

Rafty

nejen na divoké vodě

Membránové mikrodomény

VÁCLAV HOŘEJŠÍ
TOMÁŠ BRDIČKA

Kdybychom si typickou buňku zvětšili do velikosti melounu, byla by na povrchu pokrytá polo-propustnou blánou silnou jako papír – cytoplazmatickou membránou, složenou ze stovek typů lipidů a proteinů. Je to selektivní bariéra vybavená specifickými transportními a signalizačními mechanismy, která umožňuje přesné řízení výměny látek a informací mezi vnitřním prostředím buněk a jejich okolím. Důležitá je však také pro další buněčné funkce, jako je například migrace nebo adheze k mezibuněčné hmotě či jiným buňkám. Podobné membrány obklopují i vnitrobuněčné organely. V buněčných membránách jsou lipidy uspořádány do dvojvrstvy o tloušťce zhruba 7–9 nanometrů, v které jsou hydrofobní části lipidových molekul (zbytků mastných kyselin) orientovány k sobě navzájem a tvoří vnitřní část membrány, zatímco hydrofilní „hlavičky“ jsou v kontaktu s okolím. Vzniká tak plošný útvar, v jehož každé vrstvě se lipidy mohou více či méně volně pohybovat, avšak samovolně z jedné vrstvy do druhé přecházejí jen obtížně. To je důležité pro udržování asymetrie cytoplazmatické membrány. Složení jejího vnějšího a vnitřního listu se totiž významně liší. Vnější list cytoplazmatické membrány savčích buněk je poměrně bohatý na glykolipidy, sfingomyelin a fosfatidylcholin, které se ve vnitřním listu membrány vyskytují jen v malém množství. Pro cytoplazmatickou část membrány

je naopak typický fosfatidylethanolamin a záporně nabitý fosfatidylserin. Asymetrie membrány je aktivně vytvářena a udržována specifickými proteinovými přenašeči.

Membránové proteiny

Kromě lipidů jsou druhou hlavní složkou buněčných membrán proteiny. V cytoplazmatické membráně plní spoustu nepostradatelných funkcí. Tvoří například selektivní membránové kanály a přenašeče důležité pro aktivní či pasivní přenos specifických molekul a iontů, zprostředkují mezibuněčnou adhezi a velice důležitou roli hrají též v přenosu informace přes cytoplazmatickou membránu, tedy v membránové signalizaci.

Nejčastěji jde o *transmembránové proteiny*, jejichž molekuly procházející napříč cytoplazmatickou membránou, v níž jsou ukotveny pomocí sekvence asi 20 hydrofobních aminokyselin. O jejich velké důležitosti svědčí to, že až dvacet procent všech genů kóduje právě tento typ proteinů.

Některé membránové proteiny však transmembránovou oblast nemají a s vnitřním nebo vnějším listem membrány jsou spojeny jinak – pomocí lipidové „kotvy“. Tuto funkci mohou zastávat např. kovalentně připojené zbytky kyseliny *palmitové* či *myristové*. Je zajímavé, že takové chemické modifikace (hlavně palmitylace) jsou nezbytné i pro stabilní spojení některých transmembránových proteinů s plazmatickou membránou. Ve vnějším listu membrány mohou být proteiny ukotveny prostřednictvím složitěho glykolipidu *glykosylfosfatidylinositolu* (GPI) kovalentně připojeného k jejich koncové aminokyselině (Vesmír 74, 625, 1995/11).

Membránové mikrodomény – rafty

Struktura cytoplazmatické membrány jako polotekutě lipidové dvojvrstvy byla poprvé navržena S. J. Singerem s G. L. Nicholsem před 40 lety. Podle jejich modelu „tekuté mozaiky“ se lipidy a proteiny mohou v plo-

