

KATARZYNA KWIATKOWSKA i ANDRZEJ SOBOTA

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

email: k.kwiatkowska@nencki.gov.pl

MIKRODOMENY BŁONY KOMÓRKOWEJ MIEJSCEM ZAPOCZĄTKOWANIA SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH PRZEZ IMMUNORECEPTORY

Mozaikowy model budowy błony komórkowej, zaproponowany 30 lat temu przez SINGERA i NICOLSONA (1972) zakładał, że białka błonowe są zanurzone i przemieszczają się swobodnie w dwuwarstwie lipidowej, stanowiącej dla białek środowisko neutralne. Obecnie wiadomo, że ani topografia białek w płaszczyźnie błony ani ich ruchy nie są tak dowolne jak wynikałoby z tego modelu. Obok białek, które swobodnie dyfundują w płaszczyźnie błony są i takie, których ruch kontrolowany jest przez białka cytoszkieletu podbłonowego. Cytoszkielet może stabilizować w błonie białka – „bariery”, które ograniczają ruchy innych białek błonowych lub też odwrotnie, ruch niektórych białek błony może być ułatwiony i ukierunkowany przy udziale białek motorycznych zasocjowanych z cytoszkieletem (JOBSON i współaut. 1995). Zmieniło się także nasze spojrzenie na lipidy błonowe; ich rozkład w płaszczyźnie błony komórkowej nie jest homogeny. Lipidy organizują się przejściowo w mikroskupienia, nazywane mikrodomenami, które wykazują szczególne właściwości fizyko-chemiczne, a przez to wpływają na funkcjonowanie wybranych białek błonowych, które z nimi asocjują.

Szczególnie duże zainteresowanie skupiają ostatnio mikrodomeny formujące się dzięki od-

działaniom pomiędzy sfingolipidami i cholesterolem błony komórkowej. W literaturze mikroskupienia tego typu nazywa się z angielskiego rafts, czyli tratwy. Pokrewne mikrodomenom są kaweole, stabilne wpuklenia błony komórkowej, których rdzeń lipidowy również stanowią sfingolipidy i cholesterol. Struktury te wyróżniają się jednak obecnością kaweoliny, palmitylowanego białka integralnego błony, wiążącego cholesterol. Kaweole występują obficie (obok mikrodomen) w fibroblastach, komórkach nabłonka i śródbłonka oraz w mięśniówce gładkiej naczyń. Z drugiej strony, są komórki takie jak leukocyty oraz neurony, w których ekspresja kaweoliny jest minimalna, a kaweole nie formują się. Problematyka funkcji kaweoli jest obszerna, a niektóre jej aspekty kontrowersyjne. Zagadnienia te są tematem kilku wyczerpujących prac przeglądowych (ANDERSON 1998, SIMONS i TOOMRE 2000, ZAJCHOWSKI i ROBBINS 2002) i wykraczają poza ramy niniejszego opracowania. W pracy tej omówiono strukturę sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen błony komórkowej, a także ich rolę w generacji szlaków sygnałowych przez immunoreceptory leukocytów, które inicjują szeroką gamę reakcji odpornościowych człowieka.

