

TRATWY LIPIDOWE – OBSERWACJE I WĄTPLIWOŚCI*

LIPID RAFTS – REMARKS AND DOUBTS

Natalia FEDORYSZAK-KUŚKA, Mirosława PANASIEWICZ,
Tadeusz PACUSZKA

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej,
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie: Na przestrzeni dziesięcioleci sposób przedstawiania błony komórkowej uległ znacznym zmianom. W latach dwudziestych XX wieku obrazowano ją jako dwuwarstwę lipidową. Kolejni badacze zauważyli, że w jej skład wchodzi również białka. W 1972 Singer i Nicolson wprowadzili podział białek błonowych na peryferyjne i integralne. Natomiast prowadzone przez nich badania nad fuzją komórek stały się podwaliną modelu błony komórkowej jako płynnej mozaiki lipidów i białek. Model Singera i Nicolsona pod wieloma względami jest nadal aktualny. Obecnie wiadomo, że w błonach występują fragmenty o różnym stanie uporządkowania zwane domenami błonowymi. Badanie domen błonowych jest niezwykle fascynującym, ale i trudnym wyzwaniem, ponieważ w zależności od użytych metod badawczych otrzymane wyniki mogą być różne. Na podstawie licznych badań można wnioskować, że domeny błonowe są zaangażowane w regulację szeregu procesów życiowych komórki, takich jak: adhezja, sortowanie i transport lipidów i białek oraz przekazywanie sygnałów przez błonę komórkową. Za kontrolę przekazywania sygnałów odpowiedzialne są tratwy lipidowe, jedne z kilku rodzajów domen błonowych. W obrębie tych domen zaobserwowano ułatwione oddziaływanie skupionych w nich białek i lipidów. Należy pamiętać, że w błonie komórkowej występują nie tylko tratwy lipidowe, ale również mikrodomeny bogate w ceramid oraz glikosynapsy. Rozmaitość i różnorodność domen błonowych czyni biologię błon komórkowych bardzo złożonym, lecz interesującym obiektem badawczym.

Słowa kluczowe: tratwy lipidowe, domeny błonowe, oporna na detergenty frakcja błon komórkowych, błony modelowe.

Abstract: For decades the way of viewing of the cell membrane has changed considerably. At the beginning of the twentieth century the cell membrane was visualized as a lipid bilayer. Following researches have discovered that the cell membrane contains also proteins. In 1972 Singer and Nicolson introduced the division of membrane proteins into peripheral and integral proteins. Singer and Nicolson had also conducted research on cells fusion, which have laid the foundation of the membrane model as a fluid mosaic of lipids and proteins. The Singer and Nicolson model in many aspects is still valid. Nowadays it is well known that membranes contain differently arranged regions which are called membrane domains. The study of the membrane domains is extremely fascinating but also a difficult challenge, because the results depend on methods used in the research. Based on numerous studies it can be concluded that the membrane

*Praca finansowana z projektu CMKP nr 501-2-1-25-02/09.

domains are involved in the regulation of several biological processes such as cell adhesion, sorting and transport of lipids and proteins, and also signal transduction. The latter process is controlled by lipid rafts in which facilitated interaction between proteins and lipids have been observed. It should be remembered that ceramide-enriched microdomains and glycosynapses are included among membrane domains. The variety and diversity of membranes domains make membrane biology very complex but also very interesting an object of research.

Key words: lipid rafts, membrane domains, detergent resistant membranes, model membranes.

Skróty zastosowane w pracy: [^2H] NMR – magnetyczny rezonans jądrowy wykorzystujący deuter; białko **GPI** (ang. *glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins*) – zróżnicowana rodzina białek zakotwiczonych w błonie komórkowej przez glikozylofosfatydilinozitol, w której skład wchodzi enzymy, cząsteczki adhezyjne, markery różnicowania i wiele innych; białko **Gai2** – białko należące do rodziny heterotrimerycznych białek wiążących guaninę odpowiedzialną za odpowiedź immunologiczną podczas zakażeń bakteryjnych; białko **LAT** (ang. *Linker for Activation of T cells*) – podwójnie palmitylowane adapterowe białko transbłonowe istotne dla rozwoju i aktywacji komórek T; białko **Lyn** – kinaza tyrozynowa z rodziny kinaz Src, ulegająca ekspresji głównie w komórkach krwiotwórczych oraz tkanki nerwowej, w których odgrywa kluczową rolę w proliferacji, akumulacji jonów Ca^{2+} i różnicowaniu komórek; **CT** (ang. *cholera toxin*) – toksyna przecinkowca cholery; **DHA** – kwas dokozahexaenowy, wielonienasycony kwas tłuszczowy ω -3; **DPPC** – dipalmitoilofosfatydylocholina; **DRM** (ang. *detergent resistant membranes*) – oporna na rozpuszczenie w detergencie frakcja błon komórkowych; **EPR** (ang. *electron paramagnetic resonance*) – elektronowy rezonans paramagnetyczny; **FRET** (ang. *Förster resonance energy transfer*) – technika wykorzystująca mechanizm przenoszenia energii między dwoma chromoforami na drodze innej niż promieniowanie; **GPV** (ang. *giant plasma-membrane vesicle*) – ogromny pęcherzyk błony plazmatycznej; **GUV** (ang. *giant unilamellar vesicle*) – wielki pęcherzyk błonowy; **IP3** – trifosforan inozytolu; **ld** (ang. *liquid disordered*) – stan ciekły nieuporządkowany; **lo** (ang. *liquid ordered*) – stan ciekły uporządkowany; **NMR** (ang. *nuclear magnetic resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy; **PE** – fosfatydyloetanolamina; **PIP₂** – 4,5-bisfosforanfosfatydyloinozitol; **PLC γ** – fosfolipazy C γ ; **SM** – sfingomielina; **so** (ang. *solid ordered*) – stan stały uporządkowany; **STALL** (ang. *stimulation-induced temporary arrest of lateral diffusion*) – okres unieruchomienia.

WPROWADZENIE

Błona komórkowa jest dynamicznym zgrupowaniem różnych lipidów i białek. Białka błonowe stanowią 30% [138] z około 70 000 rozmaitych białek [150] kodowanych przez 3% genomu człowieka. Różnorodność budowy zwielokrotniają modyfikacje potranslacyjne. Fakt ten imponuje, ale nie dziwi, ponieważ białka błon komórkowych są zaangażowane w regulację większości procesów życiowych komórki.

Lipidom błon komórkowych jest natomiast bardziej zagadkowy [139,147]. Składające się na niego lipidy należą do trzech grup związków: steroli, glicerofosfolipidów i sfingolipidów. Zaskakujący jest fakt, że ponad 1000 rozmaitych glicerofosfolipidów i sfingolipidów zaangażowanych jest w budowę dwuwarstwy lipidowej. Ta wielorakość lipidów podważa możliwość, aby dwuwarstwa lipidowa pełniła jedynie funkcję mechanicznej bariery między komórką a jej środowiskiem [139].

Analizując różnorodność białek i lipidów błonowych zaobserwowano, że oba te komponenty charakteryzują się unikalną właściwością polegającą na zdolności do tworzenia skupień. Powstające struktury nazywa się domenami błonowymi, wśród których wyróżnia się tratwy lipidowe. Okazuje się, że właśnie za różnorodność tych „zgrupowań” w dużej mierze odpowiedzialne są różnice w budowie lipidów błonowych. Od dawna wiadomo, że komórki charakteryzują się określonym, właściwym sobie „wzorem” gangliozydowym. Wzór ten zmienia się w charaktery-

tyczny sposób podczas wzrostu i różnicowania się komórek, rozwoju osobniczego, a także w procesach onkogenezy [50].

Niniejsza praca przeglądowa jest zestawieniem wiedzy i łączących się z nią wątpliwości z zakresu budowy, organizacji, metod izolacji i analizy domen błonowych.

DWUWARSTWA FOSFOLIPIDOWA – BŁONA JAKO PŁYNNĄ MOZAIKĄ LIPIDÓW I BIAŁEK

Jedną z pierwszych prób usystematyzowania wiadomości o budowie błony komórkowej podjęli w roku 1925 Gorter i Grendel [45]. Na podstawie oznaczeń chemicznych wyliczyli oni (popołniając znoszące się nawzajem błędy), że błony erytrocytów zawierają odpowiednią ilość lipidów, aby można było otoczyć je dwuwarstwową błoną. Skierowanie hydrofobowych reszt kwasów tłuszczowych do środka dwuwarstwy zapewniało jak najmniejszy ich kontakt ze środowiskiem wodnym [45]. Taki sposób uporządkowania jest wynikiem efektu hydrofobowego. Cząsteczki wody w bezpośrednim kontakcie z hydrofobowymi fragmentami lipidów charakteryzuje wyższy stopień uporządkowania [142]. Dodatkowo trwałość błony zapewniają oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, a także wiązania van der Waalsa między węglowodorowymi łańcuchami wchodzących w jej skład lipidów i białek [5].

