanego przez obecność grupy alkinowej lub azydowej. Taka modyfikacja umożliwia wychycenie znakowanych białek w otrzymanyach z komórek lizatach w wyniku reakcji chemicznej nazywanej „click”, która zachodzi pomiędzy wspomnianą grupą funkcyjną kwasu tłuszczowego a modyfikowaną biotyną lub znacznikiem fluorescencyjnym (MARTIN i CRAVATT 2009). Druga z metod, tzw. ABE (ang. acyl-biotin exchange), polega na podstawieniu przyłączonych do białek reszt kwasu palmitynowego przez pochodną biotyny po lizie komórek. Wyznaczone białka odzyskiwane są przez adsorpcję na kulkach ze streptawidyną (DRISDEL i GREEN 2004). Techniki te umożliwiają badania proteomiczne i zaowocowały identyfikacją nieznanych wcześniej palmitoilowanych białek w makrofagach (MERRICK i współaut. 2011, THINON i współaut. 2016, SOBOCINSKA i współaut. 2017). Co więcej, zastosowanie metody „click” ujawniło dynamiczne zmiany palmitoilacji kinazy Lck, towarzyszące aktywacji limfocytów T (ZHANG i współaut. 2010).

Podsumowując, wyniki różnorodnych badań potwierdzają tezę, że sfingolipidowo-cholesterolowe tratwy błonowe są miejscami aktywacji szeregu receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej komórek układu odpornościowego. Ich funkcjonowanie warunkuje zatem szerokie spektrum reakcji wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi odpornościowej człowieka i zwierząt. Warto pamiętać, że tratwy błonowe są też wykorzystywane przez wirusy i bakterie do sforsowania błony komórek gospodarza. Przykładem tego typu bakterii jest *Shigella flexneri* odpowia-

dająca za zakażenia pokarmowe. Wydziela ona białka oddziałujące z lipidami tratw, co umożliwia jej adhezję do atakowanej komórki w jelicie, wprowadzenie do niej czynników indukujących polimeryzację filamentów aktynowych pod błoną, jej pofałdowanie i internalizację bakterii w obrębie fałd zamykających się w makropinosomy (VAN DER GOOT i współaut. 2004). Niektóre toksyny bakteryjne, takie jak toksyna cholery czy toksyna shiga bakterii *Shigella*, a także małpi wirus SV40, wnikają do komórek gospodarza na drodze endocytozy indukowanej poprzez interakcję z glikolipidami tratw (EWERS i współaut. 2010). Inne toksyny bakteryjne, na przykład perfringolizyna O produkowana przez laseczki zgorzeli gazowej *Clostridium perfringens*, wiąże się do cholesterolu skupionego w obrębie tratw błonowych, co prowadzi do uformowania porów w błonie komórkowej i lizy komórki (KACPRZYK-STOKOWIEC i współaut. 2014). Wiele białek wirusowych jest palmitoilowanych, co umożliwia ich inwazję, a także uwalnianie wirusów z zainfekowanych komórek (VEIT 2012).

DOMENY BŁONY KOMÓRKOWEJ BAKTERII

Cholesterol i sfingolipidy występują w komórkach eukariotycznych (HANNICH i współaut. 2011), dlatego opisane powyżej nanodomeny sfingolipidowo-cholesterolowe są spotkane w tych organizmach. Bakterie, poza nielicznymi wyjątkami, nie syntetyzują sfingolipidów ani cholesterolu. Ciekawym przypadkiem jest *Borrelia burgdorferi*, krętek wywołujący boreliozę, który pobiera egzogeny cholesterol, modyfikuje go i wbudowuje w swoje błony. Pomimo braku sfingolipidów, inkorporacja cholesterolu do błony zewnętrznej krętka prowadzi do wyodrębnienia się w niej domen błonowych, które są analogiczne do występujących w błonie komórkowej komórek eukariotycznych (LAROCCA i współaut. 2013). Zdolność wykorzystywania egzogenego cholesterolu do budowy własnych błon przez *B. burgdorferi* wydaje się być wyjątkiem i może wynikać z cyklu życiowego tej bakterii, przebiegającego wyłącznie wewnątrz komórek kleszczy lub ssaków, które są bogatym źródłem tego sterolu. Niemniej jednak, badania kilku ostatnich lat wykazały, że błona komórkowa innych bakterii również może mieć heterogenną budowę, która jest uwarunkowana interakcją lipidów i białek występujących w tych komórkach. Uważa się, że bakteryjne domeny błonowe stwarzają środowisko sprzyjające lokalnej aktywności białek uczestniczących między innymi w przekazywaniu sygnału, co przypomina rozwiązania opisane w komórkach eukario-

tycznych (BRAMKAMP i LÓPEZ 2015, WAGNER i współaut. 2016).