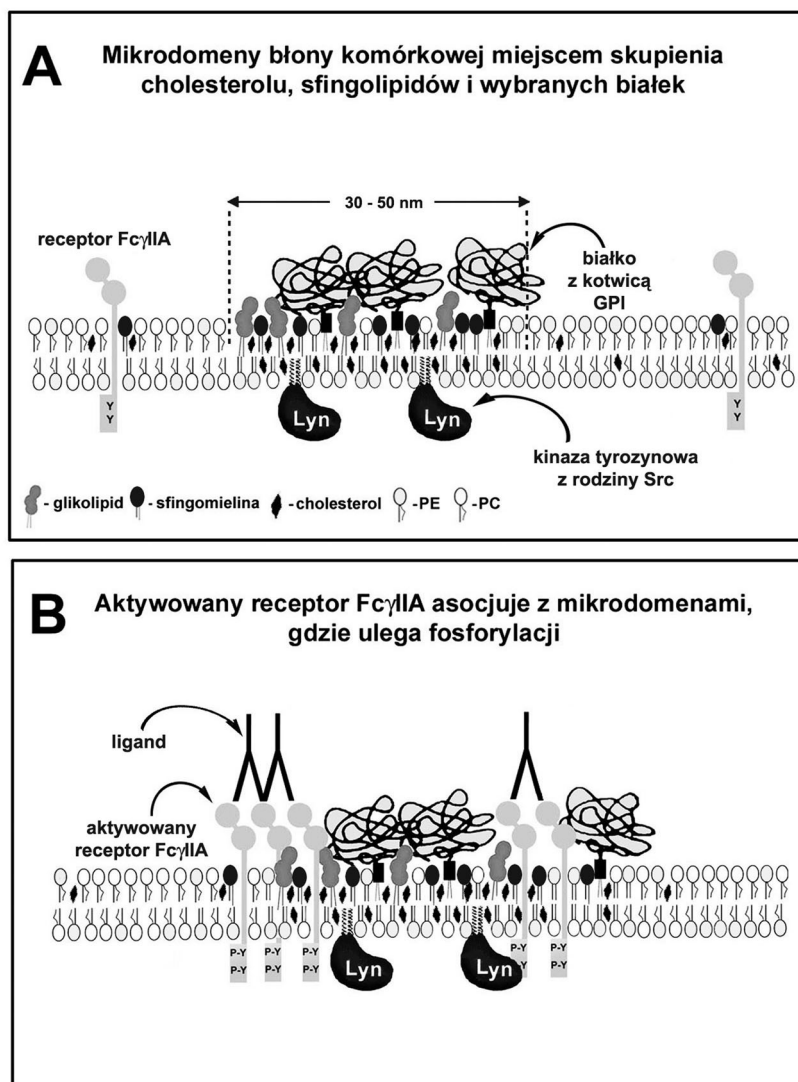
MIKRODOMENY BŁONY KOMÓRKOWEJ BOGATE W SFINGOLIPIDY I CHOLESTREOL

Sfigolipidy, czyli sfingomielina i glikolipidy błony komórkowej, występują prawie wyłącznie w jej zewnętrznej warstwie. Lipidy te wykazują tendencję do samoagregacji w błonie z uwagi na interakcje ich polarnych główek oraz wiązania wodorowe powstające pomiędzy grupami hydroksylowymi i karbonylowymi, zlokalizowanymi w przypowierzchniowym fragmencie sfingolipidów. Łańcuchy nasyconych kwasów tłuszczowych, które prze-ważają w sfingolipidach, umożliwiają im z kolei ciasne upakowanie w płaszczyźnie błony. Pozostałe wolne przestrzenie pomiędzy łańcuchami kwasów tłuszczowych sfingolipidów wypełnia cholesterol, który sprawia jednocześnie, że mieszanina sfingolipidowo-cholesterolowa przechodzi w tzw. fazę cieczy uporządkowanej, gwarantującej stosunkowo wysoką ruchliwość lipidom sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen, co ma istotne znaczenie dla ich funkcjonowania w błonie. Dzięki tym specyficznym właściwościom, mikrorejony błony komórkowej bogate w cholesterol i sfingolipidy, wyodrębniają się z otoczenia bardziej płynnych obszarów błony, zawierających głównie glicerofosfolipidy, acylowane zarówno resztami nienasyconych, jak i nasyconych kwasów tłuszczowych (BROWN i LONDON 1997, BROWN 1998).

Analiza składu lipidowego mikrodomen komórek nabłonkowych i tucznych przeprowadzona metodą spektrometrii masowej wykazała, że lokalny poziom sfingomieliny jest wyższy o ok. 30%, a poziom cholesterolu przewyższa co najmniej dwukrotnie średnią zawartość tych lipidów w całej błonie komórkowej. Ponadto, niektóre glikolipidy zidentyfikowano wyłącznie we frakcji mikrodomen. Zarówno sfingomielina jak i glicerofosfolipidy tej frakcji wyróżniają się wyższym stopniem nasycenia reszt kwasów tłuszczowych niż przeciętna wartość nasycenia tych reszt we wszystkich lipidach komórki (FRIDRIKSSON i współaut. 1999, PIKE i współaut. 2002). Specyficzne środowisko lipidowe mikrodomen stwarza warunki sprzyjające akumulacji wybranych białek (Ryc. 1A). Należą do nich białka połączone z jednostką glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI) i skupione w zewnętrznej warstwie mikrodomen oraz kinazy tyrozynowe z rodziny Src, zakotwiczone w warstwie cytoplazmatycznej mikrodomen. Zakotwiczenie to zachodzi poprzez reszty nasyconych kwasów palmitynowego i

mirystynowego, którymi kinazy Src są acylowane przy końcu N (SHENOY-SCARIA i współaut. 1993, KABOURIDIS i współaut. 1997, VAN'T HOF i RESH 1997). O lokalnej akumulacji wspomnianych białek decyduje dopasowanie struktury nasyconych kwasów tłuszczowych, połączonych z kinazami rodziny Src, oraz kotwicy GPI białek powierzchniowych do uporządkowanej struktury lipidów mikrodomen. Odrębną grupę białek stanowią niektóre receptory błonowe, takie jak immunoreceptory, które asocjują z mikrodomenami przejściowo, po aktywacji. Zainteresowanie mikrodomenami podyktowane jest, obok ich udziału w generacji szlaków sygnałowych przez wspomniane receptory, także potencjalnie patofizjologiczną rolą mikrodomen. Z powodu specyficznego składu białkowo-lipidowego mikrodomeny są miejscem genezy chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera i Creutzfeldta-Jakoba, oraz stanowią wrota zakażeń bakteryjnych i wirusowych, na przykład HIV-1 (SIMONS i EHEHALT 2002).

Wspomniany skład białkowo-lipidowy mikrodomen bada się głównie metodami biochemicznymi, po ich izolacji z lizatów komórek. W tym celu komórki poddaje się lizie w obecności detergentów niejonowych, głównie Trytonu X-100. Gęste upakowanie lipidów w mikrodomenach utrudnia interkalację detergentu w ich obrębie sprawiając, że mikrodomeny, ale nie ich glicerofosfolipidowe otoczenie, pozostają w detergencie nierozpuszczone. Otrzymane lizaty komórek poddaje się wirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy lub OptiPrepu. Z uwagi na wysoką zawartość lipidów, kompleksy białkowo-lipidowe, jakimi są mikrodomeny, cechują się niską gęstością właściwą, ok. 1,05 g/ml, i mogą zostać oddzielone od reszty białek komórki, plasując się w górze gradientu. Otrzymana frakcja błonowa, zawierająca między innymi białka z kotwicą GPI i kinazy z rodziny Src, jest często określana skrótem DRM (ang. detergent resistant membranes). Większość białek komórkowych jest obecna w dolnych frakcjach gradientu o wysokiej gęstości właściwej, ok. 1,3 g/ml (BROWN i ROSE 1992, AHMED i współaut. 1997). Kolejną cechą mikrodomen, wykorzystywaną w badaniach biochemicznych, a także funkcjonalnych, jest ich wrażliwość na zmiany poziomu cholesterolu w błonie komórkowej. Wrażliwość ta wynika z faktu wzbogacenia cholesterolu w obrębie mi-



Ryc. 1. Schemat organizacji mikrodomen błony komórkowej bogatych w sfingolipidy i cholesterol w komórkach spoczynkowych (A) i po aktywacji receptora FcγIIA (B).

