

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce



**Fluidita plasmatické membrány
a lipidové rafty u rostlin**

Stanislav Vosolsobě

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Katedra fyziologie rostlin, 2008

Sazba T_EX
14. srpna 2008

Poděkování

*Úvodem bych chtěl poděkovat své školitelce
RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. za obětavou pomoc a výběr tématu,
které mi otevřelo zcela nový pohled na podstatu buněčných procesů.*

*Dále děkuji všem, kteří našli dostatek odvahy a času k diskusím
nad problematikou lipidových raftů.*

Obsah

1 Úvod	6
2 Membrány mají doménovou strukturu	7
2.1 Základem je fluidní mozaika	7
2.2 Struktura membrán je komplikovanější	7
2.3 Doklady existence lipidových raftů	8
2.3.1 Mikrodomény v liposomech a dvojvrstvách	9
2.3.2 Detergentuvzdorné membrány	9
2.3.3 Lokalisace raftů na membráně	11
2.3.4 Jak rafty vypadají: tvar, velikost a dynamika	12
3 Funkce lipidových raftů	16
3.1 Buněčná polarisace a lipidové rafty	16
3.2 Apikálně polarisované buňky epitelů	16
3.3 Exocytická dráha spojená s lipidovými rafty	17
3.3.1 Membránové domény se zakládají v Golgiho aparátu	18
3.3.2 Třídění nákladu pro apikální transport	18
3.3.3 Cílení apikálního váčku	19
3.4 Endocytosa vázaná na rafty	20
3.5 Rafty jako signální platforma	21
3.6 Pučení virů	21
4 Lipidové rafty u rostlin	22
4.1 Metody výzkumu lipidových raftů v rostlinné říši	22
4.1.1 Izolace frakce nerozpustné v detergentu	22
4.1.2 Izolace GPI-kotvených proteinů	23
4.1.3 Proteomická analýza proteinů DRM	24
4.2 Obecné vlastnosti membránových mikrodomén u rostlin	24
4.2.1 Lipidové složení	24
4.2.2 Výsledky proteomických studií	25
4.2.3 Charakteristika izolovaných DRM	25
4.3 Funkce lipidových raftů u rostlin	26
4.3.1 Lipidové rafty a polarisovaný transport	27
4.3.2 Rafty a transport auxinu	28
4.3.3 Intrakce raftů s cytoskeletem	29
4.3.4 GPI-kotvené proteiny a správa buněčné stěny	29
4.3.5 Membránový transport vázaný na rafty	31
4.3.6 Rafty v obranných a symbiotických interakcích	32
5 Závěrečné shrnutí	33
Literatura	35

Abstrakt

Sfingolipidy, cholesterol a některé typy membránových proteinů (zejména GPI-kotvených) tvoří díky svým odlišným fyzikálním vlastnostem mikrodomény v rámci fosfolipidové membrány, které se vyznačují kondenzovanějším uspořádáním a lze je izolovat jako nerozpustný relikt při extrakci membrány detergentem Triton X-100. Hypotéza lipidových raftů předpokládá, že by tyto spontánně vznikající platformy mohly být jádrem buněčné polarisace. Mnoho důkazů potvrzuje důležitost lipidových raftů pro apikální váčkový transport v buňkách epitelů, signalisaci a imunitní odpověď. Recentní studie dokazují přítomnost detergentuvzdorných membránových domén i u rostlin. Tato rešerše diskutuje možný význam lipidových raftů pro polarisaci rostlinných buněk, modulaci vlastností buněčné stěny a obranu před patogeny.

Klíčová slova: Membránové mikrodomény, lipidové rafty, detergentuvzdornost, buněčná polarisace, apikální transport, exocytosa, SNARE, GPI, rostliny, epitel, buněčná stěna, huseníček

Abstract

Sphingolipids, cholesterol, and several membrane proteins (especially GPI-anchored) form, based on their specific thermodynamics, microdomains in frame of phospholipids membrane structure. These plasma-membrane microdomains can be isolated during Triton X-100 extraction as a detergent-insoluble complex. Lipid raft concept supposes that these spontaneously formed platforms are involved in generating of cell polarity. A large body of evidence confirms importance of lipid rafts for apical vesicle trafficking in epithelial cells, signaling, and immune response. Recent studies provide evidence for existence of detergent-resistant membrane domains in plants. In this review, I discuss possible role of lipid rafts in the maintenance of plant cell polarity, modulation of cell-wall properties, and pathogen defence.

Key words: Membrane microdomain, lipid raft, detergent-resistant, cell polarisation, apical transport, exocytosis, SNARE, GPI, plant, epithel, cell wall, *Arabidopsis*

On-line verze: <http://www.natur.cuni.cz/~vosolsob/rafty.pdf>

Seznam zkratk

l_d, l_o, s_o	Liquid-disordered, liquid-ordered, solid-ordered – kapalná neuspořádaná, kapalná uspořádaná a pevná fáze
AFM	Atomic force microscopy, skenovací mikroskopie
DIG	Detergent-insoluble glycolipid-enriched complex
DIM	Detergent-insoluble membrane
DRM	Detergent-resistant membrane, membrána nerozpustná v detergentu
ER	Endoplasmatické retikulum
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching, obnovení fluorescence po vybělení
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, rezonanční přenos energie při fluorescenci
FRT	Fischer rat thyroid, linie buněk štítné žlázy
GA	Golgiho aparát
GFP	Green-fluorescing protein, zeleně fluoreskující protein
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
HP-TLC	High-performance thin layer chromatography, vysoce výkonná chromatografie na tenké vrstvě
LRR-RLK	Leucine-rich repeat receptor-like kinase, receptorové kinázy s leucinovými repetitivy
MDCK	Madin-Darby canine kidney, linie psích jaterních buněk
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PEG	Polyethylenglykol
Pi-PLC	Fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C
PLAP	Placentální alkalická fosfatáza
PM	Plasmatická membrána
SDS	Dodecylsulfát sodný
TX-100	Triton X-100
YFP	Yellow-fluorescing protein, žlutě fluoreskující protein

1 Úvod

„ . . . we believe that intracellular protein traffic cannot be understood apart from lipid traffic.“

Simons & van Meer (1988)

Když jsem začal zpracovávat téma lipidových raftů, uplynulo právě deset let od okamžiku, kdy Kai Simons shrnul v časopise Nature základní koncept membránových raftů (Simons & Ikonen, 1997). Rozsahem úsporný článek byl do dnešní doby citován více než 3 500×.

Za prameny raftové hypotézy však musíme jít hlouběji do minulosti. Počátkem 70. let popsali S. J. Singer a G. L. Nicolson membránovou strukturu jako náhodně uspořádanou fluidní mozaiku lipidů a integrálních proteinů a položili tak základ moderního membránového výzkumu (Singer & Nicolson, 1972). Následující studie však odhalily, že membrána není jen náhodně uspořádanou dvourozměrnou kapalinou, ale že je její struktura výrazně složitější. Na přelomu 80. a 90. let vyplouvají na fluidní hladinu plasmatické membrány „lipidové rafty“, koncepce, jež na základě spontánní tvorby uspořádanějších membránových mikrodomén tvořených sfingolipidy, steroly a proteiny s GPI kotvou vysvětluje řadu klíčových procesů v buňce, od polarisované endo- a exocytosy, přes morfogenezi a přenos signálů až po imunitní odpověď a vstup patogenů do buňky. Současně se shromažďováním dokladů je však hypotéza lipidových raftů podrobována kritice plynoucí z většinou pouze nepřímých či rozporných důkazů pro jejich existenci a definitivní soud nebyl prozatím vyneseno.

Literatura o raftech zahrnuje několik tisíc publikací, přičemž většina výzkumů ale byla provedena na živočišných modelech. Je však zřejmé, že pokud rafty existují, budou plnit stejně významnou úlohu i u ostatních skupin organismů. V této práci se hodlám po širším obecném úvodu zaměřit na význam lipidových raftů pro rostlinnou buňku. Vzhledem k tomu, že výzkum rostlinných lipidových raftů začal až po přelomu tisíciletí a poskytuje spíše fragmentální poznatky, nelze očekávat od následujícího výčtu universalnost ani definitivnost, chtěl by však ilustrovat širší procesy, ve kterých by mohly být lipidové rafty zainteresovány.

2 Membrány mají doménovou strukturu

Membránový výzkum se od počátku snaží odpovědět tyto tři základní otázky:

- 1) Jaké je vzájemné uspořádání různých typů lipidů a proteinů v membráně.
- 2) Jakými mechanismy se struktura membrány ustavuje.
- 3) Jaký význam má její struktura pro funkci buňky.

2.1 Základem je fluidní mozaika

JE USPOŘÁDÁNÍ MEMBRÁNY NÁHODNÉ NEBO PERIODICKÉ? Pilíř současného chápání struktury biomembrán postavili [Singer & Nicolson \(1972\)](#) teorií fluidní mozaiky. Membránu popsali jako dvojvrstvu tvořenou amfipatickými lipidy na základě hydrofobních a hydrofilních interakcí. Její vlastnosti přiblížili ke kapalině, ve které zcela volně plavou transmembránové proteiny.

Fluidnost a nekrytaličnost uspořádání membrány již tehdy potvrzovalo množstvím experimentálních dokladů. Stěžejní experiment provedli Frye a Edidin v roce 1970 na heterokaryonních buňkách získaných fúzí lidských a myších buněk. Po splynutí buněk sledovali pomocí fluoreskujících protilátek pohyb lidských a myších antigenů v membráně. Potvrdili zcela náhodnou difuzi silně závislou na teplotě a velikosti proteinů. Další důkazy aperiodického rozložení membránových proteinů poskytly elektronmikroskopické studie mrazových leptů buněčného materiálu (podle [Singer & Nicolson, 1972](#)).

2.2 Struktura membrán je komplikovanější

Výsledky experimentů z 80. let přinášejí fakta, která nás nutí koncepci membránové struktury přehodnotit. Studie modelových dvojvrstev tvořených směsí fosfo- a sfingolipidů ukázaly, že různé druhy lipidů podléhají segregaci do mikrodomén (rev. [Thompson & Tillack, 1985](#)).

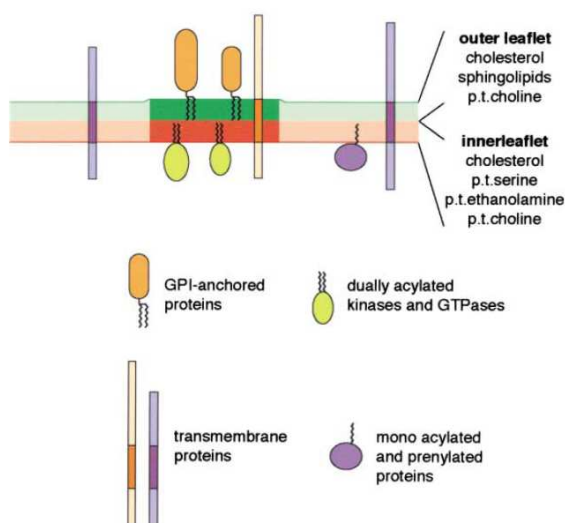
MEMBRÁNOVÉ DOMÉNY Nová koncepce membránové struktury (shrnují například [Brown & London, 1998](#)) předpokládá, že membrána není tvořena homogenní fází, ale mohou zde dynamicky koexistovat různé fáze tvořené lipidy odlišných vlastností.

Majoritní skupinou membránových lipidů jsou *fosfolipidy*. Jsou tvořeny hydrofilní hlavičkou (ethanolamin, serin či cholin připojený přes fosfát ke glycerolové kostře) a dvěma hydrofobními ocásky mastných kyselin. Podstatné je, že jedna z mastných kyselin zpravidla nese *cis* dvojnou vazbu, která způsobuje zalomení acylového řetězce a výrazně tak snižuje teplotu tání fosfolipidové dvojvrstvy, pro níž je tak typická značná fluidita a chaotické uspořádání hydrofobního jádra. Fosfolipidová fáze se proto označuje jako l_d , liquid-disordered.

Naproti tomu *sphingolipidy* mívají delší přímé řetězce mastných kyselin vždy bez *cis* vazeb, tudíž mohou být uspořádány těsněji a mají vyšší teplotu tání díky silnějším hydrofobním interakcím. Sphingolipidy tvoří kompaktní gelovou fázi s_o (solid-ordered) s omezenou fluiditou.