Lipidowym budulcem bakteryjnych domen błonowych są prawdopodobnie izoprenoidy. Szczególną uwagę zwraca obecność w błonach bakteryjnych cyklicznych form tych związków, nazywanych hopanoidami. Są to pochodne skwalenu (węglowodoru zawierającego sześć jednostek izoprenowych), produkowane przez bakteryjny enzym SqhC. Strukturalnie hopanoidy przypominają cholesterol komórek eukariotycznych, w których z kolei związki te nie występują. Wykazano, że obecność hopanoidów w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych *Methylobacterium extorquens* zwiększa jej uporządkowanie. Dzieje się tak dzięki preferencyjnej interakcji hopanoidów z lipidem A lipopolisacharydu, który z kolei ze względu na obecność nasyconych kwasów tłuszczowych ma strukturę analogiczną do sfingolipidów. Zaobserwowano, że zaburzenie syntezy hopanoidów hamuje transport cząsteczek przez błonę bakterii, wskazując na funkcjonalne znaczenie uporządkowania lipidów w błonie bakteryjnej (SAENZ i współaut. 2015). Błony bakteryjne są też bogate w niecykliczne poliizoprenoidy, do których należą karotenoidy, i uważa się, że związki te mogą modulować organizację błon bakteryjnych, przypominając pod tym względem cholesterol komórek eukariotycznych. Ponadto, elementem budulcowym bakteryjnych domen błonowych może być fosfolipid – kardiolipina, która w komórkach eukariotycznych występuje prawie wyłącznie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, natomiast stanowi nawet 30% lipidów błony bakteryjnej i zdaje się wzbogacać w błonie w rejonach zlokalizowanych na biegunach bakterii (DONOVAN i BRAMKAMP 2009). Istotnych danych wskazujących, że to jednak poliizoprenoidy są kluczowe w formowaniu błonowych domen dostarczyły badania Gram-dodatniej bakterii *Bacillus subtilis*, modelowego mikroorganizmu w badaniach domen błonowych organizmów prokariotycznych. W normalnych warunkach frakcja DRM wyizolowana z tych bakterii zawierała flotyliny i szereg innych białek, między innymi kinazę histydynową KinC, której aktywność jest kluczowa dla formowania biofilmu przez *B. subtilis*. Zahamowanie aktywności enzymu szlaku syntezy poliizoprenoidów, YisP, lub delecja genu kodującego ten enzym prowadziło do zubożenia frakcji DRM w kinazę KinC i flotyliny oraz stopniowej degradacji tych białek. W efekcie zaburzone było formowanie biofilmu i sekrecja białek przez bakterie (LÓPEZ i KOLTER 2010, BACH i BRAMKAMP 2013). Wyniki tych badań doprowadziły do sformułowania hipotezy, wysuniętej przez BRAMKAMP i LÓPEZA (2015),

że przy wszelkich zastrzeżeniach dotyczących różnic składu lipidowo-białkowego, bakteryjne domeny błonowe mogą spełniać funkcję analogiczną do nanodomen komórek eukariotycznych i zapewniać właściwe funkcjonowanie szeregu białek błonowych związanych z transportem cząsteczek przez błonę bakterii, wydzielaniem białek i metabolizmem ściany komórkowej.