krodomen i jego istotnej roli strukturalnej w formowaniu mikrodomen. W układach doświadczalnych poziom komórkowego cholesterolu obniża się hamując jego syntezę lub, alternatywnie, cholesterol usuwa się przyżyciowo z komórek stosując β -cyklodekstrynę i jej pochodne. Związki te są cyklicznymi oligosacharydami, które wiążą się do błony komórkowej i, nie naruszając jej nieprzepuszczalności, ekstrahują z niej specyficznie cholesterol (KILSDONK i współaut. 1995). Błona komórkowa zawiera ok. 90% całej puli cholesterolu komórkowego, dlatego też użycie β -cyklodekstryn pozwala efektywnie zubożyć komórki w ten sterol, prowadząc do dezintegracji sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen błony komórkowej. Zgodnie z tym stwierdzono, że po obniżeniu poziomu cholesterolu w komór-

kach o ok. 60% białka mikrodomen stają się rozpuszczalne w Trytonie X-100 i w trakcie frakcjonowania otrzymywanych lizatów przemieszczają się do frakcji gradientu o wysokiej gęstości właściwej (MONTIXI i współaut. 1998, SHEETS i współaut. 1999, KWIATKOWSKA i współaut. 2003).

Metoda izolacji frakcji DRM przez wirowanie w gradiencie gęstości, zaproponowana przez BROWN i ROSE (1992), poparta serią prac na błonach modelowych, jest stosowana powszechnie w pracach nad mikrodomenami. Jak wykazały kolejne badania, otwiera ona jednak szerokie pole dla potencjalnych błędów interpretacyjnych, wynikających chociażby z niezamierzonej rekonstrukcji błony w trakcie izolacji DRM (KORZENIOWSKI i współaut. 2003). Ponadto, frakcja DRM zawierać może, obok

s핑olipidowo-cholesterolowych mikrodomen błony komórkowej, mikrodomeny formujące się w błonach aparatu Golgiego oraz (gdy izolowane z pewnych typów komórek) kaweole, struktury błony komórkowej pokrewne mikrodomenom. Z tego też względu, kluczowe dla przyjęcia koncepcji o istnieniu mikrodomen s핑olipidowo-cholesterolowych w błonie komórkowej było ich wykrycie *in situ*. W tym celu stosowano wyrafinowane techniki mikroskopowe, takie jak śledzenie toru pojedynczej cząsteczki, najczęściej białek z kotwicą GPI (CD90, łożyskowa fosfataza alkaliczna) lub lipidów typowych dla mikrodomen (SHEETS i współaut. 1997, PRALLE i współaut. 2000). Przydatne były też techniki sieciowania chemicznego oraz rezonansowego przeniesie-

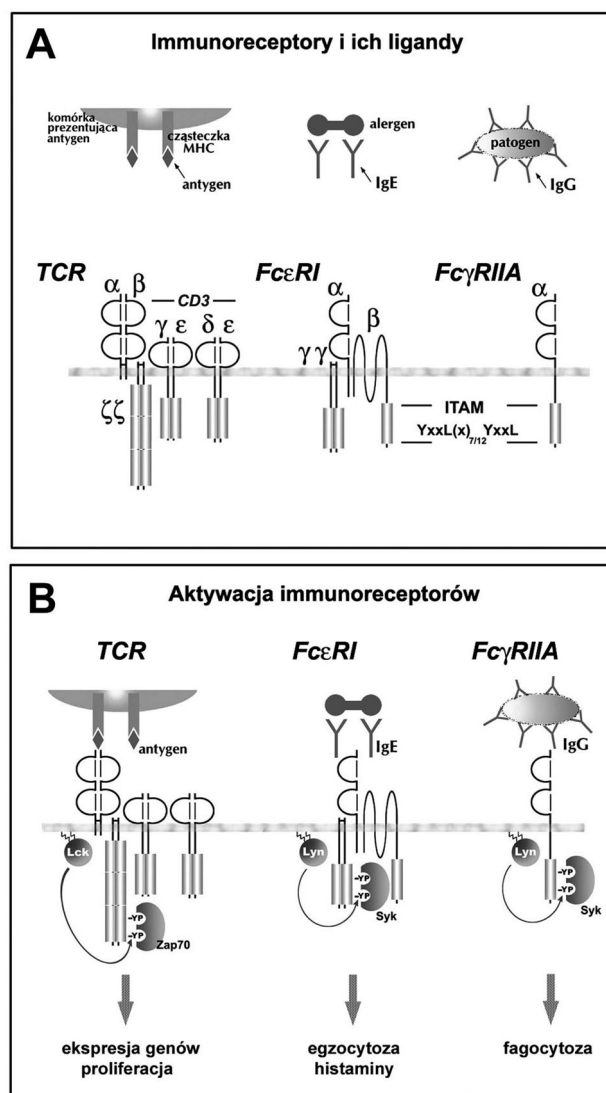
nia energii fluorescencji (FRIEDRICHSON i KURZCHALIA 1998, ZACHARIAS i współaut. 2002). W większości tego typu prac udało się potwierdzić istnienie mikrodomen w błonach żywych komórek oraz wypracować konsensus co do ich wielkości. Przyjmuje się, że są to bardzo dynamiczne struktury rzędu 30–50 nm, co pozwala przypuszczać, że skupiają one około 3500 lipidów i 30 cząsteczek białek (Ryc. 1A). Wyniki badań ostatnich pięciu lat wykazały także, że s핑olipidowo-cholesterolowe mikrodomeny błony komórkowej są miejscem akumulacji aktywowanych immunoreceptorów i służą jako platformy, w których zapoczątkowane są szlaki sygnałowe tych receptorów.