Nezbytnou součástí membrán jsou i *steroly*, které se vmezežují mezi acylové řetězce mastných kyselin a fungují jako moderátor fluidity. Na jednu stranu zabraňují nadměrné chaotisaci fosfolipidové fáze, na druhou udržují fluiditu fáze sphingolipidové. Sphingolipidová fáze se potom nenachází v hexagonálně uspořádané gelové s_o fázi, ale v částečně fluidním, avšak uspořádaném mezistavu l_o , liquid-ordered.

LIPIDOVÉ RAFTY Existence spontánně vznikajících lipidových mikrodomén odlišných fyzikálních vlastností by měla dalekosáhlý význam pro popis řady dějů probíhajících na buněčné membráně. Čistě na základě různé afinity proteinů k uspořádané (l_o) či neuspořádané (l_d) fázi membrány by bylo možné vysvětlit tvorbu platform (= raftů), které by mohly fungovat jako centra buněčné polarisace či signální portály (obrázek 1). Konceptu lipidových raftů shrnuje [Simons & Ikonen \(1997\)](#). Hypotéza však zatím není plně potvrzena (rev. [Munro, 2003](#)). Následuje kritický přehled jejích hlavních opěrných bodů.



Obrázek 1: **Schema lipidových raftů.** Lipidové rafty jsou shluky membránových lipidů a proteinů nacházejících se v polotekuté uspořádané fázi. Okolní membrána je neuspořádaná a výrazně fluidnější. P. t. - fosfatidyl. Převezato z [Munro \(2003\)](#).

2.3 Doklady existence lipidových raftů

Koncepce lipidových raftů je budována na třech předpokladech: (rev. [Simons & Toomre, 2000](#))

- 1) Předpokládá existenci diskrétních domén uspořádané fáze, ty jsou ale spolehlivě doloženy pouze v systémech umělých membrán.

- 2) Předpokládá relevanci biochemických a jiných experimentálních metod při studiu těchto domén, které jsou však zatíženy řadou artefaktů.
- 3) Předpokládá, že tyto domény hrají centrální roli v procesech buněčné polarisace a signalisace.

2.3.1 Mikrodomény v liposomech a dvojvrstvách

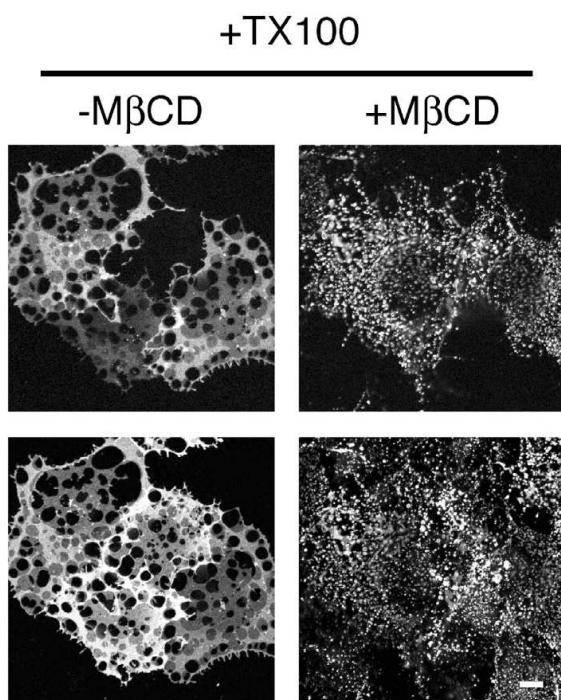
Prvním předpokladem lipidových raftů je tvorba mikrodomén uspořádané a neuspořádané lipidové fáze. Exaktní studium fázového chování není možné provádět v nativních membránách, cenné informace však přináší výzkum umělých membrán, buď ve formě liposomů (syntetické membránové váčky) či dvojvrstev (rev. [Simons & Vaz, 2004](#)). Většinou se připravují ve složení palmitoyloleylfosfocholin, sfingomyelin a cholesterol v poměru 1:1:1, jež se odpovídá složení přirozené membrány.

SFINGOLIPIDY TVOŘÍ DOMÉNY Spontánní tvorbu sfingolipidových mikrodomén v rámci membrány tvořené fosfolipidy s *cis* dvojnou vazbou dokládá např. [Ko et al. \(2006\)](#) pomocí fluorescenčních sond či [Lawrence et al. \(2003\)](#) skenovací mikroskopii. K jejich tvorbě není zapotřebí cholesterol ([Lawrence et al., 2003](#)). Interakci mezi sfingolipidy mohou podporovat vodíkové můstky vytvářející se mezi hydroxylovou a karbonylovou skupinou ceramidu (rev. [Simons & van Meer, 1988](#)) a sacharidovými zbytky u glykosfingolipidů (rev. [Edidin, 2003](#)). Pro tvorbu mikrodomén však není ani tato interakce nezbytná, neboť vzájemné oddělování fluidní l_d a gelové s_o fáze je typické i pro směs dioleyl- a dipalmitoylfosfocholinu ([Schroeder et al., 1994](#)). Potvrzuje se tak dominantní efekt hydrofobní interakce.

VLIV STEROLŮ Steroly významně mění fázové poměry v membráně. Zvyšování obsahu cholesterolu zvětšuje podíl uspořádané sfingolipidové fáze, až při 30% nakonec mizí fázové rozhraní a celá membrána přejde do homogenní uspořádané l_o fáze ([Lawrence et al., 2003](#)). Mnoho raftových vlastností lze zkoumat odstraněním cholesterolu z membrány methyl- β -cyclodextrinem (viz kapitola 2.3.4), které způsobuje rozpad struktury mikrodomém (obrázek 2). Je pozoruhodné, že po odebrání cholesterolu se v membráně domény netvoří, přestože, připravíme-li výchozí směs bez cholesterolu, lze detekovat ryze sfingolipidové domény. [Lawrence et al. \(2003\)](#) zdůvodňují tento fakt pomalou kinetikou fázového přechodu v dvojvrstvě. Výrazný je i vliv cholesterolu na uspořádání l_d fáze. Jeho přítomnost zvýší tloušťku fosfolipidové dvojvrstvy z 3,5 na 4,0 nm.

2.3.2 Detergentuvzdorné membrány

Extrahujeme-li plasmatickou membránu Tritonem X-100 při 4°C, zjistíme, že jistá frakce membrány zůstává nerozpuštěna (označuje se DRM, detergent-resistant mem-



Obrázek 2: Membránové svlečky kontroly a buňek se sníženou hladinou cholesterolu methyl- β -cyklodextrinem. Cholesterol je klíčový pro formování lipidových raftů. Fluorescenčně vizualizované raftové proteiny YFP-GL-GPI (nahore) a Cy3-CTXB (dole), extrahováno Tritonem X-100. Převzato z [Kenworthy et al. \(2004\)](#).

brane). Lze ji následně oddělit od rozpuštěné micelární frakce jako plovoucí vrstvu při ultracentrifugaci na sacharosovém gradientu. Analýzy této frakce ukazují, že je výrazně obohacena sfingolipidy a vykazuje specifický obsah proteinů. Předpokládá se, že DRM a zvláště jejich proteinové složení reprezentuje lipidové rafty a nerozpustnost proteinů v TX-100 je používána jako hlavní indikátor raftové afinity proteinů ([Shogomori & Brown, 2003](#)).

DRM A GPI PROTEINY GPI-kotvené proteiny jsou syntetizovány na endoplasmatickém retikulu. Primárně jsou v membráně kotveny C-terminální hydrofobní doménou, která je však po translaci odštěpena a nahrazena glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou tvořenou lipidem na bázi ceramidu a krátkým fosforylovaným oligosacharidovým řetízkem (rev. [Ikezawa, 2002](#)). Po exocytóze se GPI proteiny nacházejí výlučně na *vnější* straně membrány a jejich vlastnosti lze silně modulovat odštěpením od membránové kotvy specifickou fosfolipázou. Tato modifikace pravděpodobně způsobuje rozsáhlou konformační změnu proteinu, neboť každá forma reaguje s jinou specifickou protilátkou ([Butikofer \(2001\)](#), efekt byl popsán u parazita *Trypanosoma brucei*).

Lipidy GPI-kotvy jsou strukturně blízké k lipidům tvořícím uspořádané membránové domény. Významným mezníkem v historii lipidových raftů se stal experiment, který dokázal, že GPI kotva způsobuje nerozpustnost proteinu v TX-100 a asociaci se sfingolipidovými doménami ([Brown & Rose, 1992](#)). Studovaným proteinem byla placentální

alkalická fosfatáza (PLAP) v MDCK buňkách (kultura epitelových buněk psi ledviny). Shodné výsledky byly získány i studiem umělých membrán: [Schroeder et al. \(1994\)](#) dokládají nerozpustnost PLAP v TX-100 a [Saslowsky et al. \(2002\)](#) dokazují klastrování PLAP s uspořádanými mikrodomény pomocí skenovací mikroskopie.

KAVEOLY Další charakteristickou složkou detergentuvzdorné membránové frakce jsou kaveoly (rev. [Parton & Richards, 2003](#)). Jsou to zhruba 60 nm velké výdutě plasmatické membrány tvořené proteinem caveolinem 1. Mohou pokrývat až 30% povrchu savčích buněk (např. u endotelu). Elektronmikroskopicky byly rozpoznány již v 50. letech, dnes jsou interpretovány jako zvláštní typ raftových domén s ne zcela zřejmou funkcí (kapitola 3.4).

INTERPRETACE DRM Podrobný mechanismus tvorby DRM není stále objasněn. Není známo, zda se domény charakteru DRM nachází již v nativní membráně, či zda k jejich tvorbě dochází až v průběhu extrakce Tritonem X-100 (rev. [Shogomori & Brown, 2003](#)). Například [Heerklotz \(2002\)](#) dospěl při studiu fázových přeměn během tritonové extrakce liposomů ke kritickému poznatku, že při fyziologické teplotě 37°C se v raftové l_o fázi nachází jen minimální podíl sfingolipidů. Zastoupení l_o se výrazně zvyšuje až s obsahem TX-100 a klesající teplotou. DRM zřejmě nepředstavují přímo lipidové rafty, ale spíše demonstrují afinitu proteinů k různým lipidovým fázím, což nám však samo o sobě poskytuje velmi cenné informace o dynamice membrány.

2.3.3 Lokalisace raftů na membráně

Vedle interpretace DRM je další otevřenou otázkou v koncepci lipidových raftů popis interakce raftových domén napříč listy plasmatické membrány. Ke tvorbě membránových mikrodomén jsou nezbytné sfingolipidy, které se však vyskytují pouze ve vnějším listu plasmatické membrány (kde se také vyskytují GPI proteiny, podrobněji kapitola 3.2). Vnitřní list membrány je však majoritně tvořen fosfolipidy. Přesto se ale raftová asociace předpokládá i u duálně acylovaných kináz Src a α -podjednotek heterotrimerických G-proteinů či palmitoylovaných proteinů ([Simons & Toomre, 2000](#)), které se nacházejí výlučně ve vnitřním listu membrány. Předpokládá se, že existují mechanismy, kterými by se přenášelo doménové uspořádání napříč membránou, například interdigací dlouhých sfingolipidových řetězců z vnějšího listu do fosfolipidové fáze vnitřního listu. Otázka je řešena teoreticky ([Wagner et al., 2007](#)) i studiem asymetrických modelových membrán. [Lin et al. \(2006\)](#) sice dokázal, že uspořádané domény v obou listech korelují, ale toto uspořádání se zdá být silně nestabilní. V řádu minut dochází k výraznému flip-flopu mezi membránovými listy ústící v úplnou separaci lipidů l_o fáze v jednom listu, zatímco druhý list se stává ryze neuspořádaným. Ve světle těchto výsledků se jeví i asymetrie membrány jako výsledek čistě fyzikálních mechanismů. Situace v reálné

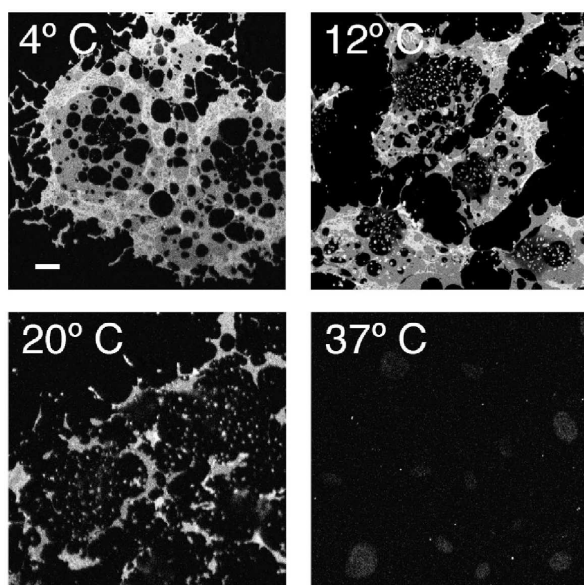
membráně se však komplikuje přítomností transmembránových a periferních membránových proteinů (annexiny a flotilliny), které asociují s lipidy, jinými proteiny či cytoskeletem a mohou přímo indukovat tvorbu raftových domén (Rajendran & Simons, 2005; Konopka-Postupolska, 2007; Neumann-Giesen et al., 2004; Rivera-Milla et al., 2006).