RAFTŮM PODOBNÉ MIKRODOMÉNY

Z mnoha publikací posledních let je zřejmé, že existuje i několik dalších typů raftům podobných mikrodomén. Všechny mají některé rysy společné s „klasickými“ rafty (charakteristické lipidové složení a relativní rezistence k rozpuštění detergenty), avšak jinými vlastnostmi se od nich odlišují. Významným typem jsou tzv. tetraspanové mikrodomény, jejichž základní složkou je rodina proteinů procházejících „hadovitě“ čtyřikrát membránou a sloužících jako jakési „molekulární lepidlo“ stabilizující povrchové komplexy adhezivních proteinů, které regulují mobilitu buněk a jejich interakce s jinými buňkami. Kromě toho tetraspanové mikrodomény regulují aktivitu a transport některých proteinů uplatňujících se v buněčné signalizaci a dalších klíčových procesech. Tyto útvary mají i zásadní význam pro metastatické chování některých nádorových buněk a slouží jako vstupní brány pro některé vi-ry a mikroorganismy. Nedávno byl v naší laboratoři objeven další typ raftům podobných mikrodomén, které jsme nazvali „těžké rafty“. Jejich biologické role jsou zatím v podstatě neznámé, ale dá se předpokládat, že vzhledem k přítomnosti řady důležitých buněčných receptorů a signalizačních proteinů budou významné.

S lipidovými mikrodoménami jsou příbuzné tzv. kaveoly, 50–100 nm velké prohlubeniny plazmatické membrány dobře pozorovatelné v elektronovém mikroskopu. Tyto útvary stabilizuje protein kaveolin, který je zakotven ve vnitřním listu membrány bohatém na cholesterol a tvoří jakýsi plášť kaveol. Kaveoly mají podobné lipidové a proteinové složení jako lipidové rafty, které lze považovat za jakési ploché a relativně nestabilní kaveoly. Kaveoly se účastní transcytózy, tj. přenosu membránových váčků z jedné strany epitelálních buněk na druhou, a potocytózy – internalizace důležitých molekul po jejich navázání na receptory v kaveolách.

Prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc., (*1949) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., který od roku 2005 řídí, se zabývá povrchovými molekulami buněk imunitního systému. Přednáší imunologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D., (*1973) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., se věnuje výzkumu signalizačních mechanismů buněk imunitního systému. Přednáší na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

še membrány volně pohybovat – membrána je jakousi dvourozměrnou kapalinou. Později se však stále více ukazovalo, že takovýto pohled na cytoplazmatickou membránu (i ostatní buněčné membrány) je příliš zjednodušený a že ve skutečnosti membrána obsahuje oblasti (mikrodomény), které se svým složením a vlastnostmi navzájem výrazně liší. Mikrodomény se mohou spontánně tvořit jako dynamické útvary v důsledku vzájemných interakcí mezi membránovými lipidy a proteiny. Jejich existence a vlastnosti závisí na lipidovém i proteinovém složení dané membrány, na teplotě a na interakcích s dalšími molekulami vně i uvnitř buňky.

Dosud nejvíce byly studovány mikrodomény zvané „lipidové rafty“, které obsahují především lipidy a glykolipidy s dlouhými nasycenými mastnými kyselinami (např. kyselina palmitová) a cholesterol (obr. 1). Z experimentů s umělými modelovými membránami definovaného složení je známo, že některé lipidy a jejich směsi mají tendenci ke spontánní tvorbě tzv. „uspořádané kapalně fáze“. V ní jsou mastné kyseliny paralelně poskládány a uspořádány těsněji než v ostatních částech membrány. Některé vlastnosti těchto modelových lipidových mikrodomén jsou velmi podobné lipidovým raftům biologických membrán a zdá se, že i u nich je spontánní tvorba uspořádané kapalně fáze hlavním faktorem jejich vzniku. Lipidové rafty (na rozdíl od plně tekutých částí membrány) díky svému složení vzdorují rozpuštění pomocí některých neiontových detergentů. Lze je proto z buněčných lyzátů připravených pomocí takovýchto detergentů jednoduše izolovat centrifugačními nebo jinými jednoduchými fyzikálními metodami – jsou totiž poměrně velké a mají malou specifickou hustotu.¹

Raftové mikrodomény se formují během biosyntézy v Golgiho komplexu, odkud jsou pak dopravovány na plazmatickou membránu. Připisuje se jim řada důležitých funkcí v buněčné signalizaci (obr. 2). Uplatňují se však i při třídění proteinů a lipidů pro transport do různých oblastí plazmatické membrány (u plochých epiteliálních buněk je jejich „horní“ strana tvořena převážně rafty, zatímco „dolní“ strana rafty a pro ně typické proteiny neobsahuje). Raftové mikrodomény hrají důležitou roli také v procesech endocytózy a exocytózy. Často jsou též využívány různými patogeny (např. virem HIV) jako