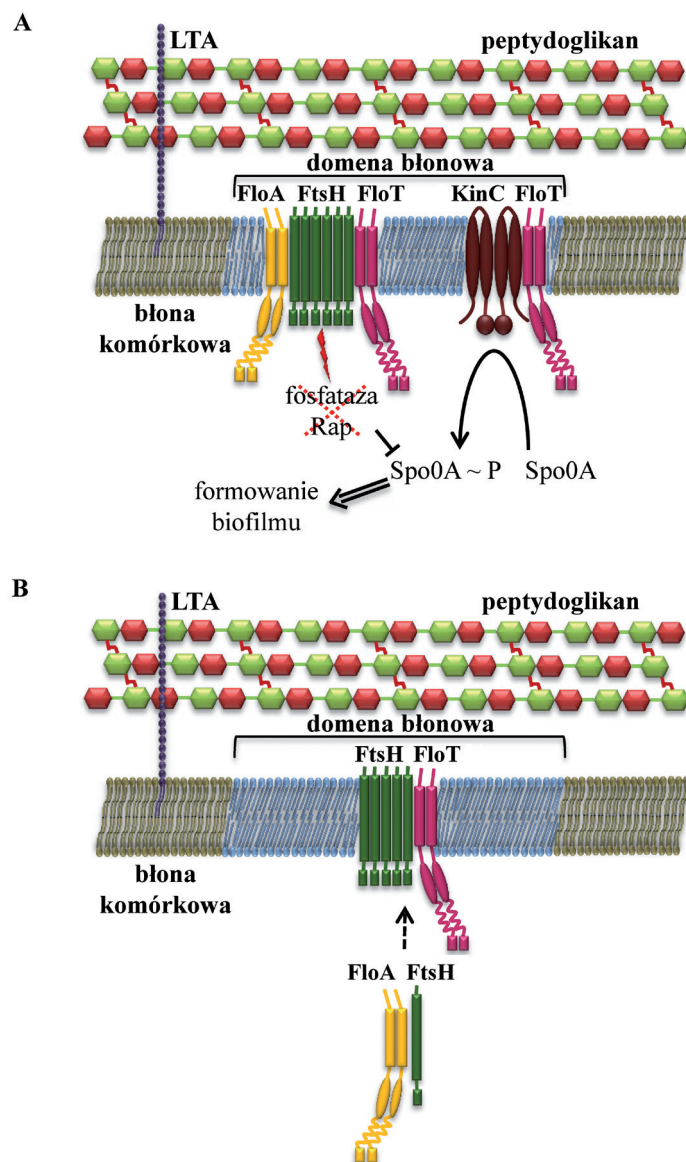
Cechą charakterystyczną bakteryjnych domen błonowych jest obecność białka flotyliny. Flotyliny bakteryjne, w odróżnieniu od flotylin występujących w komórkach eukariotycznych, nie są acylowane i mogą być białkami transbłonowymi. Niemniej jednak ich obecność wykryto we frakcji DRM izolowanej z bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis*, *B. halodurans*, *B. anthracis* i *Staphylococcus aureus* (DONOVAN i BRAMKAMP 2009, LÓPEZ i KOLTER 2010, SOMANI i współaut. 2016). Analiza składu aminokwasowego flotylin *B. subtilis*, FloT i FloA, wykazała ich wysoką homologię do białek eukariotycznych, flotyliny-1 i -2. Flotyliny bakterii Gram-ujemnych nie były dotąd badane, aczkolwiek analiza *in silico* wskazuje na ich obecność w tych organizmach, a także w komórkach archeonów (BRAMKAMP i LÓPEZ 2015).

Punktem wyjścia dla hipotezy, że flotyliny bakteryjne współuczestniczą w formowaniu domen błonowych było odkrycie skupisk flotylin pod błoną komórkową *B. subtilis*. Skupiska takie były dynamiczne, a ich liczba wzrastała od kilku do kilkunastu w czasie, gdy hodowla bakterii osiągnęła stacjonarną fazę wzrostu. Pojedyncze skupiska FloT wykrywano też w błonie *S. aureus* (DONOVAN i BRAMKAMP 2009, LÓPEZ i KOLTER 2010). Późniejsza analiza mikroskopowa i proteomiczna wykazała, że FloA i FloT tworzą odrębne domeny i mogą oddziaływać z odmiennymi lub wspólnymi typami białek. Wśród białek oddziałujących wybiórczo z FloA jest kinaza histydynowa PhoR, a z FloT – kinaza histydynowa ResE i KinC. Aktywność tych kinaz o właściwościach sensorów bodźców zewnętrznych jest modulowana przez flotyliny. Do białek oddziałujących z obiema flotylinami bakteryjnymi należy proteaza FtsH (LÓPEZ i KOLTER 2010, SCHNEIDER i współaut. 2015). O funkcjonalnym znaczeniu integralności bakteryjnych domen błonowych świadczyły przytaczane wyżej wyniki hamowania syntezy poliizoprenoidów, a także delecji genów kodujących flotyliny, które hamowały szereg procesów komórkowych, takich jak formowanie biofilmu, sporulację oraz sekrecję białek przez *B. subtilis* i *S. aureus*. Potwierdzono też, że selektywna delecja FloA lub FloT hamowała wybiórczo szlaki sygnałowe zależne od aktywności oddziałujących z nimi białek: kinaz sensorowych PfoR i ResE

(LÓPEZ i KOLTER 2010, SCHNEIDER i współaut. 2015). W tych warunkach zanikowi ulegała też domenowa organizacja błony komórkowej bakterii uwidoczniła przy użyciu barwnika Laurdanu (BACH i BRAMKAMP 2013). Dane te stały się podstawą hipotezy mówiącej, że flotyliny funkcjonują jako białka rusztowaniowe, które umożliwiają powstawanie domen lipidowo-białkowych w błonie komórkowej bakterii, uczestniczących między innymi w

szlakach sygnałowych uruchamianych przez szereg bodźców zewnętrznych (BRAMKAMP i LÓPEZ 2015).