2.3.4 Jak rafty vypadají: tvar, velikost a dynamika

Na základě analýz proteinového složení detergentuvzdorné membránové frakce lze vytvořit řadu hypotéz funkce lipidových raftů, jejich testování však není snadné, především kvůli malé velikosti raftů, která se pohybuje na hranici rozlišení světelného mikroskopu. Pokud byl k visualisaci lipidových raftů použit GPI-kotvený GFP protein, nebylo pozorováno žádné klastrování a jeho fluorescence byla rovnoměrně rozložena po buněčné membráně. Naproti tomu visualisace GPI proteinů fluorescenčními protilátkami odhalila klastrování, to však může být artefaktem metody (Mayor & Maxfield, 1995). Poté, co byl přímo na buňky (fibroblasty přichycené k mikroskopickému sklíčku) aplikován detergent TX-100, bylo možné pod mikroskopem pozorovat tvorbu detergentuvzdorných membránových domén, které obsahovaly většinu fluorescenčně značených GPI proteinů a kaveolárních komplexů. Naopak neraftové membránové proteiny byly extrakcí prakticky odstraněny (obrázek 3). Nerozpuštěný zbytek membrán by měl představovat relikty raftových mikrodomén, nemá však charakter izolovaných ostrovů, jak by se dle raftové teorie očekávalo, ale je tvořen roztrhaným listem s vyleptanými otvory (Mayor & Maxfield, 1995). Pomocí skenovací mikroskopie byla stanovena plocha jednotlivých detergentuvzdorných fragmentů na 15–20 μm^2 (Giocondi et al., 2000).

Odvozovat z velikosti detergentuvzdorných domén velikost lipidových raftů však není možné, aplikace detergentu totiž prokazatelně stimuluje klastrování mikrodomén i proteinů (Mayor & Maxfield, 1995; Friedrichson & Kurzchalia, 1998). Zatímco velikost DRM se pohybuje v řádu mikrometrů, velikost nativních raftů pravděpodobně nepřesahuje 100 nm, jak ukazují níže popsané experimenty.

METODA FRET Metodou FRET je možné odhalit raftové klastrování proteinů i pokud by probíhalo na prostorových a časových škálách nepostižitelných konvenční fluorescenční mikroskopii. Sleduje změny polarisace fluorescence, k nimž dochází při rezonančním přenosu energie mezi fluorofory vzájemně interagujících fluorescenčních proteinů. Varma & Mayor (1998) sledovali GPI-kotvenou (raftovou) a transmembránovou (neraftovou) formu folátového receptoru, jež byly značeny fluorescenčně modifikovaným folátem. Pokud by se sledované proteiny vyskytovaly klastrovaně, docházelo by k rezonančnímu přenosu a ztrátě polarisace emise. Míra depolarisace by současně neměla záviset na hustotě proteinů v membráně, neboť se předpokládá tvorba klastrů jed-

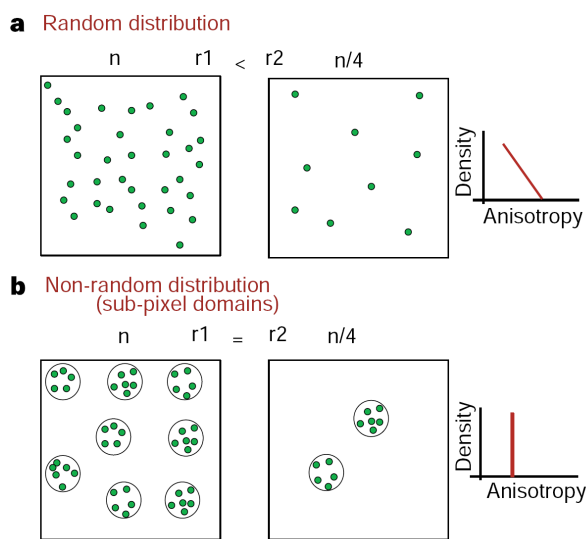


Obrázek 3: Membránové svlečky po extrakci 1% Tritonem X-100. Patrný efekt teploty na rozpustnost „raftových“ částí plasmatické membrány. Vizualizováno fluorescencí raftového proteinu Cy3-CTXB s afinitou ke glykosfingolipidům. Převzato z [Kenworthy et al. \(2004\)](#).

notné velikosti (obrázek 4). Dle očekávání vykazovala GPI-kotvená forma ve srovnání s transmembránovou klastrové chování, které bylo navíc citlivé k odstranění cholesterolu. Velikost raftových domén byla na základě těchto výsledků odhadnuta na méně než 70 nm (odpovídá klastru max. 50 GPI proteinů). Efekt jiných membránových kotev studoval stejnou metodou [Zacharias \(2002\)](#). Dipalmitoylové a myristoyl-palmitoylové kotvení YFP vedlo ke klastrování proteinů a jejich kolokalisaci s caveolinem, kdežto geranylgeranylová kotva měla efekt opačný. Raftová asociace byla v prvním případě opět doložena závislostí na hladině cholesterolu a klasickou extrakcí Tritonem X-100.

PROTEINOVÉ SHLUKY LZE ODHALIT CROSSLINKUJÍCÍMI ČINIDLI Podobné výsledky získali zcela odlišnou metodou [Friedrichson & Kurzchalia \(1998\)](#). Na zchlazené buňky (kdy je fluidita membrány téměř nulová) aplikovali chemické crosslinkující činidlo bis(sulfosuccinimidyl)suberát, který váže blízké sousedící proteiny, pokud tvoří klastry. Elektroforézou pak prokázali existenci klastrů GPI-kotvené formy růstového hormonu (GH-DAF) v plasmatické membráně MDCK buněk, zatímco jiné konstrukty GH bez předpokládané raftové afinity klastry nevytvářely. Raftovou příčinu asociace opět potvrzuje negativní efekt extrakce cholesterolu methyl- β -cyklodextrinem na tvorbu těchto klastrů. Počet proteinů v klastrech odhadují na 15.

LASER TRAP UMOŽNÍ SLEDOVAT JEDINOU MOLEKULU Velmi precízní důkazy raftové asociace získal [Pralle \(2000\)](#) metodou laserové pastě. Pomocí protilátek navázal latexovou kuličku o průměru 200 nm k jediné molekule raftově či neraftově orientovaného membránového proteinu a laserovým sledováním určil přímo viskozitní koeficient jeho pohybu membránou. Viskozitní koeficient pohybu raftových proteinů vykazoval ve



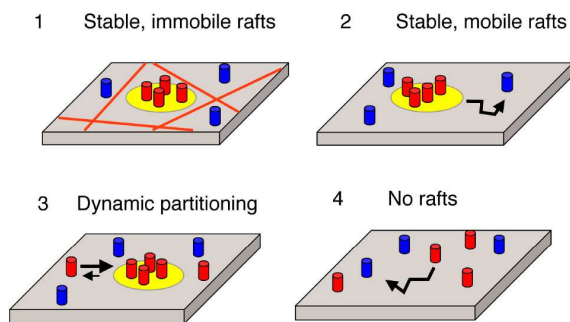
Obrázek 4: Existenci proteinových klastrů odhalí FRET. Při náhodné distribuci proteinů depolarizace emitovaného světla způsobovaná energetickým přenosem mezi fluorofory klesá s jejich hustotou (a), kdežto v případě klastrů na hustotě proteinů nezáleží (b). Převzato z [Varma & Mayor \(1998\)](#).

srovnání s neraftovými bimodální rozdělení, což je v dobrém souladu s teorií: část proteinů byla dispergována v méně viskozní neraftové frakci, zbylé byly asociovány s lipidovými rafty. Raftově asociované proteiny se mohou membránou pohybovat pouze společně s celým raftem a tudíž má jejich pohyb výrazně vyšší viskozitní koeficient, který však prokazatelně klesá po odstranění cholesterolu z membrány methyl- β -cyclodextrinem. Během několikaminutového pozorování nikdy nebyla zaznamenána disociace proteinu z raftu a nucený pohyb proteinu vyvolal pohyb celého raftu, jehož velikost autor stanovil na 50 nm (3 500 lipidů a 60 proteinů).

ODLIŠNÉ VÝSLEDKY METODY FOTOBLEACHINGU Poněkud protichůdné výsledky obdržela [Kenworthy et al. \(2004\)](#) měření difusní mobility různých typů GFP-značených membránových proteinů metodou FRAP (fluorescence recovery after fotobleaching; fluorescence sledovaných proteinů se na určité ploše odstraní silným laserovým impulsem a poté se sleduje rychlost jejího obnovení díky difusi nepoškozených fluoreskujících proteinů z okolí). Zatímco [Pralle \(2000\)](#) popisuje rafty jako rigidní domény pohybující se membránou jako celek (díky čemuž by měly mít raftové proteiny výrazně nižší, a především stejné difusní rychlosti, odpovídající difusní rychlosti celého raftu), [Kenworthy et al. \(2004\)](#) nezjistila při srovnávání rychlosti difuze na různě velikých plochách (1,4 a 4 μm) žádný signifikantní rozdíl mezi raftovými a neraftovými proteiny, ani shodu difusních rychlostí pro raftové proteiny. Podobně nesignifikantní efekt mělo i odstranění cholesterolu z membrány, jež stejnou měrou ovlivnilo raftové i neraftové proteiny.

ČTYŘI MODELY Dynamiku lipidových raftů lze popsat čtyřmi různými teoretickými modely (obrázek 5, [Kenworthy et al. \(2004\)](#)):

1) raftové proteiny jsou trvale vázány na stabilní rafty, jejichž difuze je omezena,



Obrázek 5: **Modely dynamiky membránových raftů.** 1) Stabilitní imobilní rafty 2) stabilní mobilní rafty 3) rafty s dynamickou výměnou proteinů 4) žádné rafty. Červeně raftové, modře neraftové proteiny. Převzato z [Kenworthy et al. \(2004\)](#).

například vazbou na cytoskelet

- 2) vazba proteinů je dlouhodobá, avšak rafty jako celek mohou difundovat membránou. Difusní rychlost raftových proteinů závisí na velikosti raftů, nikoli na struktuře proteinů
- 3) interakce proteinů s rafty je krátkodobá a dynamická, proteiny se separují na fázovém rozhraní
- 4) rafty neexistují, difuze proteinů závisí pouze na jejich chemické struktuře.

Většina výše uvedených výsledků spíše svědčí pro první dva modely, [Kenworthy et al. \(2004\)](#) zastává třetí, případně čtvrté stanovisko. Diskuse nad charakterem lipidových raftů je však stále otevřena. Společným artefaktem, který může ovlivňovat studie, je negativní efekt overexprese transgenních proteinů (např. GFP konstruktů). Ta může jednak podporovat klastrování, ale i zastírat přirozenou distribuci proteinů ([Kenworthy et al., 2004](#)). Velkým nebezpečím je i aplikace protilátek, jež taktéž indukují klastrování. Vzhledem k tomu, že jednou z vlastností raftů by mělo být shlukování při přenosu signálů, může detekci raftů ovlivnit použití jakéhokoliv exogenního činidla.