AKTYWACJA IMMUNORECEPTORÓW

Immunoreceptory to heterogenna grupa białek transbłonowych komórek hematopetycznych, obejmująca antygenowe receptory limfocytów T i B (TCR i BCR), receptory Fc, wiążące fragment Fc immunoglobulin różnych klas, i niektóre receptory komórek NK. Większość limfocytów T rozpoznaje antygeny poprzez TCR, zbudowany z dimeru łańcuchów α i β , który asocjuje z łańcuchami sygnałowymi ζ oraz kompleksem CD3 (Ryc. 2A, B). Po aktywacji TCR przez antygen, limfocyty T proliferują i, jako heterogenna grupa komórek, spełniają różnorodne funkcje – jedne z nich mogą zabijać komórki zakażone przez wirusy (limfocyty cytotoksyczne CD8⁺), inne aktywują kolejne komórki układu odpornościowego przez produkcję i sekrecję bioaktywnych limfokin (limfocyty pomocnicze CD4⁺). Wśród tych ostatnich znajdują się limfocyty pomocnicze, które warunkują przekształcenie limfocytu B, aktywowanego wcześniej przez BCR, w komórkę intensywnie wytwarzającą i uwalniającą przeciwciała. Receptor Fc ϵ I, obecny w błonie bazofili i komórek tucznych, zapoczątkowuje reakcje alergiczne. Immunoglobuliny E, powiązane z tymi komórkami za pośrednictwem podjednostki α receptora Fc ϵ I rozpoznają antygeny-alergeny, co skutkuje uruchomieniem kaskad sygnałowych przez łańcuchy sygnałowe β i γ receptora. W efekcie, dochodzi do egzocytozy histaminy i innych mediatorów reakcji zapalnej (Ryc. 2A, B). Z kolei receptory Fc γ , w tym wyjątkowy, bo monomeryczny receptor Fc γ IIA, wiążą immuno-

globuliny G umożliwiając fagocytozę, czyli internalizację i dezintegrację patogennych mikroorganizmów przez wyposażone w receptory Fc γ makrofagi i neutrofile (Ryc. 2A, B). Po wtargnięciu do naszego organizmu mikroorganizmy takie mogą być rozpoznane i opłaszczane przez przeciwciała – immunoglobuliny G. To właśnie takie „naznaczenie” obcych cząstek przez przeciwciała prowadzi do ich fagocytozy przy udziale receptorów Fc γ (GOŁĄB i współaut. 2002).

Pomimo różnorodności struktury, funkcji i ekspresji immunoreceptory mają kilka zasadniczych cech wspólnych. Pierwsza z nich to wspólna cytoplazmatyczna sekwencja sygnałowa ITAM (ang. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) charakterystyczny, kilkunastoaminokwasowy odcinek zawierający dwie konserwatywne reszty tyrozynowe. Fosforylacja tych dwóch reszt tyrozynowych jest pierwszą zidentyfikowaną reakcją enzymatyczną kaskady sygnałowej immunoreceptorów, zachodzącą po związaniu ligandów (Ryc. 2B). Fosforylację tę katalizują wspomniane już wcześniej kinazy z rodziny Src. TCR fosforylowany jest przez Lck i Fyn, za fosforylację receptorów Fc ϵ I i Fc γ IIA odpowiada kinaza Lyn (FIELD i współaut. 1995, KABOURIDIS i współaut. 1997, KWIATKOWSKA i współaut. 2003). Ufosforylowane reszty tyrozynowe sekwencji ITAM stają się miejscami zakotwiczenia kolejnych kinaz tyrozynowych z innej rodziny – kinazy Zap70 lub Syk. Kinazy te mają dwie domeny SH2, które rozpoznają specyficz-



Ryc. 2. Schemat budowy receptora antygenowego limfocytów T (TCR) i receptorów rozpoznających fragment Fc immunoglobulin E (Fc ϵ RI) i immunoglobulin G (Fc γ RIIA).

W czasie aktywacji immunoreceptorów reszty tyrozynowe ich sekwencji sygnałowej ITAM zostają ufosforylowane przez kinazy z rodziny Src i stają się miejscem wiązania kinaz tyrozynowych Syk i ZAP70. Procesy te zapoczątkowują kaskady sekwencji sygnałowych receptorów, prowadzące do odpowiedniej reakcji komórki.

nie dwie ufosforylowane reszty tyrozynowe sekwencji ITAM immunoreceptorów. Dzięki temu kinazy Syk/Zap70 przemieszczają się z cytoplazmy i skupiają się wokół aktywowanych receptorów. Aktywność kinaz obu rodzin – Src i Syk – uruchamia kaskadę fosforylacji kolejnych białek sygnałowych. Wokół aktywowanych immunoreceptorów formuje się lokalny kompleks białek adaptorowych i enzymów, które generują i amplifikują szlaki sygnałowe wywołujące ostatecznie wspomniane już reakcje komórek odpornościowych (Ryc. 2B).

Immunoreceptory mają jeszcze jedną wspólną cechę: ich ligandy, wiążąc się, wywołują agregację immunoreceptorów w

płaszczyźnie błony komórkowej. Dzieje się tak dlatego, że ligandy immunoreceptorów są wielowartościowe, to znaczy występują w formie kompleksów zdolnych do wiązania się z wieloma receptorami jednocześnie. Jest to, na przykład, kilkaset cząsteczek antygenu prezentowanych receptorom limfocytów T w postaci kompleksów peptyd-cząsteczka MHC przez inne komórki. Wielowartościowe są też antygeny-alergeny oraz cząstki, na przykład bakterie, opłaskzczone przez przeciwciała. Doświadczalnie wykazano, że to właśnie agregacja immunoreceptorów jest procesem, który warunkuje fosforylację ich sekwencji sygnałowej ITAM, uruchamiając tym samym kaskady sy-

gnałowe właściwe tym receptorom. W układach modelowych agregację receptorów wywołuje się poprzez przyżyciową inkubację komórek z przeciwciałami, które specyficznie rozpoznają receptor. Z uwagi na fakt, że każde przeciwciało ma dwa miejsca rozpoznające antygen, związanie przeciwciał mostkuje sąsiadujące receptory. W efekcie, związanie przeciwciał wywołuje wyraźną agregację receptorów, które formują skupienia w płaszczyźnie błony. Równoległe badania biochemiczne wykazały, że taka indukowana agregacja receptorów w błonie prowadzi do fosforylacji reszt tyrozynowych ich sekwencji sygnałowej, a także uruchamia kaskadę fosforylacji białek towa-

rzyszających, czyli aktywuje receptory. Dzięki podwójnemu znakowaniu komórek stwierdzono, że ufosforylowane białka gromadzą się pod błoną komórkową wokół agregatów receptorów. Agregacja immunoreceptorów, analogiczna do tej wymuszonej przez wiązanie swoistych przeciwciał, zachodzi w miejscu wiązania ich fizjologicznych ligandów. Indukowana jest wtedy fosforylacja sekwencji sygnałowej receptorów, po której następuje uruchomienie właściwych szlaków sygnałowych (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1999).