1) Raftové mikrodomény postrádají většinu membránových proteinů, avšak jsou v nich koncentrovány výše zmíněné proteiny zakotvené pomocí glykolipidu GPI, acylované (palmitoylované a myristoylované) intracelulární proteiny tyrosinkinasy rodiny Src, některé G-proteiny (velmi důležité vnitrobuněčné signální proteiny váží buď guanosintrijsófat (GTP), nebo guanosindifófat (GDP) zakotvené opět pomocí kovalentně připojených lipidových „ocásků“), některé tzv. transmembránové adaptorové proteiny, kolem kterých se organizují komplexy signálních proteinů, ale také např. hlavní povrchový glykoprotein (hemaglutinin) chřipkového viru.

2) Používal se např. Triton X-100 nebo NP-40 při teplotě blízké 0 °C. Poté byly rafty izolovány zpravidla jednoduchou ultracentrifugací v hustotním gradientu. Další velmi hojně používanou biochemickou metodou sloužící jako test závislosti určitého děje na lipidových mikrodoménách bývá extrakce membránového cholesterolu pomocí methyl-b-cyklohextrinu. Tato metoda byla ovšem kritizována proto, že cholesterol je přítomen (i když v menším množství) i v neraftových částech membrán a jeho odstraňování může mít tedy vliv i na mnoho jiných membránových funkcí.

HISTORICKÁ POZNÁMKA

Vzhledem k tomu, že článek je součástí série věnované 50. výročí založení Ústavu molekulární genetiky, mělo by se něco říci i o historii problematiky v tomto ústavu. Skupina vedená nejprve Ivanem Hilgerem a posléze mnou se danou tematikou začala zabývat v druhé polovině osmdesátých let. Byla to doba, kdy byly teprve objevovány povrchové molekuly buněk imunitního systému. Jako jeden ze základních nástrojů přitom sloužily tzv. monoklonální protilátky, jejichž přípravu tzv. hybridomovou technologií jsme tenkrát zvládli. Několik z námi objevených povrchových proteinů totiž patřilo mezi ony „nekonvenční“ membránové GPI-proteiny asociované s membránou pomocí glykolipidové „kotvy“. Byli jsme mezi prvními na světě, kterým se podařilo ukázat, že jsou součástí membránových útvarů později nazvaných rafty a že tyto útvary obsahují důležité signální molekuly. Podobnou problematikou se v ÚMG velmi úspěšně zabývala také skupina Petra Drábera. Později tyto dvě výzkumné skupiny v raftových mikrodoménách objevily několik nových a funkčně důležitých signálních proteinů (hlavně adaptorových proteinů částečně podobných proteinu LAT diskutovanému v tomto článku). Výsledky publikované v prestižních mezinárodních časopisech měly značný odborný ohlas – např. naše práce vzniklá ve spolupráci s vídeňskou skupinou Hannese Stockingera (Štefanová a spol., Science, 1991) byla citována téměř 800krát, což z ní činí skutečně „citační klasiku“.

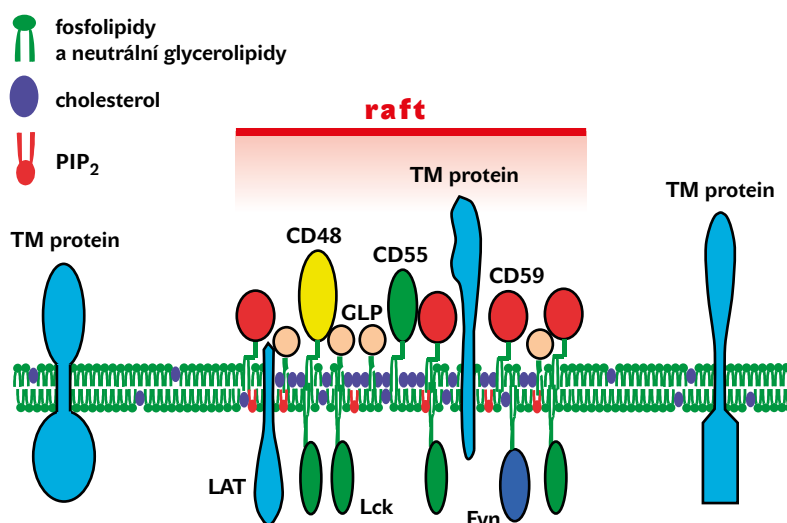
vstupní brány pro průnik do buňky či naopak k opuštění buňky.