3 Funkce lipidových raftů

Jak již bylo zmíněno, skrze koncept lipidových raftů lze vysvětlit mechanismy mnoha podstatných procesů probíhajících v buňce (Simons & Toomre, 2000; Brown, 2006; Rajendran & Simons, 2005). V této kapitole shrnu hlavní směry a blíže se budu věnovat významu raftů pro polarisaci buňky. Na možné analogie se následně zaměřím u rostlin.

3.1 Buněčná polarisace a lipidové rafty

Ústředním motivem, jež provází vývoj eukaryotické buňky, je diversifikace membránových struktur. Na počátku evoluce eukaryot stálo oddělení míst translace proteinů a syntézy lipidů od zbytku plasmatické membrány. Vzniklo endoplasmatické retikulum následované Golgiho aparátem, kompartmentem zastávajícím enzymatické modifikace proteinů a lipidů (rev. Gurkan et al., 2007).

Výraznou funkční diversifikaci prodělal i povrch buňky. Typickým znakem eukaryot je polarisace a specialisace různých částí plasmatické membrány. U prvoků nacházíme například bičíky a specialisovaná ústní ústrojí. K rozsáhlým modifikacím pak došlo u mnohobuněčných organismů: nejlépe prozkoumaným případem buňčné polarisace tvorba apikální strany buněk epitelů a od ní odvozených axonů neuronů. U hub jsou polarisovány vrcholové části hyf a podobnými strukturami jsou též apikálně rostoucí pylové láčky a kořenové vlásky rostlin.

Podmínkou polarisace buňky přítomnost efektivních mechanismů pro třídění membránových proteinů, které probíhá nejmasivněji během exocytické dráhy a právě zde možná sehrávají ústřední roli lipidové rafty, což je nejlépe doloženo právě na modelu epitelových buněk.

3.2 Apikálně polarisované buňky epitelů

Plasmatická membrána buněk epitelů je tvořena basolaterální a apikální částí. Basolaterální zprostředkovává komunikaci s podpůrnou laminou a mezi buňkami a probíhá přes ni výměna metabolitů s organismem. Naproti tomu apikální část komunikuje s vnějším prostředím (přímo či skrze lumen entodermálních orgánů). Má funkci absorpční a exkreční a její povrch bývá tvořen aktinovými mikrokly.

APIKÁLNÍ MEMBRÁNA JE OBOHACENA SFINGOLIPIDY Již v 80. letech byl znám rozdíl v lipidovém složení obou částí membrány, tabulka 1 (rev. Simons & van Meer, 1988). Elegantní metodu dokázali rozdílné složení membrán van Meer & Simons (1982), když analyzovali obaly různých virů, jež selektivně pučí buď z apikální, nebo basolaterální strany buňky .

Tabulka 1: Lipidové složení apikální a basolaterální membrány epitelových buněk ¹

Složka	apikální (mol %)	basolaterální (mol %)
glykosfingolipidy	37,1 ± 9,3	19,4 ± 12,6
fosfolipidy	32,1 ± 6,5	52,4 ± 12,7
fosfatidylcholin	8,7 ± 3,7	31,6 ± 2,0
cholesterol	30,8 ± 3,1	28,2 ± 3,0
cholesterol/fosfolipidy	0,98 ± 0,13	0,61 ± 0,21

¹ Převzato ze [Simons & van Meer \(1988\)](#).

SFINGOLIPIDY JE OBOHACEN POUZE VNĚJŠÍ LIST MEMBRÁNY Selektivní transport (glyko)sfingolipidů do apexu buňky lze sledovat pomocí fluorescenčně značených lipidů. Asymetrickou distribuci sfingolipidů pak dokazuje úplné vymizení fluorescence po zevní extrakci serum-albuminem ([Simons & van Meer, 1988](#)). Jednostranné rozložení glykosfingolipidů bylo potvrzeno i elektronmikroskopicky specifickou agregací ricinu (konjugovaného s feritinem) pouze na vnější list membrány (rev. [Singer & Nicolson, 1972](#))¹.

TIGHT-JUNCTION ODDĚLUJÍ APIKÁLNÍ A BASOLATERÁLNÍ ČÁST Laterální difuze lipidů z apikální části membrány je znemožněna tight-junctions, které tvoří neprostupnou bariéru kolem celé apikální části buňky, avšak pouze ve vnějším membránovém listu, cytoplasmatická strana má homogenní složení a tvoří kontinuum podél celé buňky ([Simons & van Meer, 1988](#)).

3.3 Exocytická dráha spojená s lipidovými rafty

Význam lipidových raftů pro apikální polarisaci buněk epitelů spočívá v zajišťování specifické apikální transportní dráhy, na jejímž počátku stojí třídění proteinů mezi membránovými doménami. Předpoklad této funkce nalezneme již v nejstarších konceptech lipidových raftů.

SPOLEČNÝ MECHANISMUS TŘÍDĚNÍ LIPIDŮ A PROTEINŮ Koncept lipidových raftů prvně vyslovují [Simons & van Meer \(1988\)](#) pro vysvětlení odlišného proteinového a lipidového složení apikální části plasmatické membrány postulují specifický druh exocytického váčkového transportu, jehož základem by bylo samovolné klastrování sfingolipidů a určitých proteinů (zejména GPI-kotvených) do mikrodomén na Golgiho aparátu, jež by za účasti hypotetických adaptorových a obalových proteinů fungovaly jako zdroj apikálně transportovaných váčků. Následující objevy potvrzují oprávněnost této hypotézy.

¹ Ricin se váže selektivně na β -D-galaktopyranosylová residua glykosfingolipidů.

3.3.1 Membránové domény se zakládají v Golgiho aparátu

Trasu apikálního transportu začneme sledovat v Golgiho aparátu.

RAFTOTVORNÉ LIPIDY SE KONCENTRUJÍ V GOLGIHO APARÁTU Syntéza sfingolipidů začíná ceramidem na endoplasmatickém retikulu, který je následně v Golgiho aparátu modifikován na sfingomyelin a glykosfingolipidy. Obsah sfingolipidů a cholesterolu je velmi malý v membráně ER, avšak vzrůstá směrem k plasmatické membráně. Membrána Golgiho aparátu již obsahuje dostatečné procento raftotvorných lipidů pro tvorbu membránových mikrodomén. [Brugger et al. \(2000\)](#) zjistili, že třídění lipidů probíhá při pučení retrogradních COPI váčků. Vlastní mechanismus selekce lipidů však není znám, není zřejmé, zda k segregaci l_o a l_d fáze dochází před, anebo až během pučení COPI váčku.

EXISTUJÍ RAFTY NA ER? Přestože membrána endoplasmatického retikula obsahuje pouze minimum raftotvorných lipidů, zdá se, že i zde existují lipidové rafty. Recentně objevený transmembránový protein erlin vykazuje velkou afinitu k DRM, ale zároveň je resistantní k odstranění cholesterolu z plasmatické membrány. Tato skutečnost spolu s fluorescenční lokalizací dokládá, že to bude raftově vázaný protein endoplasmatického retikula ([Browman, 2006](#)). Erlin náleží do rodiny prohibitinů, jež by mohly fungovat jako chaperony chránící proteiny před proteázami během exportní dráhy. Studium lipidových raftů ER je v počátcích. Předpokládá se, že by mohly hrát roli například při genezi lipidových kapének či peroxisomů (rev. [Browman, 2006](#)).

3.3.2 Třídění nákladu pro apikální transport

Z Golgiho aparátu míří náklad k plasmatické membráně s možnou zastávkou v endosomu. Standardním transportérem jsou klathrinové váčky, homology COPI a COPII váčků (rev. [Gurkan et al., 2007](#)). Signálem pro transport klathrinovým váčkem je tyrosinový či dileucinový motiv na cytoplasmatické doměně transportovaného proteinu, který je rozeznán podjednotkou adaptorového komplexu (AP). Novější studie ukazují, že signální motiv bude zahrnovat i sekundární strukturu proteinu (rev. [Delacour & Jacob, 2006](#); [Folsch et al., 1999](#)). Adaptorový komplex iniciuje tvorbu klathrinového obalu a oddělený váček řízen Rab GTPasami putuje po cytoskeletu k cílové membráně. Splynutí s membránou zajišťují proteiny SNARE (přehledně [Gurkan et al., 2007](#)).

Naproti tomu selekce nákladu pro apikální transport probíhá složitějším mechanismem. Jako výchozí bod je postulována interakce proteinů s lipidovými mikrodoménami (hlavně skrze GPI kotvu, kapitola 2.3.2), ale nověji se ukazuje, že tato interakce není dostačující. Například dva různé GPI-kotvené proteiny (placentální alkalická fosfatáza PLAP a gD1-DAF, fusní protein glykoproteinu *Herpes simplex* a GPI domény) mohou mít v různých buněčných typech zcela odlišnou distribuci. PLAP je vždy směřována

apikálně jako součást raftů. Naproti tomu gD1-DAF se v MDCK buňkách nachází v apikální části a detergentuvzdorné raftové frakci, kdežto v FRT buňkách (linie buněk štítné žlázy) je lokalizován basolaterálně a neraftově. Chování proteinů objasňuje pokus, kdy byly FRT buňky transformovány pouze ektodoménou těchto proteinů, bez GPI vazebné domény. V obou případech proteiny neasociovaly s DRM, avšak polarisace sekrece zůstala zachována (Paladino, 2002). Potvrzuje se, že GPI kotva je sice nezbytná k lokalizaci do raftů (resp. DRM), avšak apikální selekce je jako celek výsledkem více typů meziproteinových interakcí uvnitř Golgiho aparátu.

SIGNÁLEM JSOU *N*-GLYKANY Významným apikálním signálem bude glykosylace, která je charakteristická pro mnoho apikálně sekretovaných proteinů. Umělým vnesením glykosylačního místa lze dosáhnout apikální sekrece růstového hormonu (GH), který je běžně sekretován basolaterálně Scheiffele et al. (1995). Vazbu mezi jednotlivými *N*-glykosylovanými proteiny by v tomto případě zajišťovaly lektiny, které by i zároveň tvořily kostru vznikajícího váčku (Delacour & Jacob, 2006; Fullekrug & Simons, 2004). Lipidové rafty by pak tvořily „krystalizační“ jádro vznikajícího komplexu a lektiny by umožnily apikální sekreci proteinů, které přímo neinteragují s lipidovými rafty. Je však ale možné, že je celá selekce apikálního nákladu ve skutečnosti na raftech zcela nezávislá, případně může existovat několik paralelních apikálních exocytických drah, raftových a neraftových (Delacour et al., 2007).

Pro tvorbu apikálních váčků jsou krom lektinů důležité i další proteiny, vesměs pouze fragmentálně poznané: o proteinu VIP17/MAL je známo, že je raftový a transmembránový (Cheong et al., 1999) a FAPP2 by mohl být potenciální coatomer. Interaguje s klíčovými regulátory váčkového transportu, fosfatidylinositol-4-fosfátem a GTPasou ARF (Vieira et al., 2005). Zatímco příbuzný FAPP1 slouží při basolaterálním transportu, FAPP2 je specifický pro transport apikální (Godi et al., 2004).

3.3.3 Cílení apikálního váčku

Po vytvoření v Golgiho aparátu putuje váček po cytoskeletu a i zde nacházíme specifické proteiny pro apikální dráhu: aktinový motor myosin Ia, annexiny 2 a 13b a kinesin K1FC3 (rev. Delacour & Jacob, 2006).

APIKÁLNÍ SNARE Putování váčku je na závěr ukončeno jeho splynutím s apikální membránou prostřednictvím specifického SNARE komplexu. Klíčové jsou syntaxiny (syx, podjednotky t-SNARE). V epitelových buňkách nalézáme dva typy: basolaterální syntaxin 4 a apikální syntaxin 3. Je otázkou, jakým mechanismem je syx3 směřován do apikální membrány, neboť je celý lokalizován na cytoplasmatické straně membrány a například interakce s lektiny lumenu GA nepřichází v úvahu. Syntaxin 3 lze sice v malém množství izolovat v DRM frakci (C-terminální transmembránová doména),

ale asociace s rafty není klíčová pro jeho apikální distribuci (Sharma et al., 2006). Naopak experimenty s chimerickými proteiny syx3/syx4 prokázaly, že pro apikální lokalizaci syx3 je nezbytná jeho cytoplasmatická N-terminální doména (konkrétně sekvence **Phe₃₁-Met₃₂-Asp₃₃-Glu₃₄**), která však není s to změnit basolaterální distribuci syntaxinu 4 (ter Beest et al., 2005; Sharma et al., 2006).