UDZIAŁ MIKRODOMEN W AKTYWACJI IMMUNORECEPTORÓW

Biorąc pod uwagę następujące fakty: (i) aktywacja immunoreceptorów zaczyna się od ich agregacji w płaszczyźnie błony komórkowej, (ii) pierwszym etapem generacji sygnałów jest fosforylacja konserwatywnych reszt tyrozynowych sekwencji sygnałowej receptorów przez kinazy z rodziny Src, (iii) kinazy te są kompartmentalizowane w sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomenach błony komórkowej, postawiono tezę, że właśnie mikrodomeny błony komórkowej są miejscem agregacji aktywowanych receptorów. W komórkach niestymulowanych immunoreceptory zlokalizowane są poza obszarem mikrodomen, w otoczeniu glicerofosfolipidowym błony komórkowej. Wiązanie ligandów wymusza agregację receptorów i translokację do obszaru mikrodomen. W obrębie mikrodomen immunoreceptory znajdują się w sąsiedztwie kinaz z rodziny Src, które fosforylują reszty tyrozynowe sekwencji sygnałowej receptorów, uruchamiając kaskady sygnałowe typowe dla danego immunoreceptora w danej komórce (Ryc. 1B).

Tezę o asocjacji aktywowanych immunoreceptorów z mikrodomenami potwierdzają wyniki licznych badań biochemicznych i mikroskopowych. Przykładem tych pierwszych są wyniki frakcjonowania detergentowych lizatów komórek układu odpornościowego w gradiencie gęstości, które wykazały, że mikrodomeny błony są miejscem fosforylacji aktywowanego receptora FcεI, FcγIIA, TCR i BCR. O ile w komórkach spoczynkowych immunoreceptory są białkami ekstrahowanymi z błony w detergentach niejonowych i izolowane są we frakcjach gradientu o dużej gęstości właściwej,

to po aktywacji przemieszczają się do frakcji błony nierozpuszczalnej w detergencie, umiejscawiając się w górnych frakcjach gradientu, wraz z białkami z kotwicą GPI, i kinazami z rodziny Src. Ta zmiana gęstości właściwej aktywowanych immunoreceptorów interpretowana jest jako wynik asocjacji aktywowanych receptorów ze sfingolipidowo-cholesterolowymi mikrodomenami błony komórkowej. Aktywowane immunoreceptory, izolowane we frakcjach mikrodomen gradientu, były ufosforylowane. Kinazy Lyn, Lck i Fyn zidentyfikowano jako składniki kompleksu sygnałowego receptorów FcεRI, FcγIIA i TCR, który izolowano przez immunoprecypitację receptorów ze wspomnianych frakcji gradientu. Kinazy te były aktywne katalitycznie, odpowiadając przypuszczalnie za fosforylację receptorów (FIELD i współaut. 1995, 1997; MONTIXI i współaut. 1998; XAVIER i współaut. 1998; KWIATKOWSKA i SOBOTA 2001). Analizując skład białkowy frakcji gradientu stwierdzono, że w czasie aktywacji immunoreceptorów także inne liczne białka kompleksu sygnałowego tych receptorów, takie jak fosfolipaza Cγ, Grb2, kinaza 3-fosfatydylinozytolu, Vav, stają się nierozpuszczalne w detergentach, co wskazuje, że i one asocjują wtedy przejściowo z mikrodomenami (XAVIER i współaut. 1998, HARDER i KUHN 2000).

Jak wspomniano powyżej, przyżyciowe obniżenie poziomu cholesterolu w błonie żywych komórek prowadzi do dezintegracji mikrodomen. W tych warunkach także aktywowane immunoreceptory są podatne na solubilizację detergentem i izolowane są we frakcjach

gradientu o dużej gęstości właściwej, a ich fosforylacja jest zahamowana. Efekty te są znoszone przez przyzyciową reinkorporację cholesterolu do błony komórek i rekonstrukcję mikrodomen (MONTIXI i współaut. 1998, SHEETS i współaut. 1999, KWIATKOWSKA i współaut. 2003). Fosforylacja immunoreceptorów hamowana jest też po wzbogaceniu błony komórkowej w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz po zaburzeniu acylacji białek, w tym kinaz Src. Z uwagi na fakty, że mirystylacja i palmitylacja tych kinaz warunkuje ich kompartmentalizację w obrębie mikrodomen, zaburzenie ich acylacji prowadzi do zubożenia mikrodomen w kinazy Src, co skorelowane jest z zahamowaniem fosforylacji immunoreceptorów (STULNIG i współaut. 1998, KWIATKOWSKA i współaut. 2003). Ścisła korelacja pomiędzy integralnością sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen błony komórkowej a fosforylacją aktywowanych immunoreceptorów potwierdza wniosek, że mikrodomeny są miejscem fosforylacji immunoreceptorów, a tym samym są miejscem zapoczątkowania ich kaskad sygnałowych.