Rycina 2A ilustruje w jaki sposób domeny błonowe, stabilizowane przez flotyliny w *B. subtilis*, mogą umożliwiać powstawanie kompleksu białkowego, kontrolującego formowanie biofilmu przez te bakterie (BRAMKAMP i LÓPEZ 2015, WAGNER i współaut. 2016). Powstawanie biofilmu jest induk-



Ryc. 2. Domeny błony komórkowej bakterii. Lipidami formującymi domeny błony bakteryjnej są poliizoprenoidy, takie jak karotenoidy, a także cykliczne izoprenoidy – hopanoidy.

Nie wyklucza się też udziału ujemnie naładowanych fosfolipidów, takich jak kardiolipina. Flotyliny bakteryjne – FloA i FloT, białka rusztowaniowe domen, przedstawiono tu jako białka penetrujące błonę komórkową. (A) Środowisko lipidowe i udział flotylin w obrębie domen, stwarza warunki do lokalnej oligomeryzacji i aktywacji kinazy histydynowej KinC oraz proteazy FtsH. Aktywność KinC prowadzi do fosforylacji Spo0A, która jest czynnikiem kontrolującym formowanie biofilmu przez bakterie. Z kolei proteaza FtsH przyczynia się do utrzymania Spo0A w formie ufosforylowanej poprzez hydrolizę fosfataz Rap (wg WAGNER i współaut. 2016, zmodyfikowane). (B) Według innej koncepcji, flotyliny ułatwiają transport FtsH z cytoplazmy do błony bakterii i wbudowywanie tej proteazy w obszary o specyficznym składzie lipidowym (wg DEMPWOLFF i współaut 2016). LTA, kwas lipoteichojowy.

wane przez cząsteczki surfaktyny, wydzielanej przez te bakterie. Surfaktyna aktywuje kinazę histydynową KinC, a aktywacja wymaga zakotwiczenia kinazy w obrębie domen formowanych przez poliizoprenoidy i flotylinę FloT (Ryc. 2A). Aktywowana kinaza KinC dimeryzuje, ulega autofosforylacji na reszcie histydynowej, a następnie przenosi grupę fosforanową na resztę kwasu asparaginowego białka Spo0A, przy udziale kompleksu białek Spo0F/Spo0B. Po przyłączeniu grupy fosforanowej, białko Spo0A indukuje ekspresję genów *eps* i *tasA* kodujących białka - składniki macierzy, niezbędne do uformowania biofilmu bakterii. Domena błonowa może też sprzyjać lokalnej akumulacji białek modulujących opisany szlak sygnałowy prowadzący do formowania biofilmu. Należy do nich proteaza FtsH, której aktywność zależy od jej interakcji z flotylinami FloA i FloT. FtsH katalizuje proteolizę fosfataz RapA, RapB, RapE i Spo0E, a przez to sprzyja utrzymaniu fosforylacji, a zatem i aktywności sygnałowej Spo0A. Dodatkowo, aktywność proteazy FtsH, skupionej w obrębie domen błonowych stabilizowanych przez flotyliny, może wpływać na sporulację bakterii. Podobnie, interakcja flotylin z białkami systemu sekrecyjnego Sec i podyktowana przez flotyliny domenowa organizacja błony bakterijnej kontroluje potencjalnie aktywność tego systemu (BRAMKAMP i LÓPEZ 2010, WAGNER i współaut. 2016).

Interesujące, ale odmienne od opisanego powyżej spojrzenie na funkcję flotylin bakterijnych przyniosły wyniki analizy dynamiki ruchu i współwystępowania tych białek z białkami błony *B. subtilis*, prowadzone w czasie rzeczywistym w wysokorozdzielczym mikroskopie konfokalnym (DEMPWOLFF i współaut. 2016). Potwierdziły one istnienie w błonie komórkowej bakterii skupisk flotylinowych, których wielkość (85-100 nm) odpowiada wielkości skupisk tego białka wykrywanych w komórkach eukariotycznych. Co ciekawe zaobserwowano, że skupiska FloA i FloT tylko w małym stopniu współwystępowały ze skupiskami białek KinC, FtsH, SecA i kilku innych białek izolowanych w obrębie frakcji DRM. Zasugerowano zatem, że flotyliny mogą być odpowiedzialne za transport z cytoplazmy i wbudowywanie się do błony komórkowej białek takich jak FtsH (DEMPWOLFF i współaut. 2016). Według tego scenariusza, flotyliny umożliwiałyby wbudowywanie się tych białek do specyficznych obszarów błony komórkowej o określonym składzie lipidowym. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie jakie dla istnienia skupisk flotylin ma aktywność enzymu syntezy poliizoprenoidów, YisP, można przypuszczać, że miejscem wbudowywania się takich białek