HETEROGENNÍ DISTRIBUCE SYNTAXINŮ A POLARISACE Pozoruhodné výsledky získal Low et al. (2006) při studiu MDCK buněk ve stádiu před ustanovením polaroty. Zjistili, že oba typy syntaxinů tvoří zcela *oddělené* klastry homogenní velikosti 200 nm, přičemž po aplikaci mikrotubulárního inhibitoru nocodazolu se rozpadla struktura klastrů syntaxinu 3, avšak destrukce aktinového cytoskeletu latrunkulinem působila výlučně na syntaxin 4. Experiment ukazuje, že plasmatická membrána je polarisována již na *ultrastrukturální úrovni*. Odstranění cholesterolu methyl- β -cyklodextrinem vedlo k rozpadu klastrů syntaxinu 3, nikoliv však syx4, což poukazuje zpětně na roli raftové asociace.

Jak je zřejmé, apikální exocytický mechanismus skrývá i po dvaceti letech mnoho nevyřešených otázek. Četné důkazy poukazují na významnou úlohu lipidových raftů, stále však není zodpovězeno, zda jsou rafty pevně plující základem, na něž jsou navázány další nadstavbové mechanismy, či zda rafty vznikají pouze jako sekundární produkt jiných interakcí.

3.4 Endocytosa vázaná na rafty

Podobně jako je apikální exocytická dráha alternativou ke standartní klathrinové, i v případě endocytosy funguje dráha nezávislá na klathrinu.

KAVEOLY Jak již bylo zmíněno v úvodu, kaveoly jsou invaginace plasmatické membrány tvořené proteinem kaveolinem 1, jenž je na cytosolické straně membrány asociován s raftovými doménami prostřednictvím hydrofobní 30 aminokyselinové smyčky a C-terminální palmitoylace (rev. Parton & Richards, 2003).

PORTÁL PRO PATOGENY Kaveoly hrají významnou úlohu při internalizaci toxinů, virů či bakteriálních patogenů. Například pentamerní cholera toxin se pevně váže na membránové glykosfingolipidy (GM1), se kterými se dostává do kaveol a je endocytován. Dále putuje přes endosom (v tomto případě označovaný jako kaveosom) a Golgiho aparát do endoplasmatického retikula, kde se po chemické přeměně uvolní vlastní patogenní podjednotka CTA, jež přes translokon vstupuje do cytoplasmy a zde narušuje signální dráhu cAMP. V kaveolách byly taktéž nalezeny GPI-kotvené proteiny, ale vždy v závislosti na jejich klastrování ligandy či protilátkami. Zmíněný komplex GM1 s cholera toxinem se naproti tomu nevyskytuje v klathrinových dolíčkách (Nichols, 2003).

HYPOTÉZY FUNKCE KAVEOL Parton & Richards (2003) předpokládají jako hlavní funkci kaveol stabilisovat raftové proteiny a chránit je před internalisací. Endocytická aktivita kaveol totiž nastává až po fosforylaci kinázami (Lajoie, 2007). Kaveoly jsou taktéž výchozím bodem tvorby T-tubulů ve svalových buňkách (rev. Simons & Toomre, 2000).

DALŠÍ RAFTOVÉ ENDOCYTOTICKÉ DRÁHY Kromě kaveol existují další endocytické mechanismy závislé na raftech a dynaminu, jež jsou předmětem recentních studií (rev. Rajendran & Simons, 2005).

3.5 Rafty jako signální platforma

Na základě analýz detergentuvzdorné frakce se předpokládá, že lipidové rafty sehrávají významnou roli v signalisaci. Ras GTPasy jsou kotveny v membráně lipidovou kotvou. Zatímco GTPasy typu K-Ras disponují pouze prenylovou kotvou, H-Ras jsou navíc i palmitoylované a tato modifikace je předurčuje k asociaci s lipidovými rafty. Jejich signální funkci tudíž výrazně ovlivňuje odstranění cholesterolu z membrány. Duálně acylované G proteiny taktéž preferují raftové domény, stejně tak jako řada kináz a receptorů.

MECHANISMUS Lokalisace signálních komponent v diskretních doménách výrazně zvyšuje jejich efektivní hustotu a usnadňuje vzájemnou interakci. Další mechanismus je spatřován ve shlukování malých raftů do velkých signálních domén. Ke shlukování raftů dochází například při vazbě protilátek a umožňuje interakci a následnou aktivaci signálních proteinů, které se za klidových podmínek vyskytují v oddělených raftech. Prozkoumaná je např. signalisace IgE receptoru během alergické reakce či signalisace T-buněk při presentaci antigenu (rev. Brown, 2006; Simons & Toomre, 2000).

3.6 Pučení virů

Na závěr stručného výčtu funkcí lipidových raftů nelze opominout pučení virů, které probíhá často právě přes tyto domény. Lipidový obal viru HIV přesně odpovídá předpokládanému složení raftových domén. Objev je významný nejen pro fyziologii virů (s možnými terapeutickými aplikacemi, inhibice syntézy sfingolipidů snižuje infekčnost viru), ale stává se i nezávislým dokladem existence lipidových raftů (Brugger et al., 2006).

4 Lipidové rafty u rostlin

První izolaci rostlinných lipidových raftů ve formě detergentuvzdorné frakce (DRM) provedla [Peskan et al. \(2000\)](#) následovaná řadou proteomických studií, které v současnosti poskytují velmi ucelený obraz proteinového složení DRM (tabulka 2). Význam raftové asociace pro funkci jednotlivých proteinů však byl studován zatím jen řídko.

První část kapitoly tvoří stručný popis metodických přístupů používaných při izolaci detergentuvzdorné frakce membrány, pak následuje souhrn informací o raftově vázaných proteinech, jímž bych chtěl nastínit význam lipidových raftů pro funkci rostlinné buňky.

Tabulka 2: Přehled nejdůležitějších studií rostlinných membránových raftů

Studie	model	metodika
Peskan et al. (2000)	<i>Nicotiana tabacum</i> , listy	elektronová mikroskopie DRM, detekce GPI a G proteinů
Borner et al. (2003)	<i>Arabidopsis th.</i> , kalus	rozsáhlá analýza GPI proteinů
Mongrand et al. (2004)	<i>Nicot. tab.</i> , listy, BY-2	izolace a důkladná charakterisace DRM
Shahollari et al. (2004)	<i>Ar. th.</i> , <i>Sinapis alba</i>	receptorové kinázy v DRM
Borner et al. (2005)	<i>Arabidopsis th.</i> , kalus	proteomika DRM
Morel et al. (2006)	<i>Nicotiana tabacum</i> , BY-2	komplexní proteomika DRM
Lefebvre et al. (2007)	<i>Medicago trunc.</i> , kořeny	kompletní analýza DRM

4.1 Metody výzkumu lipidových raftů v rostlinné říši

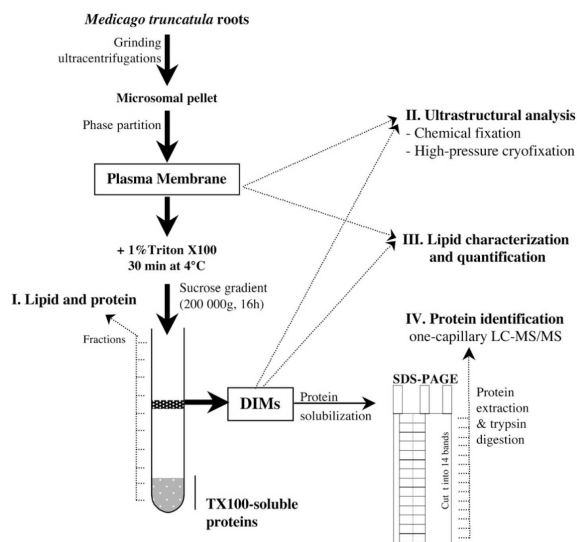
4.1.1 Izolace frakce nerozpustné v detergentu

Ve všech studiích byly komponenty lipidových raftů izolovány jako frakce membrány nerozpustné v 1% Tritonu X-100 při 4°C, v podobě jakou zavedla [Brown & Rose \(1992\)](#), kapitola 2.3.2.

PŘÍPRAVA MIKROSOMŮ Výchozí materiál (řádově 100 g) bývá homogenizován drce-ním či mixováním. Při 10–20 000 g (15–30 min) jsou odcentrifugovány těžké buněčné komponenty a čistá membránová frakce (mikrosomy) je získána následnou centrifugací při 30–100 000 g (1–2 h). Veškeré operace jsou prováděny při 4°C.

PURIFIKACE PLASMATICKÉ MEMBRÁNY Frakce plasmatické membrány se oddělí od endomembránových kompartmentů vodným *dvoufázovým systémem* polyethylenglykol–dextran T-500 (obojí 6,1–6,6%). Váčky odvozené z plasmatické membrány se získají ultracentrifugací horní PEG fázi (100 000 g, 35–60 min).

IZOLACE DRM Základním krokem bývá extrakce v 1% Tritonu X-100 při 4°C po dobu 30 minut. Obsah proteinů i množství DRM frakce klesala s nadbytkem TX-100, při vyšším podílu Tritonu však roste obohacení DRM o sfingolipidy a steroly v neprospěch fosfolipidů. [Mongrand et al. \(2004\)](#) uvádí jako optimální podíl TX-100 a proteinů 15,



Obrázek 6: Postup izolace a analýzy membránové frakce nerozpustné v detergentu. Homogenizace materiálu, příprava mikrosomů (kompletní membránový systém), oddělení čisté frakce plasmatické membrány, izolace nerozpustné DRM (=DIM) frakce centrifugací na sacharosovém gradientu, analýza. Převzato z Lefebvre et al. (2007).

větší množství TX-100 údajně způsobuje pouze ztrátu proteinů bez výrazného vlivu na lipidové složení. Laloi et al. (2007) používá poměr 8, Borner et al. (2005) pouze 5. Následným krokem je ultracentrifugace na sacharosovém gradientu – ke vzorku po extrakci se přidá sacharosa na výslednou koncentraci 48–52 %, přenesse se do centrifugační zkumavky a poté převrství sacharosovým gradientem od 45 do 5 %. Membránová frakce nerozpustná v detergentu se shromažďuje na hranici 35/30 % ($1,14 \text{ g.cm}^{-3}$; Mongrand et al. (2004)), ostatní proteiny rozpustné v Tritonu zůstávají u dna (100–250 000 g, 10–20 h).

Zajímavý alternativní postup izolace nízkohustotní membránové frakce využívající sonikaci membrány (viz oddíl 4.2.3) následovanou ultracentrifugací na sacharosovém gradientu používá skupina v Jeně (Peskan et al., 2000; Shahollari et al., 2004).

4.1.2 Izolace GPI-kotvených proteinů

Při izolaci GPI-kotvených proteinů se využívá jejich rozpustnosti v Tritonu X-114. Purifikovaná frakce membránových mikrosomů se resuspenduje v 2% Tritonu X-114 při 37°C, hydrofobní GPI proteiny se separují v detergentové fázi. Aplikací Pi-PLC, fosfolipázy specificky odštěpující GPI kotvu, je možné převést GPI proteiny do vodné fáze a po rozdělení na dvourozměrné elektroforéze identifikovat hmotnostní spektroskopii (Borner et al., 2003; Elortza et al., 2003).

4.1.3 Proteomická analýza proteinů DRM

Úskalí proteomické analýzy detergentuvzdorných membrán spočívá v malé rozpustnosti jejich proteinů v elektroforetických pufrách, zvláště v případě dvourozměrné elektroforézy. Obsah integrálních proteinů bývá při proteomické analýze PM zpravidla podhodnocen (Marmagne et al., 2004). Optimalizované složení pufrů s vyšší koncentrací chaotropních látek a přítomností neionických (*N*-oktylglukosid) i ionických (SDS) detergentů uvádí Morel et al. (2006).