Zasadniczą zaletą tezy o kompartmentalizacji aktywowanych immunoreceptorów w obrębie mikrodomen błony komórkowej jest fakt, że tłumaczy ona szybkość i lokalny charakter generowanych sygnałów wewnątrzkomórkowych. Asocjacja receptora z mikrodomenami sprawia, że białko to znajduje się w nowym mikrośrodowisku, gdzie stan jego ufosforylowania może być łatwo modyfikowany przez skupione tam kinazy z rodziny Src. W obrębie mikrodomen limfocytów T zidentyfikowano

białka Csk, PAG i PEP, które są elementami złożonego mechanizmu kontrolującego aktywność tych kluczowych dla funkcjonowania immunoreceptorów kinaz. Mechanizm ten wykorzystuje dynamiczny, odwracalny charakter oddziaływań domen SH2 z ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi białek. Kinaza Csk odpowiada za dezaktywację kinaz z rodziny Src; fosforyluje ona bowiem C-końcową resztę tyrozynową kinaz Src, promując w ten sposób wewnątrzcząsteczkową interakcję tej reszty z domeną SH2 ufosforylowanej kinazy. Csk przemieszcza się z cytoplazmy do mikrodomen dzięki interakcji własnej domeny SH2 z ufosforylowanym transbłonowym białkiem PAG, kompartmentalizowanym właśnie w ich obrębie. W czasie aktywacji TCR białko PAG ulega defosforylacji, katalizowanej przypuszczalnie przez zasocjowaną z nim fosfatazę tyrozynową PEP, co prowadzi do dysocjacji kinazy Csk. Ubytek Csk z mikrodomen otwiera możliwość defosforylacji supresyjnej reszty tyrozynowej z końca C kinaz rodziny Src. Pełna aktywacja tych kinaz wymaga dodatkowo fosforylacji drugiej reszty tyrozynowej, zlokalizowanej w centrum katalitycznym tych kinaz (BRDICKA i współaut. 2000). Na skutek tych zmian kinazy Src przyjmują konformację optymalną dla ich aktywności katalitycznej i mogą fosforylować aktywowane immunoreceptory, które skupiają się w obrębie mikrodomen. Nagromadzenie receptorów znacznie ułatwia też wzajemną aktywację asocjujących z nimi (bezpośrednio lub pośrednio) cząsteczek sygnałowych, inicjujących kaskady sygnałów wewnątrzkomórkowych.

FUZJA MIKRODOMEN JAKO MECHANIZM PROMUJĄCY URUCHOMIENIE SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH

Teoria o funkcjonowaniu mikrodomen jako platform sygnałowych immunoreceptorów została rozwinięta w oparciu o wyniki badań ultrastrukturalnych nad rozmieszczeniem receptorów w płaszczyźnie błony komórkowej. Badania te prowadzono na dużych fragmentach natywnej błony komórkowej, uzyskiwanych niekonwencjonalną techniką mechanicznego rozrywania komórek. Stwierdzono, że aktywacji receptorów FcεRI i FcγRIIA towarzyszy formowanie się wyraźnych skupień materiału elektronowo-gęstego rozproszonych w płaszczyźnie błony komórkowej. Skupienia takie osiągały 200–300 nm średnicy, a w ich obrębie zakumulowana była większość wspomnianych

immunoreceptorów (WILSON i współaut. 2000, STRZELECKA-KILISZEK i współaut. 2004). Stosując szerokie spektrum przeciwciał sprzężonych z cząstkami złota koloidalnego przeanalizowano skład białkowy opisanych struktur elektronowo-gęstych i stwierdzono, że mogą one odpowiadać mikrodomenom. Ich rozmiar przekraczał jednakże około dziesięciokrotnie rozmiar natywnych mikrodomen wykrywanych w komórkach spoczynkowych. Zaproponowano zatem, że skupienia takie obrazują konglomeraty mikrodomen, które uległy fuzji. Analogiczne konglomeraty mikrodomen wykrywane były także technikami mikroskopii immunofluorescencyjnej. Obserwowano między

innymi, że aktywacja receptorów FcεI, FcγIIA i TCR wywołuje redystrybucję składników mikrodomen, takich jak białka z kotwicą GPI, kinazy z rodziny Src i gangliozydy, a efektem tych przemieszczeń jest akumulacja wspomnianych białek i lipidów w obrębie wyraźnych agregatów, rozproszonych w płaszczyźnie błony komórkowej (STAUFER i MEYER 1997, JANES i współaut. 1999, HARDER i KUHN 2000, KWIATKOWSKA i współaut. 2003). Wydaje się zatem, że aktywacja immunoreceptorów prowadzi nie tylko do ich asocjacji z mikrodomenami, ale indukuje też zlewianie się mikrodomen w większe funkcjonalne kompleksy.

Zgodnie z postawioną wyżej tezą stwierdzono, że struktura i skład białkowy skupisk mikrodomen, w których zbierał się aktywowany receptor FcεI były dynamiczne. Ewolowały one z drobnych agregatów, bogatych w kinazę Lyn, w większe konglomeraty zawierające kinazę Syk występującą w bezpośrednim sąsiedztwie receptora FcεI. W opisywanych obszarach elektronowo-gęstych skupień receptora FcεI zlokalizowano też LAT, białko platformowe, substrat kinazy Syk rezydujący w mikrodomenach. Po aktywacji receptora FcεI i fosforylacji kilku reszt tyrozynowych LAT to właśnie do tego białka wiąże się szereg kolejnych białek kaskady sygnałowej receptora FcεI. Obserwowane w mikroskopie elektronowym skupiska białka LAT tylko częściowo pokrywały się ze skupieniami aktywowanego receptora FcεI, a często zlokalizowane były na ich obrzeżach. Z uwagi na tę wykrytą separację aktywowanego receptora FcεI i białka LAT zaproponowano, że zlewianie się mikrodomen, towarzyszące aktywacji receptora FcεI, nie jest chaotyczne. Przeciwnie, stanowi ono ważny element organizacji przestrzennej powstającego kompleksu białek i lipidów sygnałowych (WILSON i współaut. 2001). Coraz częściej rozważa się też możliwość, że w komórkach niestymulowanych współlistnieją mikrodomeny o różnym składzie białkowym. Obok wspomnianych badań ultrastrukturalnych nad aktywacją receptora FcεI sugestię taką potwierdzają wyniki prac nad segregacją mikrodomen w limfocytach T, neuronach i monocytach (PIKE 2003, STRZELECKAK-KILISZEK i współaut. 2004). Aktywacja i agregacja immunoreceptorów przez wielowartościowe ligandy indukowałaby asocjację receptorów z mikrodomenami oraz wywoływała fuzję różnorodnych mikrodomen w funkcjonalny konglomerat, zawierający wszystkie niezbędne elementy kompleksu sy-