byłyby obszary błony wzbogacone w te lipidy (Ryc. 2B). Tym samym zakwestionowano rolę flotylin jako białek rusztowaniowych, stabilizujących skupiska białek FtsH czy KinC w błonie (DEMPWOLFF i współaut. 2016). Późniejsze prace sugerowały, że udział bakterijnych domen błonowych w formowaniu kompleksów białkowych zależy od warunków hodowli bakterii (WAGNER i współaut. 2016).

Podsumowując, szereg danych wskazuje, że w błonie bakterijnej istnieją obszary, w których skupiają się flotyliny i inne wybrane białka błonowe, a obszary te wyróżniają się zwiększonym uporządkowaniem lipidów, co przypuszczalnie umożliwia ich izolowanie w obrębie frakcji DRM. Wydaje się prawdopodobne, że takie domeny błonowe różnią się między sobą obecnością białek sensorowych i innych enzymów, dzięki czemu pełnią funkcję platform warunkujących lokalne skupienie współdziałających ze sobą białek. Możliwe też, że funkcja flotylin bakterijnych wykracza poza rolę domenowego białka rusztowaniowego, podobnie jak ma to miejsce w komórkach eukariotycznych.

UWAGI KOŃCOWE

Domenowa budowa błony komórkowej wydaje się być wspólnym sposobem organizacji struktury błony komórek eukariotycznych i prokariotycznych. W obu typach komórek istnieją mechanizmy prowadzące do wyodrębniania się określonych rejonów błony komórkowej, lokalnej akumulacji białek i wykluczania innych, co między innymi sprzyja szybkiemu i efektywnemu uruchomieniu wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych. Pomimo ogólnych podobieństw, skład lipidowo-białkowy domen błonowych komórek eukariotycznych i bakterii jest odmienny. Tratwy (nanodomeny) błonowe komórek eukariotycznych formują się przede wszystkim dzięki oddziaływaniom sfingolipidów i cholesterolu. Skład błonowych domen bakterijnych jest słabiej poznany, chociaż szereg danych wskazuje, że ich lipidowym budulcem są poliizoprenoidy i/lub hopanoidy, a udział w ich formowaniu przypisuje się też białku, flotylinie.

Do najlepiej poznanych procesów zachodzących przy udziale tratw błonowych komórek eukariotycznych należy aktywacja receptorów błony komórkowej, zaangażowanych w reakcje odporności wrodzonej i nabytej. Paradoksalnie, niektóre wirusy i bakterie wykorzystują tratwy błonowe jako miejsca inwazji/opuszczania komórek gospodarza, ponieważ wykształciły w toku ewolucji białka, które oddziałują swoiście z lipidami lub białkami tratw błonowych komórek eukariotycznych. Domeny obecne w błonie komórkowej

bakterii także mogą pełnić funkcję platform sygnałowych, warunkujących istotne funkcje życiowe tych mikroorganizmów. Z uwagi na unikatowy skład lipidowy tych struktur, np. występowanie w ich obrębie poliizoprenoidów niespotykanych w błonach komórek eukariotycznych, mogą one stanowić dogodny cel działania nowych leków, stanowiąc szansę na przełamanie antybiotykooporności niektórych szczepów bakteryjnych.

Streszczenie

Błona komórkowa komórek eukariotycznych jest niejednorodna i charakteryzuje się obecnością domen nazywanych twarzą błonowymi. Są to liczące kilka nanometrów dynamiczne skupiska sfingolipidów, cholesterolu i wybranych białek, zwłaszcza palmitoilowanych, które wyodrębniają się z otaczającego je środowiska glicerofosfolipidów. Labilne nanodomeny zlewają się w większe struktury, platformy sygnałowe, stabilizowane przez interakcję z cytoskieletem podbłonowym w czasie aktywacji szeregu receptorów zaangażowanych w reakcje wrodzonej i nabytej odporności. Paradoksalnie, niektóre wirusy i bakterie wykorzystują trawy błonowe jako miejsca inwazji/opuszczania komórek gospodarza. Z drugiej strony, w błonie bakterii wykryto rejony, w których także skupiają się wybrane białka sensorowe i enzymy, co sugeruje udział domen błony bakteryjnej w procesach przekazywania sygnału. Skład lipidowy bakteryjnych domen błonowych jest słabo poznany, a rolę w ich formowaniu przypisuje się białku flotyllinie. Heterogenna organizacja błony komórkowej jest zatem zachowanym ewolucyjnie sposobem zapewnienia właściwej przestrzennej organizacji receptorów oraz białek i lipidów biorących udział w ich kaskadach sygnałowych, która stała się szczególnie istotna dla funkcjonowania komórek układu odpornościowego człowieka i zwierząt.