Prawie 50 lat później, badania nad fuzją komórek [37], a także rozwój nowych technik, takich jak: mikroskopia elektronowa, rentgenografia, elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) pozwoliły Singerowi i Nicolsonowi na przedstawienie modelu błony komórkowej jako płynnej mozaiki lipidów i białek [132]. Płynność błony jest wynikiem zależnego od temperatury ruchu wchodzących w jej skład lipidów, który z kolei warunkuje swobodę dyfuzji występujących w niej lub związanych z nią białek. W swoim modelu Singer i Nicolson podzielili białka błonowe na peryferyjne i integralne.

Białka peryferyjne związane są z powierzchnią błony przez oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Dzisiaj zaliczamy do nich także białka GPI, tj. związane z egzoplazmatyczną warstwą błony poprzez glikozylofosfatydylinozitol [74], a także białka związane z cytoplazmatyczną warstwą błony przez reszty kwasów tłuszczowych lub poliprenoli [118].

Nowością w omawianym modelu są białka integralne (transbłonowe), które przenikają błonę na wskroś jednokrotnie [11], a jak to się to później okazało, również wielokrotnie [19]. Singer i Nicolson, zafascynowani swobodą dyfuzji lipidów i białek, którą zapewniał ich model, nie rozważali możliwości powstawania domen błonowych, chociaż nie wykluczyli występowania uporządkowanych mikrofragmentów błony.

OGRANICZENIA SWOBODY RUCHU SKŁADNIKÓW BŁONY

W następnych latach uczeni wykryli rozmaite i różnorodne ograniczenia swobody ruchu składników błony, które mogą prowadzić do powstawania domen błonowych [1,25,26,35,49,71,78,79,116,131,153]. Domeną błonową nazywamy fragment błony

różniący się swoim składem lipidowym i białkowym od jej pozostałych fragmentów [71,153]. Z zagadnieniem domenowości łączy się zjawisko asymetrii błony [21], tj. różnica składu między warstwą egzoplazmatyczną a cytoplazmatyczną [30], jednakże nie jest to tematem naszych rozważań.

Szczególnie interesujące w biologii błon komórkowych okazały się tratwy lipidowe. Badania nad tymi domenami wyniknęły z kilku niezależnych obserwacji. W 1953 roku Yu i wsp. [158] wykryli, że w błonach erytrocytów są fragmenty niejednakowo podatne na rozpuszczanie w detergentach, a zatem błona nie jest strukturą homogeną [158]. Do podobnego wniosku można było dojść porównując skład lipidów otoczki „zabieranej” przez opuszczające komórkę wirusy, ze składem całości błony [117]. Wprawdzie koncepcje domenowej budowy błony komórkowej znane były wcześniej [71,153], jednak za początek hipotezy tratw lipidowych wypada uznać pracę van Meera i Simonsa [130]. Jej autorzy zaproponowali, że preferencyjne sortowanie białek GPI do warstwy apikalnej komórek nabłonka odbywa się w aparacie Golgiego, czyli miejscu biosyntezy glikosfingolipidów i polega na tworzeniu wspólnych z glikosfingolipidami domen błonowych, utrwalanych wiązaniami wodorowymi. Pomimo zastrzeżeń innych autorów [100,105,109], ostatnio wykazano, że hipoteza ta jest, przynajmniej w pewnym stopniu, prawdziwa [75].

BŁONY MODELOWE W STANIE CIEKŁYM UPORZĄDKOWANYM I CIEKŁYM NIEUPORZĄDKOWANYM

W błonie modelowej wyróżnia się różne stany uporządkowania jej fragmentów, w tym stan stały uporządkowany (*so*), i ciekły nieuporządkowany (*ld*). W stanie *so* reszty acylowe kwasów tłuszczowych są maksymalnie rozciągnięte, ściśle upakowane i nie mają możliwości obrotu wokół wiązań C-C. Czynnikiem stymulującym rozciąganie reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidów jest niska temperatura. Dostarczenie odpowiedniej ilości energii w formie ciepła zapewnia swobodę przejścia *trans/gauche* reszt kwasów tłuszczowych. Błona ulega rozluźnieniu a cząsteczki dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) mogą wykonywać ruchy wokół swojej osi a także na boki. Błona przyjmuje stan ciekły nieuporządkowany, któremu sprzyjają nienasycone reszty kwasów tłuszczowych fosfolipidów. Podsumowując *ld* charakteryzuje luźne upakowanie reszt acylowych, możliwość swobodnego obrotu wokół wiązań C-C i znaczna ruchliwość cząsteczek lipidów w błonie.

Ważnym etapem w badaniach tratw lipidowych było wykrycie nowej formy wspólnego występowania w tej domenie błonowej cholesterolu i sfingolipidów lub glicerofosfolipidów o długołańcuchowych, nasyconych resztach kwasów tłuszczowych, tj. stanu ciekłego uporządkowanego (*lo*) [65,96]. Lipidy w stanie *lo* wykazują właściwości pośrednie między *so* a *ld*. W stanie *lo* reszty nasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych glicerofosfolipidów i sfingolipidów są rozciągnięte podobnie jak w stanie *so*, ale oddziaływania z cholesterolem [63,93,128] utrudniają ich ściśle upakowanie umożliwiając ruch cząsteczek w błonie.

Błony w stanie *ld* są od dwustu [4,146,147] do ponad tysiąc razy bardziej płynne niż w stanie *so* [131], a tylko kilka razy bardziej płynne niż w stanie *lo* [22,32,102]. Z mieszaniny lipidów „typowych dla tratw lipidowych”: sfingomieliny z resztą kwasu palmitynowego (preferującego stan *lo*), fosfatydylocholiny o dwóch resztach kwasu oleinowych (preferującego stan *ld*) i cholesterolu w proporcji 1:1:1, uzyskamy modelową błonę zawierającą różniące się składem, grubością i stopniem upakowania, oddzielone od siebie fragmenty w stanie *lo* i *ld*.

W powstawaniu tratw lipidowych cholesterol ma podstawowe znaczenie [6,76,-128] mimo tego, że znane są domeny, w których składnikiem przeważającym jest sfingomielina [113] lub ceramid [44,62,165]. Rola cholesterolu została podkreślona w nowej definicji tratw lipidowych: „Tratwy lipidowe są małymi (10–200 nm), heterogennymi, wysoce dynamicznymi, bogatymi w sterole i sfingolipidy domenami, które biorą udział w regionalizacji procesów życiowych...”[112].

Od czasu wykrycia stanu *lo* jako „trzeciego stanu” uporządkowania lipidów błonowych, zależnego od cholesterolu, temperatury i rodzaju kwasów tłuszczowych, wspólne występowanie fragmentów w stanie *lo* i *ld* w błonach modelowych było przedmiotem wielu prac [31,92]. W błonach modelowych domeny w stanie *lo* były dostrzegalne przy użyciu różnych metod [55], przy czym wybór metody decydował o uzyskanym wyniku. Małe mikrodomeny o średnicy 40–50 nm występujące w 40°C w mieszaninie sfingomieliny, fosfatydylocholiny i cholesterolu można było obserwować przy użyciu [²H] NMR i EPR, natomiast obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym skłaniały do wniosków, że w temperaturze fizjologicznej domen nie ma [18]. Wielkość obserwowanych fragmentów błony w stanie *lo* zależna od rodzaju lipidów użytych do jej otrzymania [20], w odpowiednich warunkach mogła z łatwością przekroczyć 200 nm [15,148,149], tj. granicę rozdzielczości mikroskopu optycznego. Sposobem na uzyskanie dużych fragmentów błony w stanie *lo* i *ld* okazało się sprzęganie jej składników przy użyciu przeciwciał [23] lub toksyny przecinkowca cholery (CT) [53]. W doświadczeniach z CT sprzęgnięcie gangliozydu GM1, który stanowił jedynie około 1% wchodzących w skład błony lipidów, prowadziło do pojawienia się oddzielonych od siebie, kolistych, dużych fragmentów błony w stanie *lo*. Zjawisku temu towarzyszyła również segregacja wprowadzonego do błony białka LAT. Można przypuszczać, że wykryte zmiany właściwości błony modelowej przybliżają zjawiska związane z przekazywaniem sygnałów przez błony komórkowe [131].