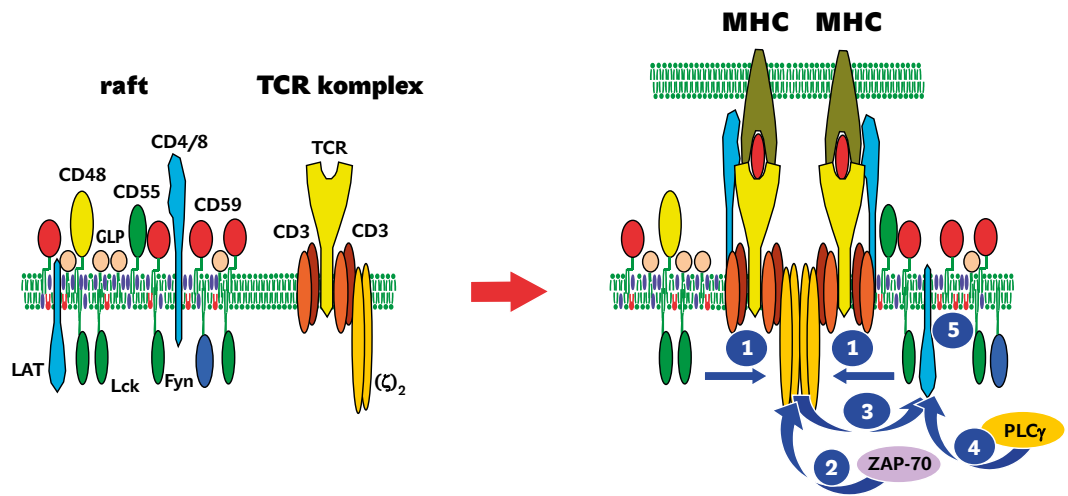
Raftové kontroverze

O tom, jak raftové mikrodomény v buněčných membránách skutečně vypadají, se vedou spory. Základní potíží spočívá v tom, že tyto mikrodomény jsou příliš malé pro přímé mikroskopické pozorování. Byly proto zpočátku charakterizovány pouze biochemicky, jako části membrány nerozpuštěné v roztocích některých detergentů.²

Struktury získané po rozpuštění membrán však nemusí pravdivě odrážet situaci *in vivo*, neboť působení detergentů v kombinaci s nízkou teplotou může zásadně pozměnit to, co v membráně existovalo za fyziologických podmínek (např. spojit mnoho miniaturních mikrodomén do větších celků, přidat či se-

1. Raftové mikrodomény. Většina transmembránových proteinů (TM protein vlevo a vpravo) se nachází v neraftové části membrány. Raftová mikrodoména (ostrůvek uprostřed) je obohacena o cholesterol, signální lipid fosfatidylinositolbisfosfát (PIP₂), některé glykolipidy (GLP), GPI-proteiny (CD48, CD55, CD59) a vnitrobuněčné signální proteiny zakotvené v raftové membráně pomocí kovalentně navázaných lipidů (Lck, Fyn). Raftové mikrodomény obsahují také některé specifické transmembránové proteiny (obvykle modifikované připojením kyseliny palmitové), jako transmembránový adaptor LAT či koreceptory CD4 a CD8.





2. Role raftových mikrodomén v zahájení signalizace receptorem lymfocytů T pro antigen (TCR). Vlevo je znázorněna klidová situace – raftová mikrodoména je prostorově oddělena od TCR komplexu (skládá se z vlastního receptoru a asociovaných signalizačních řetězců – CD3, zeta). Po rozeznání antigenního fragmentu navázaného na „prezentační“ MHC protein na povrchu jiné buňky (např. infikované) dojde ke shluknutí několika TCR a raftových mikrodomén. Tím se dostanou do těsné blízkosti enzymy proteinkinázy přítomné v raftech (Lck, Fyn) a jejich substráty (signalizační řetězce komplexu TCR), které tak mohou být fosforylovány (krok 1). Na fosforylované řetězce zeta se naváže a aktivuje další kináza ZAP-70 (krok 2), která pak fosforyluje raftový adaptorový protein LAT (krok 3). Na fosforylovaný LAT se váže několik proteinů, včetně enzymu fosfolipázy C-gamma (krok 4), který pak štěpí raftový fosfolipid PIP_2 (krok 5). Produkty tohoto štěpení potom fungují jako „molekulární poslové“ zahajující vnitrobuněčné signalizační děje vedoucí (podle „kontextu“) např. k dělení takto stimulovaného lymfocytu, nebo ke spuštění jeho výkonných funkcí (např. zabít infikované buňky).