LITERATURA

- ABDEL-SHAKOR A. B., KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 2004. *Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts*. J. Biol. Chem. 279, 36778-36787.
- AHMED S. N., BROWN D. A., LONDON D. A., 1997. *On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes*. Biochemistry 36, 10944-10953.
- ARIOTTI N., PARTON R. G., 2013. *SnapShot: caveolae, caveolins, and cavins*. Cell 154, 704.
- BACH J. N., BRAMKAMP M., 2013. *Flotillins functionally organize the bacterial membrane*. Mol. Microbiol. 88, 1205-1217.
- BRAMKAMP M., LÓPEZ D., 2015. *Exploring the existence of lipid rafts in bacteria*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 81-100.
- BRDICKA T., IMRICH M., ANGELISOVÁ P., BRDICKOVÁ N., HORVÁTH O., SPICKA J., HILGERT I., LUSKOVÁ P., DRÁBER P., NOVÁK P., ENGELS N., WIEHANDS J., SIMEONI L., OSTERREICHER J., AGUADO E., MALISSEN M., SCHRAVEN B., HOREJSÍ V., 2002. *Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling*. J. Exp. Med. 196, 1617-1626.
- CHAMBERLAIN L. H., SHIPSTON M. J., 2015. *The physiology of protein S-acylation*. Physiol. Rev. 95, 341-376.
- DEMPWOLFF F., SCHMIDT F. K., HERVÁS A. B., STROH A., RÖSCH T. C., RIESE C. N., DERSCH S., HEIMERL T., LUCENA D., HÜLSBUSCH N., STUERMER C. A., TAKESHITA N., FISCHER R., ECKHARDT B., GRAUMANN P. L., 2016. *Super resolution fluorescence microscopy and tracking of bacterial flotillin (Reggie) paralogs provide evidence for defined-sized protein microdomains within the bacterial membrane but absence of clusters containing detergent-resistant proteins*. PLoS Genet. 12, e1006116.
- DHUNGANA S., MERRICK B. A., TOMER K. B., FESLER M. B., 2009. *Quantitative proteomics analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide*. Mol. Cell. Proteom. 8, 201-213.
- DIAZ-ROHRER B. B., LEVENTAL K. R., SIMONS K., LEVENTAL I., 2014. *Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 8500-8505.
- DONOVAN C., BRAMKAMP M., 2009. *Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue*. Microbiology 155, 1786-1799.
- DRISDEL R. C., GREEN W. N., 2004. *Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation*. Bio-techniques 36, 276-285.
- EWERS H., RÖMER W., SMITH A. E., BACIA K., DMITRIEFF S., CHAI W., MANCINI R., KARTENBECK J., CHAMBON V., BERLAND L., OPPENHEIM A., SCHWARZMANN G., FEIZI T., SCHWILLE P., SENS P., HELENIUS A., JOHANNES L., 2010. *GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection*. Nat. Cell Biol. 12, 11-18.
- GOLAB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA T., 2012. *Immunologia*. PWN.
- HANNICH J. T., UMEBAYASHI K., RIEZMAN H., 2011. *Distribution and functions of sterols and sphingolipids*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a004762.
- HOREJSÍ V., HRDINKA M., 2014. *Membrane microdomains in immunoreceptor signaling*. FEBS Lett. 588, 2392-2397.
- JOZEFOWSKI S., CZERKIES M., ŁUKASIK A., BIELAWSKA A., BIELAWSKI J., KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 2010. *Ceramide and ceramide 1-phosphate are negative regulators of TNF-α production induced by lipopolysaccharide*. J. Immunol. 185, 6960-6973.
- KACPRZYK-STOKOWIEC A., KULMA M., TRACZYK G., KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., DADLEZ M., 2014. *Crucial role of perfringolysin O D1 domain in orchestrating structural transitions leading to membrane-perforating pores: a hydrogen-deuterium exchange study*. J. Biol. Chem. 289, 28738-28752.
- KAWAI T., AKIRA S., 2011. *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity 34, 637-650.
- KUSUMI A., FUJIWARA T. K., MORONE N., YOSHIDA K., J., CHADDA R., XIE M., KASAI R. S., SUZUKI K. G., 2012. *Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes*. Semin. Cell Dev. Biol. 23, 126-144.
- KWIATKOWSKA K., FREY J., SOBOTA A., 2003. *Phosphorylation of FcγRIIA is required for the re-*

- ceptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J. Cell Sci.* 116, 537-550.
- LAROCCA T. J., PATHAK P., CHIANTIA S., TOLEDO A., SILVIUS J. R., BENACH J. L., LONDON E., 2013. Proving lipid rafts exist: membrane domains in the prokaryote *Borrelia burgdorferi* have the same properties as eukaryotic lipid rafts. *PLoS Pathog* 9, e1003353.
- LEVENTAL I., GRZYBEK M., SIMONS K., 2011. Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 11411-11416.
- LINGWOOD D., SIMONS K., 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
- LONDON E., BROWN D. A., 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 182-195.
- LÓPEZ D., KOLTER R., 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* 24, 1893-1902.
- LACH A., GRZYBEK M., HEGER E., KORYCKA J., WOLNY M., KUBIAK J., KOLONDR A., BOGUSŁAWSKA D. M., AUGOFF K., MAJKOWSKI M., PODKALICKA J., KACZOR J., STEFANKO A., KULICZKOWSKI K., SIKORSKI A. F., 2012. Palmitoylation of MPP1 (membrane-palmitoylated protein 1)/p55 is crucial for lateral membrane organization in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 287, 18974-118984.
- MARTIN B. R., CRAVATT B. F., 2009. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat. Methods* 6, 135-138.
- MERRICK B. A., DHUNGANA S., WILLIAMS J. G., ALOOR J. J., PEDDADA S., TOMER K. B., FESSLER M. B., 2011. Proteomic profiling of S-acylated macrophage proteins identifies a role for palmitoylation in mitochondrial targeting of phospholipid scramblase 3. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006007.
- OTTO G. P., NICHOLS B. J., 2011. The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond. *J. Cell Sci.* 124, 3933-3940.
- OWEN D. M., GAUS K., 2013. Imaging lipid domains in cell membranes: the advent of super-resolution fluorescence microscopy. *Front. Plant Sci.* 4, 503.
- OWEN D. M., WILLIAMSON D. J., MAGENAU A., GAUS K., 2012. Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat. Commun.* 3, 1256.
- PAGEON S. V., TABARIN T., YAMAMOTO Y., MA Y., NICOVICH P. R., BRIDGEMAN J. S., COHNEN A., BENZING C., GAO Y., CROWTHER M. D., TUNGATT K., DOLTON G., SEWELL A. K., PRICE D. A., ACUTO O., PARTON R. G., GOODING J. J., ROSSY J., ROSSJOHN J., GAUS K., 2016. Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E5454-E5463.
- PARK B. S., SONG D. H., KIM H. M., CHOI B. S., LEE H., LEE J. O., 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1195.
- PLÓCIENNIKOWSKA A., HROMADA-JUDYCKA A., BORZECKA K., KWIATKOWSKA K., 2015a. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 557-581.
- PLÓCIENNIKOWSKA A., ZDIORUK M. I., TRACZYK G., ŚWIĄTKOWSKA A., KWIATKOWSKA K., 2015b. LPS-induced clustering of CD14 triggers generation of PI(4,5)P₂. *J. Cell Sci.* 128, 4096-4111.
- RAGHUPATHY R., ANILKUMAR A. A., POLLEY A., SINGH P. P., YADAV M., JOHNSON C., SURYAWANSHI S., SAIKAM V., SAWANT S. D., PANDA A., GUO Z., VISHWAKARMA R. A., RAO M., MAYOR S., 2015. Transbilayer lipid interactions mediate nano-clustering of lipid-anchored proteins. *Cell* 161, 581-594.
- RAZZAQ T. M., OZEGBE P., JURY E. C., SEMBI P., BLACKWELL N. M., KABOURIDIS P. S., 2004. Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* 113, 413-426.
- SÁENZ J. P., GROSSER D., BRADLEY A. S., LAGNY T. J., LAVRYNENKO O., BRODA M., SIMONS K., 2015. Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 11971-11976.
- SCHNEIDER J., KLEIN T., MIELICH-SUSS B., KOCH G., FRANKE C., KUIPERS O. P., KOVACS A. T., SAUER M., LÓPEZ D., 2015. Spatio-temporal remodeling of functional membrane microdomains organizes the signaling networks of a bacterium. *PLoS Genet.* 11, e1005140.
- SHEETS E. D., HOLOWKA D., BAIRD B., 1999. Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes. *J. Cell Biol.* 145, 877-887.
- SHOGOMORI H., BROWN D. A., 2003. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol. Chem.* 384, 1259-1263.
- SIMONS K., IKONEN E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- SINGER S. J., NICOLSON G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- SOBOCIŃSKA J., ROSZCZENKO-JASIŃSKA P., ZAREBA-KOZIOL M., HROMADA-JUDYCKA A., MATVEICHUK O. V., TRACZYK G., KWIATKOWSKA K., 2017. LPS upregulates palmitoylated enzymes of the phosphatidylinositol cycle. An insight from proteomic studies. *Mol. Cell. Proteom.*, w druku.
- SOMANI V. K., AGGARWAL S., SINGH D., PRASAD T., BHATNAGAR R., 2016. Identification of novel raft marker protein, FlotP in *Bacillus anthracis*. *Front. Microbiol.* 7, 169.
- STEPANEK O., DRABER P., HOREJSI V., 2014. Palmitoylated transmembrane adaptor proteins in leukocyte signaling. *Cell. Signal.* 26, 895-902.
- STUERMER C. A., 2011. Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo. *J. Neurochem.* 116, 708-713.
- SUZUKI K. G., KASAI R. S., HIROSAWA K. M., NEMOTO Y. L., ISHIBASHI M., MIWA Y., FUJIWARA T. K., KUSUMI A., 2012. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat. Chem. Biol.* 8, 774-783.
- TAVANO R., CONTENTO R. L., BARANDA S. J., SOLIGO M., TUOSTO L., MANES S., VIOLA A., 2006. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat. Cell Biol.* 8, 1270-1276.
- THINON E., PERCHER A., HANG H. C., 2016. Bio-orthogonal chemical reporters for monitoring unsaturated fatty-acylated proteins. *ChemBiochem.* 17, 1800-1803.
- TRIANTAFILOU M., MIYAKE K., GOLENBOCK D. T., TRIANTAFILOU K., 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 115, 2603-2611.