LIPIDY W STANIE *lo* I *ld* W BŁONACH KOMÓRKOWYCH

Budowa błon komórkowych oparta jest na tych samych fizykochemicznych podstawach, które funkcjonują w kilkuskładnikowych błonach modelowych. Setki rozmaitych lipidów, tysiące białek, wzajemne między nimi oddziaływania, występowanie glikokaliksu i szkieletu cytotomórkowego, a także aktywne procesy, jak np. endocytoza i egzocytoza, polaryzacja błony, adhezja i migracja komórek, czynią błonę komórkową trudnym, ale i fascynującym obiektem badawczym. Do niedawna dane

świadczące o wspólnym występowaniu w błonach komórkowych domen w stanie *lo* i *ld* były stosunkowo nieliczne. Wprawdzie białka GPI w egzoplazmatycznej [125], a białka acylowane w cytoplazmatycznej warstwie błony znajdowano w formie skupień [115], jednak nie było dowodów, że obserwowane zjawiska są związane z występowaniem błony w stanie *lo* lub *ld*. Wyjątek stanowiło wykrycie dużych i trwałych fragmentów błony w stanie *lo* i *ld* w makrofagach [41], a także obszerna praca o wspólnym występowaniu domen błonowych w stanie *lo* i *ld* w komórkach nabłonka [94]. W komórkach nabłonka wzajemny stosunek powierzchni błony w stanie *lo* i *ld* zmieniał się wraz z temperaturą. W temperaturze od 12°C do 25°C obszary błony w stanie *lo* stanowiły fazę ciągłą, w której występowały oddzielone od siebie fragmenty w stanie *ld*. W 37°C sytuacja uległa odwróceniu: obszary błony w stanie *ld* stanowiły fazę ciągłą z oddzielonymi od siebie fragmentami w stanie *lo*. Tłumacząc trudności z wykryciem dużych fragmentów błony komórkowych w stanie *lo*, odpowiadającym tratwom. Yethiraj i Weisshaar [159] przedstawili hipotezę rozwiniętą ostatnio przez Gomeza i wsp. [43], w myśl której czynnikiem utrudniającym powstawanie dużych tratw są białka związane z cytoszkieletem komórkowym. Na jej korzyść świadczą prace z ogromnymi pęcherzykami błony plazmatycznej (GMPV) [7,122] lub kulistymi wypustkami [69,85] będącymi fragmentami błony komórkowej pozbawionymi cytoszkieletu. Stosując metody mikroskopowe (mikroskopii dwufotonowej i spektroskopii korelacji fluorescencji) w pęcherzykach obserwowano duże fragmenty błony o właściwościach typowych dla fazy *lo* i *ld* w temperaturze poniżej 22°C. W kulistych wypustkach w 37°C podział błony na dostrzegalne przy użyciu spektroskopii korelacji fluorescencji makrodomeny zanikał, jednak można go było odtworzyć, podobnie jak w doświadczeniach z wielkimi pęcherzykami błonowymi (GUV) [53], sprzęgając występujący w błonie gangliozyd GM1 przy użyciu CT [85]. Efekt sprzęgania nie był wykrywany po usunięciu z komórek cholesterolu, można było zatem sądzić, że mamy do czynienia z domenami w fazie *lo* odpowiadającymi definicji tratw lipidowych. Jak często obserwujemy w badaniach tratw lipidowych uzyskane wyniki zależały od wyboru metody. W odróżnieniu od kulistych wypustków błony komórkowej [69], fragmenty w stanie przypominającym *lo* w ogromnych pęcherzykach błonowych zawierały, zgodnie z oczekiwaniami, białka GPI, ale nie obserwowano w nich białek transbłonowych właściwych tratw lipidowym [122]. Kaiser i wsp. postulują [69], że bogata w gangliozyd GM1 i białka transbłonowe faza tratw lipidowych w błonach komórkowych wynika z wielu wzajemnych oddziaływań wchodzących w jej skład lipidów i białek, a nie tylko powinowactwa między resztami nasyconych kwasów tłuszczowych a cholesterolem, wystarczającym do uzyskania stanu *lo* w błonach modelowych.

OPORNA NA DETERGENTY FRAKCJA BŁON KOMÓRKOWYCH – DRM

Detergenty stosowane są od dawna do izolowania i oczyszczania białek błonowych, a także do badania właściwości błon [3,60,83]. Już pierwsze

doświadczenia nad selektywnym rozpuszczaniem błon komórkowych wskazywały na ich heterogenność [48,160], ale prawdziwą eksplozję prac poświęconych odpornej na detergenty frakcji błon wywołali Brown i Rose [12]. Traktowany Tritonem X-100 homogenat komórek poddali ultrawiroowaniu w gradiencie gęstości sacharozy i na granicy gęstości między 5% i 35% roztworu sacharozy otrzymali lekką, oporną na rozpuszczenie w detergencie frakcję błon komórkowych (DRM). Frakcja DRM zawierała więcej niż rozpuszczalna część błony cholesterolu i sfingolipidów, w tym prawie wszystkie glikosfingolipidy oraz białka GPI. Na podstawie doświadczeń ze sztucznymi błonami fosfolipidowymi można było przypuszczać, że lipidy frakcji DRM odpowiadają fragmentom błony w stanie *lo* [2,22]. Zależności między składem lipidów i białek frakcji DRM otrzymywanej w wyniku ekstrakcji detergentowej komórek a występowaniem błon w stanie *lo* okazały się bardziej skomplikowane. Uzyskany wynik zależał nie tylko od właściwości badanych komórek, ale także od rodzaju i stężenia użytego detergentu [121,126], temperatury ekstrakcji, a także warunków ultrawiroowania [24,77]. Różnice składu lipidowego i białkowego frakcji DRM wynikają nie tylko z różnych warunków ich izolacji, ale co ważniejsze, z heterogenności mikrodomen błonowych [111] obserwowanej przy użyciu rozmaitych metod [16,61]. Uogólniając frakcja DRM charakteryzuje się wyższą zawartością cholesterolu i sfingomieliny niż rozpuszczalne w detergencie fragmenty błony plazmatycznej [35,110]. Na podstawie m.in. teoretycznych rozważań Browna i Londona [13] można sądzić, że długłańcuchowe, nasycone kwasy tłuszczowe lokują lipidy w fragmentach błony nierozpuszczalnych w detergencie. Do podobnego wniosku skłaniają obserwacje nad występowaniem różnych form egzogenego gangliozydu GM1 we frakcji DRM otrzymanych z komórek HL60 [108]. Z takim uogólnieniem nie zgadzają się wyniki pracy Pike i wsp. [110], którzy wykryli we frakcji DRM w znacznej proporcji 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2) z resztą kwasu arachidonowego o czterech wiązaniach podwójnych, promującą występowanie tego lipidu w rozpuszczalnej w detergentach frakcji błony. Wyjaśnienie rozbieżności proponuje Brown [14] posługując się przykładem białka HIV1-Gag [120]. Białko to miałoby wiązać PIP_2 zamykając resztę kwasu arachidonowego w zagłębieniu własnej struktury, czemu towarzyszyłaby ekspozycja związanej z białkiem reszty kwasu mirystylowego. Reszta ta, a także druga nasycona reszta stearynianowa PIP_2 , wiązałyby białko HIV1-Gag z fragmentem błony odpowiadającym DRM.

Interesującym składnikiem wyizolowanej przez Brown i Rose frakcji DRM okazały się białka GPI niemające fragmentu transbłonowego. Dla białek GPI frakcja DRM i tratwy lipidowe mają szczególne znaczenie, nie tylko tłumacząc ich sortowanie, ale także wyjaśniając mechanizm przekazywania sygnałów przez błony [129]. Występowanie białek GPI we frakcji DRM zależy od reszty glikozylofosfatydyloinozytolu [88,143], ponieważ hybrydy z końcem lipidowym GPI zastąpionym fragmentem transbłonowym innego białka wykrywano w rozpuszczalnej w detergentach frakcji błony. Ważnym dla występowania białek GPI we frakcji DRM jest nasycony charakter wchodzących w ich skład reszt kwasów tłuszczowych preferujących fazę *lo*. Maeda i wsp. [88] zaobserwowali, że komórki chomika CHO

mogą w białkach GPI wymieniać nienasycone reszty kwasów tłuszczowych nasyconymi resztami. Zjawisko to zwiększało zawartość tak zmodyfikowanych białek GPI we frakcji DRM. Pomimo tych spostrzeżeń należy pamiętać, że wysoka zawartość białek GPI we frakcji DRM nie jest równoznaczna z ich występowaniem w błonie komórkowej w formie skupień odpowiadającym tratwom lipidowym. Sharma i wsp. [125] stosując FRET (*Förster resonance energy transfer*) wykryli, że białka GPI występują w większości w formie monomerów, a jedynie 20–40% cząsteczek tworzy małe skupienia. Podobny brak zgodności opisano dla błon modelowych, gdzie alkaliczna fosfataza będąca białkiem GPI, występowała w około 30% we fragmentach błony w stanie *lo*, natomiast jej odzyskanie we frakcji DRM przekraczało 90% [68]. Jedną z pierwszych obserwacji wskazującą na występowanie białek GPI w formie skupień opierała się na tworzeniu się ich dimerów po potraktowaniu komórek związkami sprzęgającymi grupy NH_2 sąsiadujących cząsteczek [36]. Nasza próba powtórzenia tych wyników z komórkami Jurkat i białkami CD55 i CD59 skończyła się niepowodzeniem. Nie udało się wykryć dimerów badanych białek GPI, niezależnie od tego, czy posłużyliśmy się sprzęgaczami łączącymi grupy NH_2 czy też SH [107].

Dla białek peryferyjnych cytoplazmatycznej warstwy błony czynnikiem warunkującym występowanie we frakcji DRM jest ich specyficzna modyfikacja polegająca na przyłączeniu do nich reszt kwasu palmitynowego lub mirystylowego [14]. Białkami ulegającymi palmitylacji lub mirystylacji są białka G [103,162] oraz białka Ras ważne w przekazywaniu sygnału kinazy Src [29]. Postęp w poznaniu sposobu występowania białek Ras w tratwach lipidowych [28,47,54] ma swój początek w pracach z użyciem ekstrakcji detergentem [119,114]. Ważna jest także konformacja białek, ponieważ białka H-Ras związane z guanozynodifosforanem spotykamy w tratwach lipidowych, a z guanozynotrifosforanem – poza tratwami.