lektivně ubrat některé proteinové molekuly). Je proto důležité, že membránové mikrodomény byly prokázány pomocí biofyzikálních technik také na povrchu živých buněk a v některých případech je lze biochemicky izolovat i bez použití detergentů. Podařilo se najít velmi šetrné detergenty, v jejichž přítomnosti se zachovávají raftové mikrodomény i při rozpuštění za fyziologické teploty.

Značné výhody provázely pokusy o mikroskopickou detekci lipidových raftů. Zpočátku se k mikroskopické vizualizaci raftových mikrodomén používaly fluorescenčně označené protilátky rozpoznávající typické raftové proteiny – rafty se jeví jako malé dobře pozorovatelné „tečky“, popřípadě postupně splývající do větších skvrn. Ukázalo se ale, že tyto „tečky“ jsou artefakty vzniklé shluknutím molekul působením vícevázných protilátek. Tento problém částečně vyřešila nová fluorescenční barviva, která se po přidání k buňkám víceméně selektivně zabudovávají do raftových mikrodomén (charakterizovaných vyšší uspořádaností jejich lipidů a vyšším obsahem cholesterolu), zatímco jiná taková barviva mají naopak vyšší afinitu k neraftovým částem membrán.

Díky studiím využívajícím těchto barviv a nových biofyzikálních a optických metod převládá nyní názor, že raftové mikrodomény (a jim podobné ostatní typy mikrodomén) jsou za fyziologických podmínek většinou velmi malé (15–50 nm), velmi dynamické (rychle vznikají a rozpadají se) a mohou se snadno spojovat a stabilizovat do větších celků při přenosu signálu pomocí některých re-

ceptorů, interakcemi se složkami cytoskeletu, změnou teploty, navázáním protilátek apod. Nativní „elementární rafty“ tedy zřejmě obsahují jen několik desítek až stovek lipidových molekul a pouze jednu či několik málo proteinových molekul.

Biologický a praktický význam membránových mikrodomén

Existence membránových mikrodomén spolu s možnostmi jejich dynamického spojování jak mezi sebou, tak s ostatními složkami membrány poskytuje význačné možnosti pro regulaci buněčných dějů. Může to být jednoduchý a účinný mechanismus jak podpořit specifické interakce mezi určitými proteiny, nebo naopak potlačit interakce nežádoucí. Další eventualitou je vznik větších organizovaných mikrodomén, např. kolem aktivovaného receptoru. Protein pobývající za normálních okolností v méně organizované části membrány se může přemístit do raftové mikrodomény prostřednictvím interakce s jiným proteinem, residentem mikrodomén, nebo zvýšením afinity k uspořádanější fázi membrány (např. shluknutím receptorů, připojením kyseliny palmitové nebo konformační změnou).

Již první experimenty, které vedly k objevu raftových mikrodomén, se zabývaly jejich schopností přenášet signál. Na počátku byl poněkud záhadný jev – vazba protilátek na proteiny ukotvené v plazmatické membráně pomocí glykolipidové struktury (GPI-proteiny) či na některé glykolipidy vedla např. v buňkách imunitního systému k silné aktivní odpovědi srovnatelné s přirozenou odpovědí vyvolanou stimulací imunoreceptorů. Přitom GPI-proteiny a glykolipidy jsou ukotvené jen ve vnějším listu membrány a nijak nezasahují do cytosolu. Zdánlivě tak nemají možnost ovlivňovat intracelulární proteiny přenášející signály nezbytné pro takovouto odpověď. Tento fenomén se podařilo vysvětlit právě existencí lipidových mikrodomén obohacených jak o GPI-proteiny a glykolipidy, tak o kritické vnitrobuněčné signalizační proteiny (některé proteinkinázy – enzymy fosforylující jiné proteiny a zahajující signalizační děje). Prokřížením a následným shluknutím celých mikrodomén pomocí protilátek dojde k nahlučení těchto enzymů a jejich

proteinových substrátů na cytosolické straně membrány, což zahajuje kaskády navazujících signalizačních dějů, které kulminují např. buněčným dělením nebo sekrecí proteinů regulujících imunitní odpovědi.