Kromě proteinového složení byl analyzován taktéž obsah lipidů pomocí HP-TLC.

4.2 Obecné vlastnosti membránových mikrodomén u rostlin

4.2.1 Lipidové složení

Lipidové složení rostlinných membrán se v detailech odlišuje od opisthokontních organismů.

DIVERSITA STEROLŮ Živočišné buňky obsahují cholesterol, u hub nalezneme ergosterol, avšak u rostlin nacházíme celou paletu sterolů: sitosterol (60%), cholesterol (20%), 24-methylcholesterol (10%) a stigmasterol (Laloi et al., 2007). Rostlinnou specialitou jsou taktéž sterylglukosidy, předpokládané primery pro syntézu celulosy (Lefebvre et al., 2007). Během extrakce DRM nebyly zaznamenány proporční změny v zastoupení jednotlivých sterolů (Lefebvre et al., 2007).

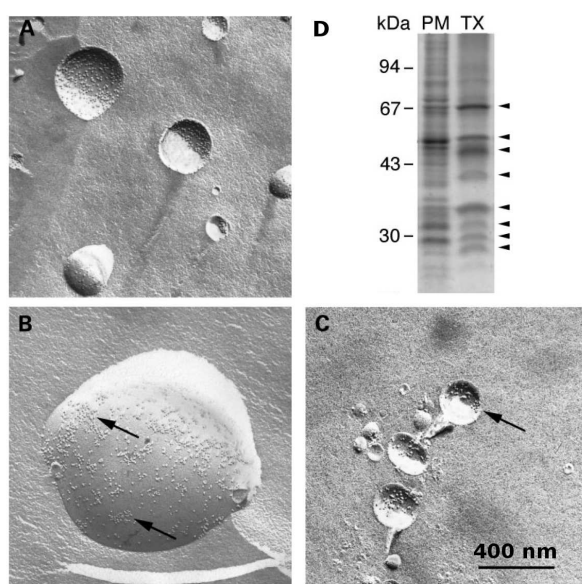
Jednotlivé steroly se mohou lišit v efektu na usprádatování membránových mikrodomén, například ergosterol silněji indukuje tvorbu domén díky planárnějšímu uspořádání polycyklu (Xu et al., 2001). Modelové membrány obsahující rostlinné steroly vykazují menší sensitivitu k teplotnímu šoku, neboť jejich fázové přechody jsou méně teplotně závislé (Beck et al., 2007).

SFINGOLIPIDY I v případě sfingolipidů nalezneme rostlinná specifika: inositolfosforylceramidy a glukosylceramidy (Laloi et al., 2007). Podrobnou analýzu provedl Markham et al. (2006).

FLAVONOIDY Nejrecentnější studie předpokládají, že mocným modulátorem membránové fluidity u rostlin by mohly být flavonoidy, známé jako antioxidanty a významné metabolické regulátory. V závislosti na počtu -OH skupin by se mohly buď interkalovat do lipidové dvojvrstvy podobně jako cholesterol, nebo vázat na hydrofilní hlavice membránových lipidů a tak zesilovat či oslabovat formaci mikrodomén (Tarahovsky et al., 2008).

4.2.2 Výsledky proteomických studií

Velmi podrobný proteomický rozbor detergentuvzdorné frakce buněk linie BY-2 provedl [Morel et al. \(2006\)](#). Celkem izoloval a identifikoval 145 proteinů. [Lefebvre et al. \(2007\)](#) studoval obdobně kořeny bobovité rostliny *Medicago truncatula* a identifikoval 270 proteinů. Výsledky lze porovnat s obecným složením plasmatické membrány ([Alexandersson et al., 2004](#); [Marmagne et al., 2004](#)). Provedené studie poskytují prozatím spíše kvalitativní obraz proteinového složení. Podrobná kvantitativní analýza obohacení jednotlivých proteinů v DRM nebyla prováděna. [Lefebvre et al. \(2007\)](#) orientačně uvádí, že v DRM frakci se nachází 12% z celkového obsahu membránových proteinů. Western-blotem zjistili konkrétně u PM H⁺-ATPasy obohacení 7× vůči rozpustné frakci plasmatické membrány. Stále však je nutné mít na paměti, že složení DRM nemusí být zcela identické s hypotetickými membránovými rafty (rev. [Munro, 2003](#)).



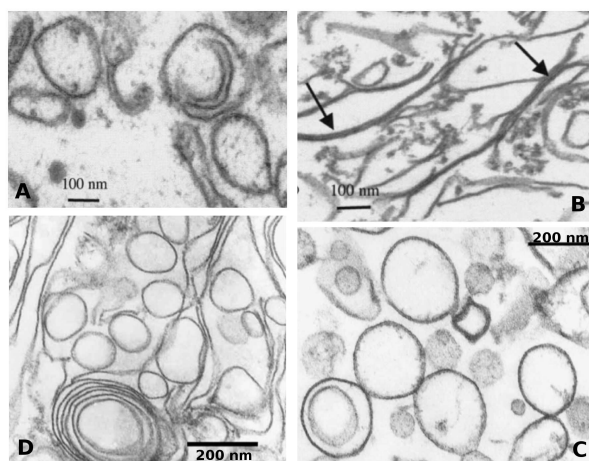
Obrázek 7: Elektronmikroskopické snímky membránových váčků po mrazovém leptání. A) výchozí plasmatická membrána B) DRM po extrakci TX-100 C) lehká frakce membrány po sonikaci a centrifugaci D) změna zastoupení proteinů (PM – výchozí plasm. membr., TX – po extrakci TX-100, stejné zastoupení proteinů bylo udajně i v sonikovaných vzorcích). Šípky ukazují agregáty proteinů (vyšší obsah v obou izolátech vůči PM). Zřejmý rozdíl velikostí váčků při odlišných extrakčních metodách. Převzato z [Peskan et al. \(2000\)](#).

4.2.3 Charakteristika izolovaných DRM

VELIKOST A STRUKTURA DRM IZOLÁTŮ [Peskan et al. \(2000\)](#) porovnávala strukturu detergentem nerozpustných membránových izolátů z tabákových listů, získaných pomocí Tritonu X-100, se strukturou produktu, který získala po rozrušení plasmatické membrány sonikací (7× 10 s, 20 W). Po ultracentrifugaci produktu sonikace na sacharosovém gradientu se plasmatická membrána rozdělila na *dvě frakce*, těžší a lehčí. Lehčí frakce se velmi podobala tritonovým DRM — oba izoláty měly shodnou hustotu. Ve srovnání s výchozí plasmatickou membránou byly obohaceny o 40–50 nm velké

klastry membránových proteinů (zjištěno elektronmikroskopicky po mrazovém leptání) a údajně se podobaly i obsahem proteinů (dle SDS-PAGE, bez identifikace). V obou případech popisuje izoláty jako vesikulární struktury, rozdílná však byla jejich *velikost*: 50–100 nm po sonikaci, avšak 100–400(-1 300) nm v DRM po extrakci Tritonem (obrázek 7). Je diskutabilní, zda se dá z velikosti takto izolovaných membránových mikrodomén usuzovat velikost raftů *in vivo*.

Poněkud odlišnou morfologii tritonových DRM popisuje [Mongrand et al. \(2004\)](#) na základě transmisní elektronové mikroskopie. Zatímco výchozí plasmatická membrána tvoří po purifikaci kolekci váčků, DRM mají charakter úzkých *proužků*, max. 100 nm širokých a dlouhých až několik μm , které tvoří stužkovitou síť (obrázek 8; nahoře). Vzorky fixoval glutaraldehydem.



Obrázek 8: **Struktura DRM získaná pomocí transmisního elektronového mikroskopu.** Nahoře – fixace glutaraldehydem: A) výchozí plasmatická membrána – váčky B) DRM po extrakci TX-100 – lamely. Šípky ukazují místa adheze jednotlivých lamel. Převzato z [Mongrand et al. \(2004\)](#).

Dole – kryofixace C) výchozí plasmatická membrána D) DRM po extrakci TX-100. Převzato z [Lefebvre et al. \(2007\)](#).

Morfologii DRM zkoumal pomocí transmisní elektronové mikroskopie i [Lefebvre et al. \(2007\)](#) na kořenech tolice *Medicago truncatula*. Srovnával dva způsoby přípravy vzorku — chemickou fixací pomocí glutaraldehydu a vysokotlakou kryofixací. Výchozí plasmatická membrána se opětjevila jako kolekce váčků, které měly dokonalejší kulovitý tvar v preparátech připravených kryofixací. Ještě výraznější rozdíl obdržel u preparátů DRM, kdy chemická fixace způsobovala rozpad a segregaci proteinových shluků, kdežto kryofixované vzorky obsahovaly kompaktní membránové lístky s větším zastoupením sférických útvarů, často cibulovitě vrstvených, tvarově bližších pozorování, které provedla [Peskan et al. \(2000\)](#). Kryofixace se zdá být šetrnější metodou přípravy preparátů (obrázek 8; dole).

4.3 Funkce lipidových raftů u rostlin

Po metodické a obecné části nyní následuje stručný nástin procesů, ve kterých by mohly být lipidové rafty u rostlin zainteresovány. Výběr témat vychází z proteomických studií

detergentuvzdorných membrán, snaží se přiblížit funkci nejvýznamnějších proteinů, které byly identifikovány v DRM. Prací zabývajících se explicitně jejich funkcí v souvislosti s lipidovými rafty zatím není mnoho.

4.3.1 Lipidové rafty a polarisovaný transport

Koncepce lipidových raftů vytvořená u živočichů předpokládá jejich klíčovou roli pro polarisaci buňky. Nabízí se otázka, zda lze i u rostlin najít obdobu raftového polárního transportu. [Laloi et al. \(2007\)](#) izolovali DRM frakci i z Golgiho aparátu a její lipidové složení odpovídalo DRM z plasmatické membrány. Pokud částečně inhibovali syntézu sterolů, hromadily se DRM tvořené sterolovými prekurzory v Golgiho aparátu, což nasvědčuje, že i u rostlin budou rafty fungovat v průběhu exocytosy.

Podobně jako živočišné buňky, jsou i rostlinné výrazně polarisovány. Zatímco živočišný organismus se zakládá převážně dvourozměrně (listy ektodermu a entodermu) a velký morfogenní význam mají migrace různých populací buněk, vývin rostlin se od embryonální fáze odehrává ve třech rozměrech, přičemž buňky zaujímají statickou pozici. Například množství rostlinných SNARE proteinů nasvědčuje, že polarisace rostlinných buněk bude složitější než u živočichů ([Sanderfoot, 2007](#)).

APIKÁLNÍ, BASÁLNÍ, LATERÁLNÍ. . . Polarise rozděljuje membránu rostlinné buňky minimálně na tři části: například u kořenového protofloemu lze rozlišit *apikální* část buňky vyznačující se auxinovou permeasou AUX1 ([Swarup et al., 2001](#)), *basální* dle lokalise auxinového vynašeče PIN1 ([Galweiler et al., 1998](#)) a *laterální* vyznačující se přítomností proteinu COBRA ([Schindelman et al., 2001](#)). V různých pletivech se však funkce jednotlivých membránových domén liší (např. v souvislosti s tokem auxinu, [Palme & Galweiler \(rev. 1999\)](#)). Speciálním případem pak jsou apikálně rostoucí struktury – kořenový vlásek a pylová láčka (rev. [Hepler et al., 2001](#)).

LIPIDOVÉ RAFTY A ROP Polarise buňky je výsledkem dynamické rovnováhy mezi exo- a endocytosou. Malé rostlinné GTPasy ROP, členky Rho rodiny GTPas, jsou lokalizované na plasmatické membráně a vymezují místa polarisované exocytosy (rev. [Yang & Fu, 2007](#)). Aktivovaná ROP GTPasa slouží jako základ pro tvorbu komplexu exocystu ([Lavy et al., 2007](#); [Hala et al., 2008](#)), který zajišťuje zachycení váčku poblíž membrány. Potom následuje splynutí váčku s membránou asistované SNARE proteiny. Nezodpovězena však stále zůstává otázka, jakým mechanismem je řízena distribuce ROP GTPas. Recentní výsledky ukazují, že i zde by mohly hrát roli lipidové rafty. GTPasa ROP6 je v membráně ukotvena prenylací, avšak v aktivním stavu při navázání GTP je navíc S-acetylována palmitoylací. [Sorek et al. \(2007\)](#) recentně dokázal, že aktivace provázená S-acetylací vede k přesunu molekuly z neraftové do detergentuvzdorné frakce membrány. Význam S-acetylce byl dříve objeven i u živočišných Ras GT-

Pas. V rostlinném výzkumu je velmi perspektivní kapitolou (rev. [Hemsley & Grierson, 2008](#)).