Od dawna wiadomo, że białka transbłonowe „nie pasują” do domen błonowych w stanie *lo* [14]. Jak już wspomniano, Kaiser i wsp. proponują dla nich występowanie fazy „podobnej do *lo*” utrzymywanej wiązaniami wodorowymi i wzajemnymi oddziaływaniami między białkami i lipidami [69]. Yu i wsp. porównali właściwości kilkudziesięciu białek frakcji DRM z komórek nerki szczura z białkami transbłonowymi występującymi poza tą frakcją [161]. Okazało się, że białka transbłonowe frakcji DRM są mniejsze i bardziej hydrofobowe niż białka transbłonowe zlokalizowane poza tą frakcją. Brown [14], a także ostatnio Leventhal i wsp. [81] zwracają uwagę, że palmitylacja białek transbłonowych sprzyja ich występowaniu we frakcji DRM. Palmitylacja nie jest jednak wystarczającym czynnikiem zapewniającym białkom względną nierozpuszczalność w detergentach [14]. Ostatnio Yang i wsp. [158] opisali szereg palmitylowanych białek występujących w większej proporcji we frakcji rozpuszczalnej w detergentach niż w DRM. Zależność między palmitylacją białek transbłonowych a ich występowaniem we frakcji DRM jest przedmiotem licznych badań i kontrowersji, widocznych w przypadku np. białka LAT [64,84,164,166]. Białko LAT jest palmitylowane na Cys26 i Cys29. Na podstawie prac części badaczy, palmitylacja Cys26 wydaje się szczególnie ważna nie tylko ze względu na występowanie tego białka we frakcji tratw lipidowych [164], ale również ze względu na jego funkcje związane z organizowaniem przekazywania sygnału poprzez receptor

TCR w komórkach Jurkat [84]. Inni autorzy przedstawili doświadczenia, z których wynika że występowanie białka LAT w tratwach lipidowych nie jest niezbędne do aktywacji komórek T [166]. Być może palmitylacja jest ważna nie dlatego, że zapewnia występowanie białka LAT we frakcji tratw lipidowych, ale ponieważ może być sygnałem warunkującym jego transport z aparatu Golgiego do błony plazmatycznej [64]. Przykładem innego białka transbłonowego, dla którego nie znaleziono prostej zależności między palmitylacją i występowaniem w DRM, jest receptor UNC5H. Białko to spotykamy we frakcji DRM niezależnie od palmitylacji, ale jego proapoptotyczna funkcja zależna jest zarówno od palmitylacji, jak i występowania we frakcji DRM [90].

Pomimo znacznego zainteresowania, nie znaleziono dotychczas uniwersalnych sekwencji aminokwasowych sortujących białka transbłonowe do frakcji DRM [14]. Wiadomo natomiast, że dla niektórych takich białek występowanie we frakcji DRM lub jej odpowiedniku otrzymanym bez detergentu [156], zależy od budowy fragmentów pozakomórkowych [155,156], transbłonowych [14,38,46,97] lub wewnątrzkomórkowych [14,144,157].

FRAKCJA DRM NIE ODPOWIADA BEZPOŚREDNIO TRATWOM LIPIDOWYM, ALE... .

Po kilkunastu latach doświadczeń i opublikowaniu kilku tysięcy doniesień dotyczących frakcji DRM wiadomo, że nie jest ona jednoznaczna z tratwami lipidowymi [82]. Najpoważniejsze zastrzeżenia dotyczące użycia detergentów do izolowania domen przedstawili Heerklotz i wsp. [58,59]. Zdaniem tych autorów, w błonach modelowych zbudowanych z DPPC, SM, i cholesterolu (1:1:1) dodatek Triton X-100 powoduje segregację cząsteczek SM i cholesterolu od DPPC, a zatem formowanie domen w stanie *lo*. Nie wiadomo, jaki jest zakres tego zjawiska [14]. Na przykład Staneva i wsp. [137] nie zaobserwowali w wielkich pęcherzykach błonowych (GUV), formowania się domen pod wpływem detergentu. Ze spostrzeżeniami tymi zgadzają się wyniki Gamer i wsp. [39], którzy badali rozpuszczanie błon przez różne detergenty przy użyciu mikroskopii sił atomowych i mikroskopu konfokalnego.

Interesujące obserwacje o występowaniu w warunkach fizjologicznych domen błonowych odpowiadających frakcji DRM opublikowali Brugger i wsp. [17]. Stwierdzili oni, że lipidom wirusa HIV otrzymywanego bez użycia detergentu ma skład bardzo podobny do lipidomu frakcji DRM otrzymanej z zainfekowanych i zdrowych komórek. Opisane zjawisko jest obserwowane również u innych wirusów. Analiza lipidomu otoczki *vesicular stomatitis virus* i semliki *forest virus* wykazała, że nie różnił się od lipidomu błony komórek, w których namnażały się [70]. Tratwy lipidowe są prawdopodobnie zaangażowane nie tylko w proces uwalniania z komórek wirusów, ale również w proces wejścia wirusa do komórki [72]. Zatem tratwy lipidowe są potencjalnymi „wrotami” zakażeń wirusowych.

Ostatnio Levental i wsp. badali występowanie w ogromnych pęcherzykach błony plazmatycznej (GPMV) lipidów w stanie *lo* i *ld* w zależności od temperatury i zawartości cholesterolu [80]. Okazało się, że zmiany powierzchni fragmentów błony

w stanie *lo* są ściśle skorelowane ze składem błony odzyskanej we frakcji DRM. Można zatem przypuszczać, że w odpowiednich warunkach detergent pozwala na badanie domen błonowych sam nie powodując ich powstawania. Nowsze modyfikacje izolacji frakcji DRM, a także lekkiej frakcji błon komórkowych otrzymywanej bez użycia detergentów przedstawił Quinn [116]. W naszych badaniach porównywaliśmy występowanie różnych form gangliozydu GM1 we frakcji DRM i we frakcji lekkich błon komórkowych otrzymywanych metodą bezdetergentową [106]. Metoda ta, oparta na dezintegracji błon komórkowych w 0,5 M Na₂CO₃ [133] pozwalała na oczyszczenie kaweoli, natomiast okazała się mało przydatna do rozdzielania mikrodomen, różniących się rozpuszczalnością w Triton X-100 [106].

Od dawna wiadomo, że wspólne występowanie białek i lipidów we frakcji DRM nie świadczy o ich bliskości w błonie [87,98,154]. Pomimo to, ekstrakcja błon komórkowych detergentem, po której zwykle następuje ultrawierowanie w gradiencie gęstości, jest popularną metodą badania „tratwofilności” białek i lipidów [152], a także podstawową metodą stosowaną w proteomice domen błonowych, w tym tratw lipidowych [33]. Aby ograniczyć niedoskonałości tej techniki, należy ocenić stopień rozpuszczenia fragmentów błony w stanie *ld* i stanie *lo* stosując metody mikroskopowe [39], kontrolować stopień usunięcia cytoszkieletu oraz dodać do gradientu niewielką ilość detergentu, aby zapobiec odtwarzaniu fragmentów rozpuszczonych błon [77]. Jako kontrolę należy używać błony komórkowe, z których usunięto cholesterol [33,34].

TRATWY LIPIDOWE JAKO „PLATFORMY SYGNAŁOWE”

Tratwy lipidowe stanowią interesującą koncepcję budowy błon komórkowych ułatwiającą interpretację takich procesów, jak: adhezja, sortowanie i transport lipidów i białek oraz przekazywanie sygnałów przez błonę komórkową [79,57,101,129]. W przekazywaniu sygnałów tratwy lipidowe wydają się szczególnie istotne, ponieważ skupiają lub wykluczają poza swój obręb określone białka i lipidy [57,129]. Na zaangażowanie tratw lipidowych w tym procesie wskazują także badania ich proteomu, wzbogaconego w białka aktywne w przekazywaniu sygnałów [33]. Nanodomeny mogą także występować w wyniku sprzęgania odpowiednimi ligandami i stanowić składniki większych, stosunkowo trwałych domen, np. synapsy immunologicznej [42].

Tratwy lipidowe mogą funkcjonować jako „platformy sygnałowe” [84], które w sposób optymalny ułatwiają wzajemne oddziaływanie różnych zawartych w nich białek [101]. Przykładem jest wchodzące w skład tratw lipidowych jedno z białek GPI, białko CD59 aktywne w uwalnianiu wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ pod wpływem C8 dopełniacza [140, 141]. Zjawisko to opisują Suzuki i wsp. posługując się metodą śledzenia pojedynczych cząsteczek. Badali oni charakter ruchu kilku-cząsteczkowych skupień CD59 powstałych w wyniku sprzęgania przeciwciałem lub C8 dopełniacza [140,141]. Użyte przeciwciało lub fragment Fab było związane z mikrokuleczkami złota. Jednocześnie autorzy badali ruch pojedynczych cząsteczek trzech fluoryzujących białek: kinazy białkowej Lyn, białka Gαi2 i fosfolipazy Cγ

(PLC γ). Wymienione białka różnią się lokalizacją w błonie: CD59 występuje w warstwie egzoplazmatycznej, Lyn w warstwie cytoplazmatycznej, a G α i2 i PLC γ oscylują między błoną a cytoplazmą [140,141].