- VAN DER GOOT F. G., TRAN VAN NHIEU G., ALLA-OUI A., SANSONETTI P., LAFONT F., 2004. *Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism*. J. Biol. Chem. 279, 47792-47798.
- VEIT M., 2012. *Palmitoylation of virus proteins*. Biol. Cell 104, 493-515.
- WAGNER R. M., KRICKS L., LÓPEZ D., 2016. *Functional membrane microdomains organize signaling networks in bacteria*. J. Membr. Biol., w druku.
- ZANONI I., OSTUNI R., MAREK L. R., BARRESI S., BARBALAT R., BARTON G. M., GRANUCCI F., KAGAN J. C. 2011. *CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4*. Cell 147, 868-880.
- ZHANG Y., LI X., BECKER K. A., GULBINS E., 2009. *Ceramide-enriched membrane domains - structure and function*. Biochim. Biophys. Acta. 1788,178-183.
- ZHANG M. M., TSOU L. K., CHARRON G., RAGHAVAN A. S., HANG H. C., 2010. *Tandem fluorescence imaging of dynamic S-acylation and protein turnover*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 8627-8632.

KOSMOS Vol. 66, 4, 691-702, 2017

KAMILA PRYMAS, KATARZYNA KWIATKOWSKA

Laboratory of Molecular Membrane Biology, Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, E-mail: k.prymas@nencki.gov.pl, k.kwiatkowska@nencki.gov.pl

MEMBRANE DOMAINS OF EUKARYOTIC AND PROKARYOTIC CELLS: THEIR ROLE IN SIGNAL TRANSDUCTION**Summary**

The plasma membrane of eukaryotic cells contains domains named rafts which are nonscale dynamic assemblies of sphingolipids, cholesterol and selected proteins, mainly palmitoylated ones. During stimulation of distinct immune receptors labile rafts merge into larger structures which are stabilized by submembraneous cytoskeleton and serve as signaling platforms of those receptors. Paradoxically, rafts are also utilized by some viruses and bacteria to invade/escape host cells. On the other hand, bacterial plasma membrane contains domains accommodating sensory proteins and several other enzymes which suggests that those domains are sites of signal transduction. Lipid composition of bacterial membrane domains is poorly characterized and a role in their formation is ascribed to proteins named flotillins. Thus, domain organization of the plasma membrane seems to be common to eukaryotic and prokaryotic cells. It facilitates spatial organization of plasma membrane receptors as well as lipids and proteins involved in their signaling pathways. During evolution rafts of the plasma membrane have become important especially for functioning of human and animal immune cells.

Key words: cholesterol, flotillin, plasma membrane, rafts, sphingolipids