SNARE PROTEINY Řídí konečný krok splývání transportního váčku s cílovými membránami. Nalezneme je od endoplasmatického retikula až po plasmatickou membránu. Růst počtu SNARE proteinů koreluje s mnohobuněčností a tím pádem diversifikací buněčných typů ([Sanderfoot, 2007](#)). Největší diversitu nalézáme u rostlin (54 proteinů u *Arabidopsis*, [Uemura et al. \(2004\)](#), [Pratelli et al. \(rev. 2004\)](#)).

S rostlinnou plasmatickou membránou *Arabidopsis thaliana* je spojeno 18 t- a v-SNARE. Proteomické analýzy celé plasmatické membrány dokládají přítomnost SYP 71, 121, 122 a 123, α -SNAP, NPSN 13 a VAMP 722 ([Alexandersson et al., 2004](#); [Marmagne et al., 2004](#)), kdežto analýzy zamerané na detergentuvzdornou frakci uvádějí SYP 71, 121 a 131, NPSN 12, α -SNAP a NSF-1 ([Morel et al., 2006](#); [Mongrand et al., 2004](#)). Podrobnější studie funkcí potenciálních raftových SNARE (odoba živočišného syx3, kap. 3.3.3) však zatím nebyly prováděny, lokalisace pomocí GFP byla zjišťována pouze v protoplastech ([Uemura et al., 2004](#)).

KLASTRY SNARE A KAT 1 Draslíkový kanál KAT 1 se na plasmatické membráně vyskytuje v imobilních klastrech, pro jejichž tvorbu je nezbytný SYP 121, součást komplexu t-SNARE ([Sutter et al., 2006](#)). Tento objev dokládá význam různých typů SNARE pro polarisovaný transport, avšak souvislost s rafty není jasná, neboť například exocytosa membránové PMA2 H^+ -ATPasy, jež se prokazatelně vyskytuje v detergentuvzdorné membránové fázi ([Morel et al., 2006](#)), není ovlivněna cíleným poškozením SYP 121. Interpretaci výsledků ztěžuje riziko potenciálních artefaktů plynoucích z overexprese transgenního KAT 1, který se pod přirozeným promotorem vyskytuje tak řídko, že není možná přímá GFP visualisace či jeho detekce v DRM ([Sutter et al., 2006](#)).

4.3.2 Rafty a transport auxinu

Usměrněný tok auxinu je nejdůležitějším morfogenním faktorem při vývoji rostliny. Transport auxinu přes plasmatickou membránu zajišťují jak pasivní přenašeče (AUX1, PIN), tak i aktivní (PGP) využívající energii hydrolýzy ATP. PGP patří do skupiny ABC transportérů (ATP-binding-cassette) a prokazatelně se vyskytují v detergentuvzdorné raftové frakci membrány ([Borner et al., 2005](#)). Výsledky experimentů poukazují na skutečnost, že PGP transportéry tvoří raftově vázané komplexy s přenašeči PIN a společně umožňují velmi precizní regulaci auxinového toku (rev. [Bandyopadhyay et al., 2007](#)).

Dalším zajímavým tématem je polarisovaný váčkový transport PIN proteinů. Ukazuje se, že apikální a basální transport zajišťují nezávislé dráhy. Basální transport je citlivý k brefeldinu A a je řízen proteinem GNOM (který funguje jako GEF, guanine exchange faktor, janz aktivuje ARF protein, iniciátor pučení transportního váčku), kdežto

apikální protein není ovnivňován brefeldinem ani mutací *gnom* (Kleine-Vehn et al., 2008). V existenci více transportních drah můžeme spatřovat paralelu s exocytosou u epitelových buněk, avšak souvislost s rafty v tomto případě nebyla zatím studována.

4.3.3 Intrakce raftů s cytoskeletem

ANNEXINY Annexiny tvoří rodinu proteinů, které mohou přímo interagovat s fosfolipidy, steroly či fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem cytosolického listu plasmatické membrány prostřednictvím vazby iontu Ca^{2+} . Annexiny současně váží aktinová filamenta a zprostředkovávají tak velmi dynamickou interakci mezi membránou a cytoskeletem, regulovatelnou hladinou Ca^{2+} . Předpokládá se, že by annexiny mohly podporovat klastrování malých lipidových raftů ve velké signální platformy, budoucí studie jistě přinesou mnoho cenných informací (rev. Konopka-Postupolska, 2007)

REMORIN Remorin (33 kDa) je jedním z nejabundantnějších proteinů detergentuvzdorné membránové frakce a používá se jako marker DRM (Laloi et al., 2007). Jeho funkce však takřka neznáme. Exprimuje se v diferencujících se pletivech a je lokalizován ostrůvkovitě v plasmatické membráně. Je schopen tvořit oligomerní vlákna, což nasvědčuje, že by mohl fungovat jako raftový skeletální systém (Bariola et al., 2004). Remoriny tvoří rodinu specifickou pro suchozemské rostliny (Raffaele et al., 2007), jejíž výzkum zřejmě přinese mnoho zajímavých poznatků.

4.3.4 GPI-kotvené proteiny a správa buněčné stěny

Asociace GPI-kotvených proteinů s lipidovými rafty patří k nejdéle známým vlastnostem živočišných raftů a tudíž si zaslouží větší pozornost i u rostlin. Z lokalisace GPI-kotvených proteinů na vnější straně plasmatické membrány vyplývá, že jejich základní funkce bude spočívat v komunikaci s buněčnou stěnou a mohou též zprostředkovávat obranu před patogeny. Nejpočetněji jsou zastoupeny arabinogalaktanové proteiny, lipidové transferasy, β -1,3-glukanasy, fytocyaniny, COBRA a různé proteasy. Díky rozsáhlým genomickým studiím známe v současné době u *Arabidopsis* 248 genů potenciálních GPI-kotvených proteinů (čili 0,8% z celkem 25,5 tis. genů, Borner (2002), Borner et al. (2003)). Eisenhaber (2003) identifikovala modifikovaným algoritmem u *Arabidopsis* 187 proteinů a 202 u rýže.²

Borner et al. (2003) provedl následně komplexní analýzu GPI proteinů z kalusové kultury *Arabidopsis thaliana*. Extrakcí TX-114 (kapitola 4.1.2) izoloval a identifikoval 30 GPI-kotvených proteinů. Elortza et al. (2003) izoloval obdobnou metodou ze stejného materiálu 44 proteinů. GPI proteiny lze získat i z detergentuvzdorné frakce po extrakci

²On-line nástroj na predikci GPI na adrese <http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/plants/gpi-plants.html>

TX-100, avšak ve výrazně menší diversitě (jak u rostlin, tak živočichů maximálně 6 proteinů (Elortza et al., 2003; Morel et al., 2006; Lefebvre et al., 2007)).

COBRA REGULUJE UKLÁDÁNÍ CELULOSY Klíčová role proteinu COBRA je zřejmá z fenotypu jeho mutantů – nejsou schopny elongačního růstu a výrazně tloustnou, především v kořenové části (Schindelman et al., 2001). COBRA se exprimuje ve všech elongujících se částech rostliny a naopak není detekovatelná v meristémech (Roudier et al., 2005). Nejzajímavější je však její subcelulární lokalizace, COBRA se vyskytuje klastrovaně v pásech výhradně na laterální straně buňky, jejichž orientace sleduje kortikální mikrotubuly (běžící kolmo k podélné ose buňky). COBRA přímo řídí ukládání celulosních mikrofibril a zajišťuje jejich tranverzální orientaci nezbytnou pro dlouhivý růst. Krom GPI-kotvené membránové formy se COBRA vyskytuje i volně ve stěně po odštěpení neznámou fosfoinositolovou lipázou (Roudier et al., 2005).

Podrobný mechanismus interakce mikrotubulů a mikrofibril prostřednictvím proteinu COBRA není objasněn (rev. Wasteneys & Fujita, 2006). Roudier et al. (2005) předpokládá, že by COBRA regulovala délku vznikající mikrofibrily. Mimo GPI kotvy a N-glykosylované domény obsahuje COBRA i vazebné místo s afinitou k celulose a doménu schopnou poutat kovový iont, jež může mít redoxní funkci (Roudier et al., 2002, 2005).

Zástupci proteinové rodiny COBRA-like jsou specifictí pro rostliny a nemají homology u jiných eukaryot (Roudier et al., 2002). Protein COBL4 slouží k predispozici druhotného tloustnutí buněčné stěny. Exprimuje se u semenáčků v prvním a druhém týdnu a jeho mutace *Brittle stalk2* se projevuje náhlým zkrěhnutím prýtu semenáčků ve 4. týdnu, způsobeném defektem buněčné stěny, který je kompenzován nadměrnou lignifikací (Sindhu et al., 2007). Protein COBL9 byl identifikován jako jeden z šesti genů esenciálních pro vrcholový růst kořenových vlásků (Jones et al., 2006). Komplexní přehled lokalizace proteinů COBL u *Arabidopsis*, rýže a kukuřice podává Brady et al. (2007). Defekty buněčné stěny vyvolané *cob* mutacemi vedou k aktivaci ethylenových a jasmonátových signálních drah obdobně jako při biotickém stresu (Ko et al., 2006).

SKU5 A PŘÍBUZNÉ PROTEINY Devatenáctičlenná rodina obsahuje proteiny příbuzné obecně rozšířeným 'multicopper' oxidázám, jež plní funkci redoxních regulátorů v buněčné stěně. Oxidují askorbát, jsou klíčové při lignifikaci, ve vývojových i obranných procesech (Jacobs & Roe, 2005). GPI kotva je přítomna pouze u SKS1, SKS2 a SKU5 (Borner et al., 2003). Typickým fenotypem mutantu *sku5* je nadměrné zkrucování kořenů při růstu na tuhém skloněném agaru. Zkrucování je součtem gravitropické ohybové reakce s rotací kořenové špičky při snaze penetrovat médium, na buněčné úrovni se projevuje ohýbáním především epidermálních buněk proti směru hodinových ručiček. Protein SKU5 se vyskytuje především v elongační zoně a to jak vázaný k membráně, tak i volně ve stěně a nebyla u něj pozorována žádná polarizace ani klastrování.

Mechanismus jeho působení není zatím znám, spekuluje se, že by mohl rozvolňovat střední lamelu a umožňovat tak vzájemné klouzání buněk při ohýbání a zkrucování (Sedbrook et al., 2002). Nedávná studie odhalila, že protein SKU5 je schopen vázat ABP1 (auxin-binding protein) a tak být přímo regulován auxinem (Shimomura, 2006), mohl by tedy sloužit jako modifikátor buněčné stěny při elongaci stimulované auxinem.

β -1,3-GLUKANÁZY Padesát členů této rodiny se vyznačuje schopností štěpit β -1,3-glykosidickou vazbu, jež se uplatňuje v metabolismu kalosy, ale i při obraně proti houbám (degradují jejich buněčné stěny). V rámci rodiny lze vymezit skupiny fungující výhradně při mikrosporogenezi a při růstu pylové láčky. GPI kotva je predikována přibližně u poloviny proteinů, jež se předpokládají jako ancestrální a nebývají výrazněji tkáňově specifické (Doxey et al., 2007).

ARABINOGALAKTANOVÉ PROTEINY Veliká a diversifikovaná rodina GPI-kotvených proteinů vyznačujících se přítomností silně glykosylovaných hydroxyprolinových domén (Schultz et al., 2002, 2000; Gaspar et al., 2001). Sacharidová složka může tvořit přes 90% hmotnosti proteinu. Přesné funkce konkrétních proteinů jsou prakticky neznámé, opět však budou souviset s buněčnou stěnou, vývojovými procesy a signalisací. Podrobněji byl například charakterisován AGP18 (Yang & Showalter, 2007).