Okazało się, że ze skupieniem CD59 łączy się białko Lyn na 200 ms, a następnie białko G α i2 na 133 ms. Po przyłączeniu białka G α i2 zmienia się charakter ruchu skupień CD59. Przed sprzęgnięciem CD59 porusza się wykazując typową „skokową” dyfuzję [99], a po sprzęgnięciu, skupienia CD59 wykazują dwa rodzaje ruchu. Ruch „zwykły” trwający około 1200 ms oraz okres unieruchomienia (STALL) trwający 550 ms następujący po przyłączeniu białek Lyn i bezpośrednio G α i2. Warunkiem występowania STALL jest aktywacja kinazy Lyn przy udziale G α i2 [141] oraz niezmienny cytoszkielet mikrofilamentów aktyny. Unieruchomiony przez połączenie z włóknkami aktyny kompleks CD59 z białkami Lyn i G α i2 stanowi mikrodomenę, do której przyłącza się PLC γ i hydrolizuje PIP $_2$ z uwolnieniem trifosforan inozytolu (IP $_3$). Prowadzi to do wzrostu cytoplazmatycznego stężenia Ca $^{2+}$. Autorzy wykazali, że za hydrolizę PIP $_2$ odpowiada prawie wyłącznie PLC γ związana przejściowo (250 ms) z kompleksem CD59 w formie STALL [140].

Na udział „nano” tratw lipidowych w przedstawionym procesie wskazują niżej przedstawione obserwacje. Sprzęganie hybrydowego CD59 z fragmentem GPI zastąpionym odcinkiem transbłonowym z innego białka nie prowadzi do aktywacji Lyn i jakichkolwiek dalszych efektów. Usunięcie cholesterolu ograniczało w formie STALL i aktywację Lyn do 20–25% wartości kontrolnych i całkowicie znosząc powstawanie IP $_3$ i zmniejszało uwalnianie Ca $^{2+}$. Efekt usunięcia cholesterolu można było odwrócić podając egzogeny cholesterol komórkom. Sprzęganie dioleoilofosfatydylocholiny (glicerofosfolipid tratwofobowy) nie prowadziło do aktywacji Lyn ani do wzrostu cytoplazmatycznego Ca $^{2+}$. To ostatnie spostrzeżenie różni się od obserwacji innych autorów, którzy otrzymali dwa modelowe fosfolipidy zbudowane z fosfatydyloetanoloaminy (PE) z resztami kwasu palmitynowego („tratwofilne”) lub oleinowego („tratwofobowe”) z przyłączonymi cząsteczkami biotyny [151]. Po wprowadzeniu modyfikowanych fosfolipidów do błon komórkowych (od 5×10^5 do 6×10^6 cząsteczek na komórkę) zbadano ich występowanie we frakcji DRM, a także przenoszenie za ich pośrednictwem sygnałów poprzez błony [151]. Okazało się, że sprzęganie przeciwciałem anti-streptawidyna kompleksu fosfolipid-biotyna-awidyna powodowało w podobnym stopniu fosforylację białka LAT i wzrost cytoplazmatycznego Ca $^{2+}$, niezależnie od budowy reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidu. Występowanie „tratwofilnej” i „tratwofobowej” pochodnej PE we frakcji DRM było zgodne z oczekiwaniami: dipalmitoilo-PE-biotyna występowała w znacznej proporcji w DRM, a dioleilo-PE-biotyna całkowicie poza nią [151]. Omawiana praca, poza zaletami, ma dwa podstawowe ograniczenia: badano efekt sprzęgania pochodnych fosfolipidów wprowadzonych do błony plazmatycznej w stężeniu kilkaset razy większym niż użyte w pracy Suzuki i wsp [140], a także otrzymano frakcję DRM stosując tylko jedno stężenie jednego detergentu Tritonu X-100.

Oba ograniczenia wydają się istotne w świetle pracy Otahala i wsp. [104] dotyczącej zjawiska cieszącego się dużym zainteresowaniem biologów, a mianowicie roli tratw lipidowych w aktywacji receptora TCR limfocytów [8,56,73,91]. Podstawo-

we znaczenie w tym procesie pełni wspomniane już adaptorowe białko LAT [64,84,164,166]. W 2005 roku Zhu i wsp. [166] opublikowali pracę podważającą udział tratw lipidowych w procesie aktywacji receptora TCR [25,166]. Autorzy otrzymali hybrydę białkową zbudowaną z fragmentu transbłonowego białka LAX, występującego poza tratwami i fragmentu cytoplazmatycznego białka LAT. Okazało się, że po ekstrakcji komórek Tritonem X-100, hybryda LAX-LAT znalazła się we frakcji rozpuszczalnej błony, mimo to skutecznie zastępowała białko LAT w jego funkcjach [166]. Otał i wsp. [104] rozszerzyli doświadczenia Zhu i wsp. [166] wprowadzając ekstrakcję błon detergentem Brij-98. Otrzymali oni nową hybrydę białkową CD25-LAT jeszcze bardziej „tratwofobową” niż LAX-LAT i co najważniejsze sprawdzili przekazywanie sygnału przy różnym stopniu ekspresji białek LAT, LAX-LAT i CD25-LAT. To ostatnie doświadczenie wykazało, że przy niskim poziomie ekspresji efektywność aktywacji komórek, mierzona wzrostem cytoplazmatycznego Ca^{2+} , jest zależna od „tratwofilności” białka LAT i jego hybryd.

O udziale tratw lipidowych w procesie aktywacji receptora TCR świadczą także wyniki zawarte w pracy Zecha i wsp. [163]. Autorzy zbadali skład białkowy i lipidowy fragmentów błony rozdzielonych po dodaniu do komórek Jurkat przeciwciała anti-CD3 lub przeciwciała anti-receptor transferyny związanych z kuleczkami polistyrenowymi. Receptor TCR występuje w błonie limfocytów razem z kompleksem CD3 i przyłączenie kuleczek z przeciwciałem prowadzi do jego aktywacji. Powstające w tym procesie domeny można wraz z kuleczkami wyizolować i zbadać wchodzące w ich skład lipidy i białka. Analiza metodą spektrometrii masowej wykazała, że aktywacji receptora TCR w zawierającej go domenie towarzyszy wzrost ilości cholesterolu, sfingomieliny i fosfatydylocholiny o nasyconych resztach kwasów tłuszczowych, a więc lipidów formujących tratwy lipidowe [163]. Przedstawione wyniki zgadzają się z wcześniejszą pracą, w której Gaus i wsp. [40] stosując metody biofizyczne wykazali wzrost upakowania lipidów w domenach powstających podczas aktywacji receptora TCR.

BŁONY TO NIE TYLKO TRATWY

Shaik i Eddidin zwracają uwagę na występowanie w błonach domen o właściwościach będących przeciwieństwem tratw lipidowych [123]. Takie mikrodomeny, o średnicy około 20 nm, zawierające PE z resztami kwasu dokozaheksaenowego (DHA), wielonienasyconego kwasu tłuszczowego ω -3, obserwowano w liposomach [134]. Czynnikiem powodującym ich powstawanie był cholesterol „unikający” kontaktu z PE zawierającą reszty kwasu dokozaheksaenowego [134]. Ostatnio Shaik wysunął hipotezę, w myśl której glicerofosfolipidy zawierające reszty kwasu dokozaheksaenowego dostają się do tratw lipidowych formując „własne” mikrodomeny zwiększające wielkość tratw i modyfikujące ich funkcje [124].

Specjalnym rodzajem domen są „tratwy” ceramidowe [10,136]. Obserwujemy je w błonach modelowych lub w błonach plazmatycznych po dodaniu ceramidu lub jego powstaniu z sfingolimieliną w wyniku działania sfingomielinazy. W błonach modelowych ceramid wypierał cholesterol z domen w stanie *lo* [95], a razem ze SM występował w formie ściśle upakowanych mikrodomen w stanie *so* [135]. W błonach modelowych mikrodomeny bogate w ceramid badane metodą FRET, nie łączyły się w duże „platformy” ceramidowe [127]. Odmienne obserwacje przedstawili Ira i Johnston [66,67]. Zaobserwowali oni, posługując się metodą mikroskopii sił atomowych i technikami fluorescencyjnych, powstawanie dużych domen ceramidowych podczas traktowania błon modelowych sfingomielinazą. Być może domeny takie są zaangażowane podczas oligomeryzacji białek CD95 (będących receptorami Fas) rozpoczynających apoptozę [136]. Zaobserwowano, że programowaną śmierć komórek, zawierających aktywną sfingomielinazę, mogą uruchomić nie tylko ligandy receptorów Fas, lecz również promieniowanie γ , UV-A i UV-C, niektóre chemoterapeutyki, bakterie oraz wirusy. Wszystkie te czynniki odpowiadały za powstanie oksydacyjnego stresu w badanych komórkach. Komórkami odpornymi na działanie egzogennych czynników proapoptotycznych są komórki i organizmy pozbawione sfingomielinazy [10].