gnałowego receptora. W utrzymaniu i uporządkowaniu przestrzennym powstałego konglomeratu mógłby uczestniczyć cytoskielet aktynowy, ulegający lokalnej reorganizacji (SIMONS i TOOMRE 2000). Ten model wydaje się tłumaczyć zjawiska, które towarzyszą, na przykład, aktywacji TCR. Pełna aktywacja limfocyta T wymaga jednoczesnej aktywacji TCR oraz receptorów towarzyszących i cząsteczek kostymulujących, na przykład białek CD4 lub CD8, białka CD28. Te białka bądź rezydują w mikrodomenach bądź asocjują z nimi po związaniu antygeny przez TCR. Zatem, dopiero fuzja mikrodomen niosących poszczególne receptory i ko-receptory warunkuje zorganizowanie funkcjonalnego kompleksu sygnałowego receptora TCR i uformowanie tzw. synapsy immunologicznej na styku limfocyta T i komórki prezentującej antygen (VIOLA i współaut. 1999). Dzięki stabilności tej struktury, utrzymywanej przy udziale cytoskieletu aktynowego, TCR może być efektywnie aktywowany przez zaledwie kilkadziesiąt cząsteczek antygeny (ALONSO i MILAN 2001). Analogicznie, fuzja mikrodomen wydaje się warunkować „spotkanie” aktywowanego BCR i receptora FcγIIB w płaszczyźnie błony komórkowej limfocyta B. Receptor FcγIIB uruchamia wtedy supresyjne szlaki sygnałowe hamujące niepożądaną syntezę przeciwciał (AMAN i współaut. 2001).

Ciągle otwarte pozostaje kluczowe pytanie – jakie mechanizmy mogą decydować o asocjacji aktywowanych immunoreceptorów z mikrodomenami oraz zlewaniu się mikrodomen? Pierwsze wskazówki na ten temat dają wyniki badań z użyciem rekombinowanego białka, w którym transbłonowa domena receptora CD40 została „zamieniona” na odpowiedni region fosfatazy CD45, nie asocjującej z mikrodomenami; białko to również traciło taką zdolność (BOCK i GULBINS 2003). Wyniki te, poparte analizą mutantów hemaglutyniny wirusa grypy (białka wbudowującego się w błonę komórkową w obrębie mikrodomen), sugerują, że długość i specyficzna sekwencja aminokwasowa fragmentu transbłonowego białek umożliwia im interakcję z mikrodomenami (SCHEIFFELE i współaut. 1997). Rozwinięciem tej hipotezy jest teoria otoczek lipidowych, formowanych dzięki selektywnej interakcji wybranych białek z 15–30 cząsteczkami sfingolipidów i cholesterolu. W komórkach spoczynkowych, białka takie występowałyby w błonie komórkowej w równowadze z formami pozba-

wionymi otoczek oraz z wolnymi mikroskupieniami sfingolipidów i cholesterolu, nie wydzielając się w postaci oddzielnej fazy lipidowej. Dopiero agregacja białek indukowałaby zlewianie się takich formacji lipidowo-białkowych w mikrodomeny (ANDERSON i JCOBSON 2002). Pełna charakterystyka mechanizmów warunkujących translokację immunoreceptorów i

mikrodomen w płaszczyźnie błony i kontrolujących specyficzność tego procesu jest obecnie największym wyzwaniem w badaniach nad udziałem sfingolipidowo-cholesterolowych mikrorejonów błony w funkcjonowaniu immunoreceptorów.

PLASMA MEMBRANE RAFTS AS CENTERS FOR SIGNAL TRANSDUCTION BY IMMUNORECEPTORS

S u m m a r y

Sphingolipids and cholesterol of the plasma membrane self-organize into microdomains named rafts. They are 30–50 nm dynamic lipid assemblies that facilitate local accumulation of GPI-anchored proteins and Src family protein tyrosine kinases in their outer and inner leaflet, respectively. It has been demonstrated in the last five years that immunoreceptors, including TCR, BCR and Fc receptors, associate with rafts upon binding of their polyvalent ligands. Within rafts, tyrosine residues of the receptor signaling sequence ITAM

are phosphorylated by kinases of the Src family, being convert simultaneously into docking sites for Syk and Zap70 tyrosine kinases. The joint activity of the Src and Syk/Zap70 families of tyrosine kinases triggers signaling cascades leading eventually to proper responses of cells. An important feature of this process is a fusion of rafts of various composition bringing together molecules required for formation of signaling complexes at activated immunoreceptors.