Biologický význam raftových (a dalších jim podobných) mikrodomén (receptorová signalizace, organizace komplexů adhezivních molekul, vytváření optimálního prostředí pro funkci některých enzymů, brány vstupu patogenů) byl prokázán v mnoha typech buněk (imunitní systém, neurony, výstelka cév, slizniční buňky, mnoho typů nádorových buněk). Raftové mikrodomény mohou být tedy nadějným „místem zásahu“ v případech, kdy je potřeba např. potlačit nežádoucí aktivity v nich sídlících receptorových molekul. Zdá se, že účinky některých imunopresivních látek lze alespoň zčásti vysvětlit tím, že narušují integritu raftů. Existují i první příklady potenciálních terapeutických inhibitorů specificky cílených do raftových mikrodomén, které účinně potlačují nežádoucí aktivitu enzymů zodpovědných za vznik neurodegenerativních chorob. Také fakt, že mnohé patogeny využívají raftové mikrodomény, má potenciální praktické důsledky.

Problematika membránových mikrodomén má tedy všechny aspekty důležitého biomedicínského výzkumu – kromě zajímavého biologického a biochemického problému základního výzkumu se rýsují i praktické aplikace. Není tedy divu, že v odborné literatuře existuje již několik tisíc publikací z tohoto oboru a že každý týden přibývá řada dalších.



V rámci uplatňování Národního lesnického programu pro období do roku 2013 byly během roku 2012 Koordinační radou projednány všechny klíčové akce (KA). Jelikož v Koordinační radě jsou proporcčně zastoupeni zástupci jak lesního hospodářství, tak z oblasti životního prostředí, velké diskuse vyvolaly zejména poměrně rozsáhlé KA7 a KA9.

ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ a české lesy

KA7 – Zachování a zlepšení biologické rozmanitosti v lesích

KA9 – Zlepšení zdravotního stavu a ochrany lesů

Obě KA se navzájem prolínají a navíc jsou provázané s dalšími, kde zájmy jedné skupiny narážejí na zájmy jiné skupiny. Příkladem „střetů“ mohou být některá podopatření výše jmenovaných klíčových akcí KA s KA1, která se týkají zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování v našich lesích, nebo KA 4, která se zabývá podporou biomasy pro energetické účely.

Úkolem expertních skupin při vypracování návrhů na řešení jednotlivých klíčových akcí bylo navrhnout vyvážené řešení. Jednostranná řešení byla při projednávání návrhů Koordinační radou buď upravena, nebo vrácena k dopracování. V některých případech odešla na ministerstva zemědělství a životního prostředí řešení ve variantách. Po úpravě jednacího řádu v červnu 2011 (doporučení začala být přijímána konsenzem, nikoli hlasováním), došla v několika případech ke konstatování, že se rada nedohodla a že zůstává původní text z platného NLP.

U všech klíčových akcí v rámci NLP bylo úkolem expertních skupin podopatření rozdělit do roviny:

- ▷ Legislativní
- ▷ Výzkumné
- ▷ Finanční
- ▷ Osvětové a poradenské

Podrobnosti o vývoji řešení, resp. závěry a doporučení ministerstvům za všechny klíčové akce najdete na www.uhul.cz/nlp ve složce Klíčové akce.

www.uhul.cz Informace o lesích

INZERCE

NOVINKY V ŘADĚ ZIP



William J. Cook
Po stopách obchodního cestujícího
Matematika na hranicích možností
256 stran, 120 ilustrací, 399 Kč

Douglas R. Hofstadter
Gödel, Escher, Bach
Existenciální gordická balada.
Metaforická fuga o mysli a strojích v duchu Lewise Carrolle
832 stran, 152 ilustrací, 998 Kč

Alex Ross
Zbývá jen hluk
Naslouchání dvacátému století
580 stran, 698 Kč

Keith Ball
Podivuhodné křivky, počítání králíků
a jiná matematická dobrodružství
232 stran, 349 Kč