Innymi domenami niż tratwy lipidowe są także glikosynapsy, zaangażowane w procesach adhezji komórek i przenoszeniu sygnału [9,49,51,52]. Charakteryzują się one w przeciwieństwie do „typowych” tratw lipidowych mniejszą wrażliwością na usuwanie cholesterolu i selektywną rozpuszczalnością w detergentach [52]. Z występowaniem glikoprotein i glikosfingolipidów łączą się „siateczki” i „drabinki” powstające w wyniku sprzęgania fragmentów cukrowcowych tych glikokonjugatów przez galektyny [79].

Niehomogenne występowanie w błonie glikosfingolipidów i ich maskowanie przez inne składniki błony znane było od dawna [50,145] Ostatnio Mahfound i wsp. [89] wykazali, że glikosfingolipidy w błonach występują w dwu formach: wykrywalnej przez specyficzne dla nich białka i w formie „zamaskowanej” niewiążącej takich białek. Odsłonięta i ukryta formy glikosfingolipidów występowały w różniących się gęstością nierozpuszczalnych w detergentach frakcjach błony. Można zatem przypuszczać, że występowały w różnych domenach błony komórkowej.

Pomimo znacznej liczby, przynajmniej pozornie sprzecznych informacji tratwy lipidowe wydają się być trudne w badaniu, ale nie są „iluzoryczne” [98]. Ostatnio zostały one dostrzeżone metodą pozwalającą śledzić domeny o wymiarach mniejszych niż długość fali świetlnej [27], a więc przyszłość należy do nowoczesnych metod mikroskopowych.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała z okazji czterdziestolecia powstania Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego (CMKP).

LITERATURA

- [1] AGNATI LF, GUIDOLIN D, GENEDANI S, FERRE S, BIGIANIA A, WOODS AS, FUXE K. How proteins come together in the plasma membrane and function in macromolecular assemblies – Focus on receptor mosaics. *J Mol Neurosci* 2005; **26**: 133–153.
- [2] AHMED SN, BROWN DA, LONDON E. 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* 1997; **36**: 10944–10953.
- [3] ALMGREN M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1508**: 146–163.
- [4] BALCOM BJ, PETERSEN NO. Lateral diffusion in model membranes is independent of the size of the hydrophobic region of molecules. *Biophys J* 1993; **65**: 630–637.
- [5] BARENHOLZ Y, CEVC G. Structure and properties of membranes. W: BASZKIN A, NORDE W [red.] Physical chemistry of biological surfaces. Marcel Dekker, New York: 2000: 171–241.
- [6] BARENHOLZ Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to „rafts”. *Prog Lipid Res* 2002; **41**: 1–5.
- [7] BAUMGART T, HAMMOND AT, SENGUPTA P, HESS ST, HOLOWKA DA, BAIRD BA, WEBB WW. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 3165–3170.
- [8] BIJLMAKERS MJ. Protein acylation and localization in T cell signaling. *Mol Membr Biol* 2009; **26**: 93–103.
- [9] BOGGS JM, GAO W, ZHAO JS, PARK HJ, LIU YF, BASU A. Participation of galactosylceramide and sulfate in glycosynapses between oligodendrocyte or myelin membranes. *Febs Lett* 2010; **584**: 1771–1778.
- [10] BOLLINGER CR, TEICHGRABER V, GULBINS E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1746**: 284–294.
- [11] BRETSCHKE MS. Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane. *Nat New Biol* 1971; **231**: 229–232.
- [12] BROWN DA, ROSE JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; **68**: 533–544.
- [13] BROWN DA, LONDON E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 1998; **164**: 103–114.
- [14] BROWN DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* 2006; **21**: 430–439.
- [15] BROWN DA. Seeing is believing: Visualization of rafts in model membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10517–10518.
- [16] BRUGGER B, GLASS B, HABERKANT P, LEIBRECHT I, WIELAND FT, KRASSLICH HG. The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2641–2646.
- [17] BRUGGER B, GRAHAM C, LEIBRECHT I, MOMBELLI E, JEN A, WIELAND F, MORRIS R. The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition. *J Biol Chem* 2004; **279**: 7530–7536.
- [18] BUNGE A, MULLER P, STOCKL M, HERRMANN A, HUSTER D. Characterization of the ternary mixture of sphingomyelin, POPC, and cholesterol: Support for an inhomogeneous lipid distribution at high temperatures. *Biophys J* 2008; **94**: 2680–2690.
- [19] CHOU KC, ELROD DW. Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins* 1999; **34**: 137–153.
- [20] DE ALMEIDA RFM, LOURALMS, FEDOROVA, PRIETO M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: A time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol* 2005; **346**: 1109–1120.
- [21] DEVAUX PF, MORRIS R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 2004; **5**: 241–246.
- [22] DIETRICH C, BAGATOLLI LA, VOLOVYK ZN, THOMPSON NL, LEVI M, JACOBSON K, GRATTON E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 2001; **80**: 1417–1428.

- [23] DIETRICH C, VOLOVYK ZN, LEVIM, THOMPSON NL, JACOBSON K. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10642–10647.
- [24] DOMINGUES CC, CIANAA, BUTTAFAVAA, CASADEI BR, BALDUINI C, DE PAULA E, MINETTI G. Effect of Cholesterol Depletion and Temperature on the Isolation of Detergent-Resistant Membranes from Human Erythrocytes. *J Membr Biol* 2010; **234**: 195–205.
- [25] DOUGLASS AD, VALE RD. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 2005; **121**: 937–950.
- [26] EDIDIN M. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003; **32**: 257–283.
- [27] EGGELING C, RINGEMANN C, MEDDA R, SCHWARZMANN G, SANDHOFF K, POLYAKOVA S, BELOV VN, HEIN B, VON MIDDENDORFF C, SCHONLE A, HELL SW. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 2009; **457**: 1159–1162.
- [28] EISENBERG S, HENIS YI. Interactions of Ras proteins with the plasma membrane and their roles in signaling. *Cell Signal* 2008; **20**: 31–39.
- [29] EPELMAN S, BERENGER B, STACK D, NEELY GG, MA LL, MODY CH. Microbial Products Activate Monocytic Cells through Detergent-Resistant Membrane Microdomains. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; **39**: 657–665.
- [30] FADEEL B, XUE D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; **44**: 264–277.
- [31] FEIGENSON GW. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 47–52.
- [32] FILIPPOV A, ORADD G, LINDBLOM G. Lipid lateral diffusion in ordered and disordered phases in raft mixtures. *Biophys J* 2004; **86**: 891–896.
- [33] FOSTER LJ, DE HOOG CL, MANN M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5813–5818.
- [34] FOSTER LJ. Lessons learned from lipid raft proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2008; **5**: 541–543.
- [35] FRIDRIKSSON EK, SHIPKOVA PA, SHEETS ED, HOLOWKA D, BAIRD B, MCLAFFERTY FW. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* 1999; **38**: 8056–8063.
- [36] FRIEDRICHSON T, KURZCHALIA TV. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 1998; **394**: 802–805.
- [37] FRYE LD, EDIDIN M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* 1970; **7**: 319–335.
- [38] GARCIA-GARCIA E, BROWN EJ, ROSALES C. Transmembrane mutations to Fc gamma RIIA alter its association with lipid rafts: Implications for receptor signaling. *J Immunol* 2007; **178**: 3048–3058.
- [39] GARNER AE, SMITH DA, HOOPER NM. Visualization of detergent solubilization of membranes: Implications for the isolation of rafts. *Biophys J* 2008; **94**: 1326–1340.
- [40] GAUS K, CHKLOVSKAIA E, FAZEKAS DE ST GROTH B, JESSUP W, HARDER T. Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J Cell Biol* 2005; **171**: 121–131.
- [41] GAUS K, GRATTON E, KABLE EPW, JONES AS, GELISSEN I, KRITHARIDES L, JESSUP W. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15554–15559.
- [42] GOŁĄB J, JAKUBISIAK M, LASEK W, STOKŁOSA T. Immunologia. Wyd. Nauk. PWN Warszawa 2008.
- [43] GOMEZ J, SAGUES F, REIGADA R. Effect of integral proteins in the phase stability of a lipid bilayer: Application to raft formation in cell membranes. *J Chem Phys* 2010; **132**: 135104 DOI:10.1063/1.3381179.
- [44] GONI FM, ALONSO A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 169–177.
- [45] GORTER E, GREDEL F. On bimolecular layers of lipids on chromatocytes of blood. *J Exp Med* 1925; **41**: 439–443.
- [46] GOSSE JA, WAGENKNECHT-WIESNER A, HOLOWKA D, BAIRD B. Transmembrane sequences are determinants of immunoreceptor signaling. *J Immunol* 2005; **175**: 2123–2131.