LITERATURA

- AHMED S. N., BROWN D. A., LONDON E., 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.
- ALONSO M. A., MILLAN J., 2001. *The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes*. J. Cell Sci. 114, 3957–3985.
- AMAN M. J., TOSELLO-TRAMPONT A. -C., RRVICHANDRAN K., 2001. *FcRIIB1/SHIP-mediated inhibitory signaling in B cells involves lipid rafts*. J. Biol. Chem. 276, 46371–46378.
- ANDERSON R. G. W., 1998. *The caveolae membrane system*. Ann. Rev. Biochem. 67, 199–225.
- ANDERSON R. G. W., JCOBSON K., 2002. *A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains*. Science 296, 1821–1825.
- BOCK J., GULBINS E., 2003. *The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts*. FEBS Lett. 534, 169–174.
- BRDICKA T., PAVLISTOVA D., LEO A., BRUYNS E., KORINEK V., ANGELISOVA P., SCHERER J., SHEVCHENKO A., HILGERT I., CERNY J., DRBAL K., KURAMITSU Y., KORNACKER B., HOREJSI V., SCRAVEN B., 2001. *Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adapter protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation*. J. Exp. Med. 191, 1591–1604.
- BROWN R. E., 1998. *Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal*. J. Cell Sci. 111, 1–9.
- BROWN D. A., LONDON E., 1997. *Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?* Biochem. Biophys. Res. Commun. 240, 1–7.
- BROWN D. A., ROSE J. K., 1992. *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell 68, 533–544.
- FIELD K. A., HOLOWKA D., BAIRD B., 1995. *FcRI-mediated recruitment of p53/56 lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9201–9205.
- FIELD K. A., HOLOWKA D., BAIRD B., 1997. *Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains*. J. Biol. Chem. 272, 4276–4280.
- FRIEDRICHSON T., KURZCHALIA T. V., 1998. *Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking*. Nature 394, 802–805.
- FRIDRIKSSON E. K., SHIPKOVA P. A., SHEETS E. D., HOLOWKA D., BAIRD B., MCLAFFERTY F. W., 1999. *Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry*. Biochemistry 38, 8056–8063.
- GOŁĄB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., 2002. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- HARDER T., KUHN M., 2000. *Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies*. J. Cell Biol. 151, 199–207.

- JACOBSON K., SHEETS E. D., SIMSON R., 1995. *Revisiting the fluid mosaic model of membranes*. Science 268, 1441–1442.
- JANES P. W., LEY S. C., MAGEE A. I., 1999. *Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via T cell antigen receptor*. J. Cell Biol. 147, 447–461.
- KABOURIDIS P. S., MAGEE A. I., LEY S. C., 1997. *S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signaling function in T lymphocytes*. EMBO J. 16, 4983–4998.
- KILSDONK E. P. C., YANCEY P. G., STOUTD G. W., WAN BANGERTER F., JOHNSON W. J., PHILIPS M. C., ROTHBLAT G. H., 1995. *Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins*. J. Biol. Chem. 270, 17250–17256.
- KORZENIOWSKI M., KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 2003. *Insight into the association of FcγRIIA and TCR with detergent-resistant membrane domains: isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution*. Biochemistry 42, 5358–5367.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1999. *Signaling pathways in phagocytosis*. BioEssays 21, 422–431.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 2001. *The clustered Fc receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner*. Eur. J. Immunol. 31, 989–998.
- KWIATKOWSKA K., FREY J., SOBOTA A., 2003. *Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts*. J. Cell Sci. 116, 537–550.
- MONTIXI C., LANGLET C., BERNARD A.-M., THIMONIER J., DUBOIS C., WURBEL M.-A., CHAUVIN J.-P., PIERRES M., HE H.-T., 1998. *Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains*. EMBO J. 17, 5334–5348.
- PIKE L. J., 2003. *Lipid rafts: bringing order to chaos*. J. Lipid Res. 44, 655–667.
- PIKE L. J., HAN X., CHUNG K.-N., GROSS R. W., 2002. *Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmalogen ethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis*. Biochemistry 41, 2075–2088.
- PRALLE A., KELLER P., FLORIN K., SIMONS K., HORBER J. K. H., 2000. *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J. Cell Biol. 148, 997–1007.
- SCHIEFFELE P., ROTH M. G., SIMONS K., 1997. *Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain*. EMBO J. 16, 5501–5508.
- SHEETS E. D., LEE G. M., SIMONS K., JACOBSON K., 1997. *Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane*. Biochemistry 36, 12449–12458.
- 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.
- SHENOY-SCARIA A. M., TIMSON GAUEN L. K., KWONG J., SHAW A. S., LUBLIN D. M., 1993. *Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinase p56^{lck} and p59^{lyn} mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins*. Mol. Cell Biol. 13, 6385–6392.
- SIMONS K., TOOMRE D., 2000. *Functional rafts in cell membrane*. Nature 387, 569–572.
- SIMONS K., EHEHALT R., 2002. *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. J. Clin. Invest. 110, 597–603.
- SINGER S. J., NICOLSON G. L., 1972. *The fluid mosaic model of the structure of cell membrane*. Science 175, 720–731.
- STAUFFER T., MEYER T., 1997. *Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells*. J. Cell Biol. 139, 1447–1454.
- STRZELECKA-KILISZEK A., KORZENIOWSKI M., KWIATKOWSKA K., MROZINSKA K., SOBOTA A., 2004. *Activated FcγRII and signaling molecules revealed in rafts by ultrastructural observations of plasma membrane sheets*. Mol. Membr. Biol., w druku.
- STULNIG T. M., BERGER M., SIGMUND T., RAEDERSTORFF D., STOCKINGER H., WALDHAUSL W., 1998. *Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains*. J. Cell Biol. 143, 637–644.
- VAT HOF W., RESH M. D., 1997. *Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59^{lyn}: selective requirement for NH₂-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3*. J. Cell Biol. 136, 1023–1035.
- VIOLA A., SCHROEDER S., SAKAKIBARA Y., LANZAVECCHIA A., 1999. *T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains*. Science 283, 680–682.
- WILSON B. S., PFEIFFER J. R., OLIVIER J. M., 2000. *Observing FcεRI signaling from the inside of the mast cell membrane*. J. Cell Biol. 149, 1131–1142.
- WILSON B. S., PFEIFFER J. R., SURVILADZE Z., GAUDET E. A., OLIVIER J. M., 2001. *High resolution mapping of mast cells membranes reveals primary and secondary domains of FcεRI and LAT*. J. Cell Biol. 154, 645–658.
- XAVIER R., BRENNAN T., LI Q., MCCORMACK C., SEED B., 1998. *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. Immunity 8, 723–732.
- ZACHARIAS D. A., VIOLIN J. D., NEWTON A. C., TSIEH R. Y., 2002. *Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells*. Science 296, 913–916.
- ZAJCHOWSKI L. D., ROBBINS S. M., 2002. *Lipid rafts and little caves*. Eur. J. Biochem. 269, 737–752.