- [47] GURRY T, KAHRAMANOĞULLARI O, ENDRES RG. Biophysical Mechanism for Ras-Nanocluster Formation and Signaling in Plasma Membrane. *PLoS One* 2009; **4**: e6148
- [48] HAGMANN J, FISHMAN PH. Detergent extraction of cholera toxin and gangliosides from cultured cells and isolated membranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; **720**: 181–187.
- [49] HAKOMORI S. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J* 2004; **21**:125–137.
- [50] HAKOMORI S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 1981; **50**: 733–764.
- [51] HAKOMORI S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An Acad Bras Cienc* 2004; **76**: 553–572.
- [52] HAKOMORI S. Glycosynaptic microdomains controlling tumor phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett* 2010; **584**: 1901–1906.
- [53] HAMMOND AT, HEBERLE FA, BAUMGART T, HOLOWKAD, BAIRD B, FEIGENSON GW. Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 6320–6325.
- [54] HANCOCK JF, PARTON RG. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem J* 2005; **389**: 1–11.
- [55] HANCOCK JF. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 456–462.
- [56] HARDER T, RENTERO C, ZECH T, GAUS K. Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 470–475.
- [57] HARDING AS, HANCOCK JF. Using plasma membrane nanoclusters to build better signaling circuits. *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 364–371.
- [58] HEERKLOTZ H, SZADKOWSKA H, ANDERSON T, SEELIG J. The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of triton. *J Mol Biol* 2003; **329**: 793–799.
- [59] HEERKLOTZ H. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* 2002; **83**: 2693–2701.
- [60] HELENIUS A, SIMONS K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1975; **415**: 29–79.
- [61] HOFMAN EG, RUONALA MO, BADER AN, VAN DEN HEUVEL D, VOORTMAN J, ROOVERS RC, VERKLEIJ AJ, GERRITSEN HC, HENEGOUWEN P. EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2519–2528.
- [62] HUANG HW, GOLDBERG EM, ZIDOVETZKI R. Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **220**: 834–838.
- [63] HUANG JY, FEIGENSON GW. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J* 1999; **76**: 2142–2157.
- [64] HUNDT M, HARADA Y, DE GIORGIO L, TANIMURA N, ZHANG WG, ALTMAN A. Palmitoylation-Dependent Plasma Membrane Transport but Lipid Raft-Independent Signaling by Linker for Activation of T Cells. *J Immunol* 2009; **183**: 1685–1694.
- [65] IPSEN JH, KARLSTROM G, MOURITSEN OG, WENNERSTROM H, ZUCKERMANN, MJ. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* 1987; **905**: 162–172.
- [66] IRA, JOHNSTON LJ. Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 185–197.
- [67] IRA, ZOU S, RAMIREZ DMC, VANDERLIPS, OGILVIE W, JAKUBEK ZJ, JOHNSTON LJ. Enzymatic generation of ceramide induces membrane restructuring: Correlated AFM and fluorescence imaging of supported bilayers. *J Struct Biol* 2009; **168**: 78–89.
- [68] KAHYA N, BROWN DA, SCHWILLE P. Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry* 2005; **44**: 7479–7489.
- [69] KAISER HJ, LINGWOOD D, LEVENTAL I, SAMPAIO JL, KALVODOVA L, RAJENDRAN L, SIMONS K. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 16645–16650.
- [70] KALVODOVA L, SAMPAIO JL, CORDO S, EJSING CS, SHEVCHENKO A, SIMONS K. The Lipidomes of Vesicular Stomatitis Virus, Semliki Forest Virus, and the Host Plasma Membrane Analyzed by Quantitative Shotgun Mass Spectrometry. *J Virol* 2009; **83**: 7996–8003.
- [71] KARNOVSKY MJ, KLEINFELD AM, HOOVER RL, KLAUSNER RD. The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol* 1982; **94**: 1–6.
- [72] KAWABATA A, TANG H, HUANG H, YAMANISHI K, MORI Y. Human herpesvirus 6 envelope components enriched in lipid rafts: evidence for virion-associated lipid rafts. *Virol J* 2009; **6**: 127.

- [73] KENWORTHY AK. Have we become overly reliant on lipid rafts? Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation. *Embo Rep* 2008; **9**: 531–535.
- [74] KINOSHITA T, FUJITA M, MAEDA Y. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: Recent progress. *J Biochem* 2008; **144**: 287–294.
- [75] KLEMM RW, EJSING CS, SURMA MA, KAISER HJ, GERL MJ, SAMPAIO JL, DE ROBILLARD Q, FERGUSON C, PROSZYNSKI TJ, SHEVCHENKO A, SIMONS K. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 2009; **185**: 601–612.
- [76] KORADE Z, KENWORTHY AK. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 2008; **55**: 1265–1273.
- [77] KORZENIOWSKI M, KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Insights into the association of Fc gamma RII and TCR with detergent-resistant membrane domains: Isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution. *Biochemistry* 2003; **42**: 5358–5367.
- [78] KUSUMI A, NAKADA C, RITCHIE K, MURASE K, SUZUKI K, MURAKOSHI H, KASAI RS, KONDO J, FUJIWARA T. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2005; **34**: 351–378.
- [79] LAJOIE P, GOETZ JG, DENNIS JW, NABI IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* 2009; **185**: 381–385.
- [80] LEVENTAL I, BYFIELD FJ, CHOWDHURY P, GAI F, BAUMGART T, JANMEY PA. Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles. *Biochem J* 2009; **424**: 163–167.
- [81] LEVENTAL I, GRZYBEK M, SIMONS K. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry* 2010; **49**: 6305–6316.
- [82] LICHTENBERG D, GONI FM, HEERKLOTZ H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* 2005; **30**: 430–436.
- [83] LICHTENBERG D, ROBSON RJ, DENNIS EA. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1983; **737**: 285–304.
- [84] LIN J, WEISS A, FINCO TS. Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 28861–28864.
- [85] LINGWOOD D, RIES J, SCHWILLE P, SIMONS K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 10005–10010.
- [86] LINGWOOD D, SIMONS K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc* 2007; **2**: 2159–2165.
- [87] LINGWOOD D, SIMONS K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* 2010; **327**: 46–50.
- [88] MAEDA Y, TASHIMA Y, HOUJOU T, FUJITA M, YOKO-O T, JIGAMI Y, TAGUCHI R, KINOSHITA T. Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 1497–1506.
- [89] MAHFOUD R, MANIS A, BINNINGTON B, ACKERLY C, LINGWOOD CA. A major fraction of glycosphingolipids in model and cellular cholesterol containing membranes are undetectable by their binding proteins. *J Biol Chem* 2010; **285**: 36049–36059.
- [90] MAISSE C, ROSSIN A, CAHUZAC N, PARADISIA, KLEIN C, HAILLOT ML, HERINCS Z, MEHLEN P, HUEBER AO. Lipid raft localization and palmitoylation: Identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 2544–2552.
- [91] MANES S, VIOLA A. Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol* 2006; **23**: 59–69.
- [92] MARSH D. Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 2114–2123.
- [93] MCCONNELL HM, RADHAKRISHNAN A. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1610**: 159–173.
- [94] MEDER D, MORENO MJ, VERKADE P, VAZ WLC, SIMONS K. Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 329–334.
- [95] MEGH A, LONDON E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* 2004; **279**: 9997–10004.
- [96] MOURITSEN OG. Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem Phys Lipids* 1991; **57**: 179–194.

- [97] MUENZNER P, BACHMAN V, KUESPERT K, HAUCK CR. The CEACAM1 Transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of human pathogens via membrane microdomains. *Cell Microbiol* 2008; **10**: 1074–1092.
- [98] MUNRO S. Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell* 2003; **115**: 377–388.
- [99] MURASE K, FUJIWARA T, UMEMURA Y, SUZUKI K, IINO R, YAMASHITA H, SAITO M, MURAKOSHI H, RITCHIE K, KUSUMI A. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys J* 2004; **86**: 4075–4093.
- [100] NELSON WJ, RODRIGUEZ-BOULAN E. Unravelling protein sorting. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 282–284.
- [101] NICOLAU DV, BURRAGE K, PARTON RG, HANCOCK JF. Identifying optimal lipid raft characteristics required to promote nanoscale protein-protein interactions on the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 313–323.
- [102] ORADD G, WESTERMAN PW, LINDBLOM G. Lateral diffusion coefficients of separate lipid species in a ternary raft-forming bilayer: A Pfg-NMR multinuclear study. *Biophys J* 2005; **89**: 315–320.
- [103] OSTROM RS, INSEL PA. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* 2004; **143**: 235–245.
- [104] OTAHAL P, ANGELISOVA P, HRDINKA M, BRDICKA T, NOVAK P, DRBAL K, HOREJSI V. A New Type of Membrane Raft-Like Microdomains and Their Possible Involvement in TCR Signaling. *J Immunol* 2010; **184**: 3689–3696.
- [105] PALADINO S, SARNATARO D, PILLICH R, TIVODAR S, NITSCH L, ZURZOLO C. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 2004; **167**: 699–709.
- [106] PANASIEWICZ M, DOMEK H, HOSER G, FEDORYSZAK N, KAWALEC M, PACUSZKA T. The ceramide structure of GM1 ganglioside differently affects its recovery in low-density membrane fractions prepared from HL-60 cells with or without triton-X100. *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 175–189.
- [107] PANASIEWICZ M, DOMEK H, HOSER G, KAWALEC M, PACUSZKA T. Obserwacje nieopublikowane.
- [108] PANASIEWICZ M, DOMEK H, HOSER G, KAWALEC M, PACUSZKA T. Structure of the ceramide moiety of GM1 ganglioside determines its occurrence in different detergent-resistant membrane domains in HL-60 cells. *Biochemistry* 2003; **42**: 6608–6619.
- [109] PANG S, URQUHART P, HOOPER NM. N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 5079–5086.
- [110] PIKE LJ, HAN XL, CHUNG KN, GROSS RW. 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* 2002; **41**: 2075–2088.
- [111] PIKE LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 2004; **378**: 281–292.
- [112] PIKE LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 2006; **47**: 1597–1598.
- [113] PRENNER E, HONSEK G, HONIG D, MOBIUS D, LOHNER K. Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem Phys Lipids* 2007; **145**: 106–118.
- [114] PRIOR IA, HARDING A, YAN J, SLUIMER J, PARTON RG, HANCOCK JF. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 368–375.
- [115] PRIOR IA, MUNCKE C, PARTON RG, HANCOCK J. Direct visualization of Ras proteins spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 2003; **160**: 165–170.
- [116] QUINN PJ. A lipid matrix model of membrane raft structure. *Prog Lipid Res* 2010; **49**: 390–406.
- [117] RENKONEN O, KAARAINEN L, SIMONS K, GAHMBERG CG. The lipid class composition of Semliki forest virus and plasma membranes of the host cells. *Virology* 1971; **46**: 318–326.
- [118] RESH MD. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* 2006; **2**: 584–590.
- [119] ROY S, LUETTERFORST R, HARDING A, APOLLONI A, ETHERIDGE M, STANG E, ROLLS B, HANCOCK JF, PARTON RG. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 98–105.
- [120] SAAD JS, MILLER J, TAI J, KIMA, GHANAM RH, SUMMERS MF. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 11364–11369.
- [121] SCHUCK S, HONSHO M, EKROOS K, SHEVCHENKO A, SIMONS K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5795–5800.

- [122] SENGUPTA P, HAMMOND A, HOLOWKA D, BAIRD B. Structural determinants for partitioning of lipids and proteins between coexisting fluid phases in giant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 20–32.
- [123] SHAIKH SR, EDIDIN MA. Membranes are not just rafts. *Chem Phys Lipids* 2006; **144**: 1–3.
- [124] SHAIKH SR. Diet-induced docosahexaenoic acid non-raft domains and lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; **82**: 159–164.
- [125] SHARMAP, VARMA R, SARASIJ RC, IRA, GOUSSET K, KRISHNAMOORTHY G, RAO M, MAYOR S. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 2004; **116**: 577–589.
- [126] SHOGOMORI H, BROWN DA. Use of detergents to study membrane rafts: The good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 2003; **384**: 1259–1263.
- [127] SILVA LC, DE ALMEIDA RFM, CASTRO BM, FEDOROVA, PRIETO M. Ceramide-domain formation and collapse in lipid rafts: Membrane reorganization by an apoptotic lipid. *Biophys J* 2007; **92**: 502–516.
- [128] SILVIUS JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1610**: 174–183.
- [129] SIMONS K, TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 31–39.
- [130] SIMONS K, VAN MEER G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988; **27**: 6197–6202.
- [131] SIMONS K, VAZ WLC. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; **33**: 269–295.
- [132] SINGER SJ, NICOLSON GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; **175**: 720–731.
- [133] SONG KS, LI S, OKAMOTO T, QUILLIAM LA, SARGIACOMO M, LISANTI MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains – Detergent-free purification of caveolae membranes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9690–9697.
- [134] SONI SP, LOCASCIO DS, LIU YD, WILLIAMS JA, BITTMAN R, STILLWELL W, WASSALL SR. Docosahexaenoic acid enhances segregation of lipids between raft and nonraft domains: 2H-NMR study. *Biophys J* 2008; **95**: 203–214.
- [135] SOT J, BAGATOLLI LA, GONI FM, ALONSO A. Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys J* 2006; **90**: 903–914.
- [136] STANCEVIC B, KOLESNICK R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *Febs Lett* 2010; **584**: 1728–1740.
- [137] STANEVA G, SEIGNEURET M, KOUMANOV K, TRUGNAN G, ANGELOVA MI. Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles – A direct microscopy observation. *Chem Phys Lipids* 2005; **136**: 55–66.
- [138] STEVENS TJ, ARKIN IT. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* 2000; **39**: 417–420.
- [139] SUD M, FAHY E, COTTER D, BROWN A, DENNIS EA, GLASS CK, MERRILL AH, MURPHY RC, RAETZ CRH, RUSSELL DW, SUBRAMANIAM S. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: D527–D532.
- [140] SUZUKI KGN, FUJIWARA T, EDIDIN M, KUSUMI A. Dynamic recruitment of phospholipase C gamma at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3-Ca²⁺ signaling: single-molecule tracking study 2. *J Cell Biol* 2007; **177**: 731–742.
- [141] SUZUKI KGN, FUJIWARA T, SONEMATSU F, IINA R, EDIDIN M, KUSUMI A. GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Gα for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single molecule tracking study 1. *J Cell Biol* 2007; **177**: 717–730.
- [142] TANFORD C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 1978; **200**: 1012–1018.
- [143] TANSEY MG, BALOH RH, MILBRANDT J, JOHNSON EM. GFR alpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 2000; **25**: 611–623.
- [144] THANGAVEL M, LIU X, SUN SQ, KAMINSKY J, OSTROM RS. The C1 and C2 domains target human type 6 adenylyl cyclase to lipid rafts and caveolae. *Cell Signal* 2009; **21**: 301–308.
- [145] THOMPSON TE, TILLACK TW. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annu Rev Biophys Chem* 1985; **14**: 361–386.
- [146] TOCANNE JF, DUPOU-CEZANNE L, LOPEZ A. Lateral diffusion of lipids in model and natural membranes. *Prog Lipid Res* 1994; **33**: 203–237.

- [147] VAN MEER G, VOELKER DR, FEIGENSON GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 112–124.
- [148] VEATCH SL, KELLER S. Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1746**: 172–185.
- [149] VEATCH SL, KELLER S. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J* 2003; **85**: 3074–3083.
- [150] WALLIN E, VON HEIJNE G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 1998; **7**: 1029–1038.
- [151] WANG TY, LEVENTIS R, SILVIUS JR. Artificially lipid-anchored proteins can elicit clustering-induced intracellular signaling events in Jurkat T-lymphocytes independent of lipid raft association. *J Biol Chem* 2005; **280**: 22839–22846.
- [152] WAUGH MG, HSUAN JJ. Preparation of membrane rafts. W: LARIJANI B, WOSCHOLSKI R, ROSSER CA [red.] *Lipid Signal Protocols*. Totowa NJ: Humana Press 2009; DOI: 10.1007/978-1-60327-115-8_26
- [153] WELTIR, GLASER M. Lipid domains in model and biological membranes. *Chem Phys Lipids* 1994; **73**: 121–137.
- [154] WILSON BS, STEINBERG SL, LIEDERMAN K, PFEIFFER JR, SURVILADZE Z, ZHANG J, SAMELSON LE, YANG LH, KOTULA PG, OLIVER JM. Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2580–2592.
- [155] YAMABHAI M, ANDERSON RGW. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 2002; **277**: 24843–24846.
- [156] YANG N, JIANG J, DENG LQ, WATERS MJ, WANG XD, FRANK SJ. Growth hormone receptor targeting to lipid rafts requires extracellular subdomain 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **391**: 414–418.
- [157] YANG PL, AI LS, HUANG SC, LI HF, CHAN WE, CHANG CW, KO CY, CHEN SSL. The Cytoplasmic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Protein gp41 Harbors Lipid Raft Association Determinants. *J Virol* 2010; **84**: 59–75.
- [158] YANG Y, DI VIZIO D, KIRCHNER M, STEEN H, FREEMAN MR. Proteome Scale Characterization of Human S-Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes. *Mol Cell Proteomics* 2010; **9**: 54–70.
- [159] YETHIRAJ A, WEISSHAAR JC. Why are lipid rafts not observed *in vivo*? *Biophys J* 2007; **93**: 3113–3119.
- [160] YU J, FISCHMAN DA, STECK TL. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct* 1973; **1**: 233–248.
- [161] YU MJ, PISITKUN T, WANG GH, ARANDA JF, GONZALES PA, TCHAPYJNIKOV D, SHEN RF, ALONSO MA, KNEPPER MA. Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295**: C661–C678.
- [162] YUYAMA K, SEKINO-SUZUKI N, SANAI Y, KASAHARA K. Translocation of activated heterotrimeric G protein G alpha(o) to ganglioside-enriched detergent-resistant membrane rafts in developing cerebellum. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26392–26400.
- [163] ZECH T, EJSING CS, GAUS K, DE WET B, SHEVCHENKO A, SIMONS K, HARDER T. Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *Embo J* 2009; **28**: 466–476.
- [164] ZHANG WG, TRIBBLE RP, SAMELSON LE. LAT palmitoylation: Its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 1998; **9**: 239–246.
- [165] ZHANG Y, LI X, BECKER KA, GULBINS E. Ceramide-enriched membrane domains-Structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 178–183.
- [166] ZHU M, SHEN S, LIU Y, GRANILLO O, ZHANG W. Cutting edge: localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol* 2005; **174**: 31–35.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 24.01. 2011 r.

Przyjęto: 18.03. 2011 r.

Fedoryszak-Kuśka, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

ul. Marymoncka 99/103; 01-813 Warszawa

e-mail: fedna@cmkp.edu.pl