Fascicliny tvoří podrodinu arabinogalaktanových proteinů hojně zastoupenou u všech eukaryot. U živočichů zastávají adhezní funkci a obdobný účel se předpokládá i u rostlin (Johnson et al., 2003; Faik et al., 2006). AtFLA4, jehož mutace *sos5* se projevuje tloušťnutím kořene při solném stresu, je důležitý pro funkčnost střední laminy (Shi et al., 2003). Naproti tomu FLA11 reguluje tvorbu sekundární buněčné stěny (při vývoji sklerenchymu *Arabidopsis* (Ito et al., 2005) či xylemu zinnie (Dahiya et al., 2006)).

OSTATNÍ Z dalších GPI-kotvených proteinů jmenujme jen stručně proteázy (remodelace stěny), lipid-transferové proteiny (vazba lipidů a jejich přenos hydrofilní buněčnou stěnou; podílejí se na ukládání kutinu, ale i na obranných reakcích a adhezi pylu) a receptor-like proteiny (nesou doménu homologní s receptor-like kinázami, ale postrádají transmembránovou doménu; fungují při oxidačním stresu a obranných reakcích) (rev. Börner, 2002).

4.3.5 Membránový transport vázaný na rafty

AQUAPORINY A H^+ -ATPASY Membránové transportéry patří k nejhojnějším proteinům detergentuvzdorné frakce. Plasmalemové protonové PMA H^+ -ATPasy jsou v DRM 7 \times obohaceny ve srovnání s průměrem plasmatické membrány (Lefebvre et al., 2007). DRM hostí taktéž 14-3-3 protein, ústřední regulátor H^+ -ATPas. Z přítomnosti aquaporinů lze usuzovat na význam lipidových raftů při transportu vody do buňky.

HEXOSOVÝ TRANSPORTÉR Nehomogenní distribuce je velmi dobře prozkoumána u

proton-hexosového symportéru HUP1 z kokální řasy *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae), který slouží k příjmu sacharidů. Klastrování transportéru bylo studováno po přenesení jeho genu s GFP do kvasinky a opět je závislé na přítomnosti sterolů v membráně. Velmi zajímavé je, že v kvasince se vyskytují dva typy raftových domén, jedna je typická přítomností H⁺-ATPasy Pma1p, s druhou jsou asociovány různé H⁺ symportéry včetně transgenního HUP1-GFP. Klastrování a raftová asociace HUP1 přímo v řase bylo demonstrováno fluorescenčními protilátkami a detergentuvzdorností proteinu (Grossmann et al., 2006).

4.3.6 Rafty v obranných a symbiotických interakcích

Podobně jako u živočichů, i u rostlin se předpokládá, že by mohly lipidové rafty zprostředkovávat obranné reakce.

RAFTOVĚ VÁZANÝ REDOXNÍ SYSTÉM Nejrecentnější proteomická analýza detergentuvzdorné membránové frakce byla provedena na kořenovém materiálu *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007) a ve srovnání s předchozími experimenty bylo v kořenech detekováno výrazně více proteinů s redoxní funkcí. Lipidové rafty kořenových buněk hostí například NADH-ubiquinone oxidoreduktázy, cytochrom b561 a askorbát oxidázu. Redoxní systém je odpovědný za produkci reaktivních forem kyslíku, které jsou nezbytné ke tvorbě buněčné stěny a taktéž figurují v obranných reakcích proti patogenům. V případě bobovitých rostlin je tento poznatek zvláště zajímavý, lipidové rafty by mohly hrát roli při regulaci rhizobiální symbiosy.

LEUCINOVÉ KINÁZY 'Receptor-like' kinázy tvoří velikou heterogenní rodinu. Například u *Arabidopsis* bylo předpovězeno 600 kináz a u rýže existuje dokonce 1 200 kináz, přičemž vznik některých je prokazatelně produkt symbiosy s člověkem, neboť nejsou starší než 10 000 let. Kinázy s leucinovými repetitivy (LRR-RLK) tvoří podrodinu, jejíž členové jsou významní regulátoři růstu a vývoje (CLAVATA1, BRI1), ale i zprostředkovatelé obranných reakcí. Právě řada z nich byla identifikována v detergentuvzdorné frakci (Shahollari et al., 2004; Lefebvre et al., 2007). V DRM byl také nalezen protein pii-2, homolog LRR-RLK, avšak bez kinázové domény, který je klíčový pro mykorhizní symbiosu *Arabidopsis thaliana* a stopkovýtrusé houby *Piriformospora indica* (Shahollari et al., 2007).

SYNTÉZA KALOSY Raftovou lokalizaci můžeme očekávat i u komplexu syntetizujícího kalosu, jehož podjednotky byly nalezeny v DRM (Morel et al., 2006). Produkce kalosy je opět součástí obranných reakcí.

5 Závěrečné shrnutí

V první části práce jsem se pokusil shrnout hlavní experimentální doklady existence lipidových raftů.

Prvním předpokladem existence lipidových raftů byla existence membránových mikrodomén. Experimenty i teoretické studie jednoznačně dokládají vzájemnou segregaci různých typů lipidů a tvorbu mikrodomén uspořádané l_o (sfingolipidy) a neuspořádané l_d fáze (fosfolipidy) v modelových membránových dvojvrstvách. Podobně jsou doloženy rozdílné preference membránových proteinů k uspořádanému či neuspořádanému prostředí, které jsou dány buď charakterem membránové kotvy (GPI a palmitoylové kotvy upřednostňují l_o , kdežto prenylové a oleylové kotvy inklinují k l_d fázi) nebo délkou transmembránové domény (dvojvrstva sfingolipidové fáze l_o má větší tloušťku než l_d).

Slabší argumenty již nalezneme pro obhajobu existence membránových mikrodomén *in vivo*. Nepřímým důkazem je částečná nerozpustnost membrány v 1% detergentu Triton X-100 při 4°C. Získaná detergentuvzdorná frakce je obohacena sfingolipidy a potenciálními raftovými proteiny a předpokládá se, že je pozůstatkem uspořádaných membránových mikrodomén. Samotná detergentuvzdornost je však pouze důkazem odlišné afinity proteinů k různým fázím. K vlastnímu oddělení rozpustné a nerozpustné fáze může nastávat z části vlivem detergentu a nízké teploty a nemusí odrážet přirozený stav membrány (poměr l_o a l_d fáze).

Nevyřešeným problémem také zůstává raftový popis vnitřního (cytoplasmatického) listu membrány, který takřka neobsahuje sfingolipidy. Řada proteinů vázaných na vnitřní stranu membrány (např. palmitoylované kinázy) se vyskytuje v detergentuvzdorné frakci, mechanismy tvorby domén uspořádané fáze na vnitřní straně membrány a jejich komunikace s opačnou stranou membrány však stále nejsou spolehlivě objasněny (jedna z hypotéz vysvětluje přenos doménového uspořádání interdigitací dlouhých acylových řetězců sfingolipidů z vnějšího listu membrány do vnitřního fosfolipidového). Proteiny cytoplasmatické strany membrány se mohou do detergentuvzdorného komplexu dostat při fragmentaci membrány detergentem, kdy dochází k mísení lipidů obou membránových listů a tvorbě nových mikrodomén.

Přímější důkazy existence mikrodomén a jejich asociace s raftovými proteiny pocházejí z fluorescenčních pozorování a metod FRAP, FRET či 'laser trap'. I tyto přístupy jsou však zatíženy některými artefakty (fluorescenčně značené protilátky podporují klastrování a podobný vliv má i overexprese vnesených značených proteinů, která způsobuje nepřirozené zastoupení proteinů v membráně).

Připustíme-li existenci membránových domén v nativní membráně, můžeme přejít

k vlastní koncepci lipidových raftů, která se pokouší vysvětlit polarisaci buňky a tvorbu membránových signálních platforem na základě spontánní tvorby lipidových mikrodomén (raftů), které následně sdružují specifické proteiny dle jejich afinity k uspořádané či neuspořádané fázi membrány. Antithese k lipidovým raftům naopak předpokládá, že výchozím hybatelem tvorby mikrodomén je interakce lipidů s proteiny a centrem polarisace je cytoskelet.

Z funkcí jež jsou připisovány lipidovým raftům u živočichů je třeba zmínit třídění proteinů pro polarisovaný apikální váčkový transport v buňkách epitelů. Nedávné výzkumy však ukazují, že raftová asociace není dostačující a předpokládá se existence paralelních neraftových drah. Dále rafty figurují v endocytose vázané na kaveoly a v souvisejícím vstupu patogenů do buňky. V neposlední řadě pak rafty slouží v signalisaci, kdy raftová asociace umožňuje shlukování jednotlivých partnerů signální dráhy.

U rostlin nacházíme obdoby řady živočišných funkcí lipidových raftů. Raftově řízená polarisace rostlinných buněk by mohla být zprostředkovávána duálně acylovanými Rop GTPasami, které po aktivaci získávají afinitu k uspořádané membránové fázi. Hlavní funkce rostlinných lipidových raftů by zřejmě mohla spočívat v regulaci vlastností buněčné stěny skrze GPI-kotvené proteiny. Nejdůkladněji prozkoumaným rostlinným GPI proteinem je COBRA, která vnáší nové světlo do záhady paralelního uspořádání mikrotubulů a celulosových mikrofibril. Jiný GPI-kotvený protein, SKU5, ovlivňuje elongaci buněk a pravděpodobně je pod přímým vlivem auxinu, který váže prostřednictvím ABPI proteinu. Samotný transport auxinu také souvisí s lipidovými rafty. Auxinové vnašeče PGP patří do rodiny ABC transportérů, u nichž je dokázána raftová asociace. PGP proteiny interagují s přenašeči PIN a společně zajišťují přenos auxinu přes plasmatickou membránu. Transportní funkci zastává řada dalších raftových proteinů – nejpočetnější jsou aquaporiny a PMA H⁺-ATPasy. Na závěr je třeba zmínit roli lipidových raftů v obranné reakci rostlin: GPI-kotvené β -1,3-glukanázy jsou schopny štěpit buněčnou stěnu patogenních hub, leucinové kinázy (LRR-RLK) zajišťují stresovou signalisaci. Sekundárně se jejich funkce přenesla na regulaci symbiotických interakcí (mykorhizní a rhizobiální).

Lipidové rafty jsou významné pro řadu dějů odehrávajících se v rostlinné buňce. Jejich studium nám může napomoci k pochopení základních mechanismů morfogeneze a diferenciaci rostliny a přiblížit podstatu reakcí rostliny na podněty z prostředí, patogeny počínající, symbiotickými interakcemi končící.

Literatura

- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C. & Kjellbom, P. (2004). Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant and Cell Physiology*, 45(11):1543–1556.
- Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J. J., Lee, O. R., Mravec, J., Sauer, M., Titapiwatanakun, B., Makam, S. N., Bouchard, R., Geisler, M., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W. A. & Murphy, A. S. (2007). Interactions of pin and pgp auxin transport mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 35:137–141.
- Bariola, P. A., Retelska, D., Stasiak, A., Kammerer, R. A., Fleming, A., Hijri, M., Franks, S. & Farmer, E. E. (2004). Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Molecular Biology*, 55(4):579–594.
- Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S. & Dufourc, E. J. (2007). Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *Faseb Journal*, 21(8):1714–1723.
- Borner, G. H. H. (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in arabidopsis. a genomic analysis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 129(2):486–499.
- Borner, G. H. H., Lilley, K. S., Stevens, T. J. & Dupree, P. (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in arabidopsis. a proteomic and genomic analysis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 132(2):568–577.
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. & Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in arabidopsis. evidence for plasma membrane lipid rafts. *PLANT PHYSIOLOGY*, 137(1):104–116.
- Brady, S. M., Song, S., Dhugga, K. S., Rafalski, J. A. & Benfey, P. N. (2007). Combining expression and comparative evolutionary analysis. the cobra gene family. *PLANT PHYSIOLOGY*, 143(1):172–187.
- Browman, D. T. (2006). Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the er. *Journal of Cell Science*, 119(15):3149–3160.
- Brown, D. A. (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology*, 21:430–439.
- Brown, D. A. & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14:111–136.
- 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(3):533–544.
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T. & Krasslich, H. G. (2006). The hiv lipidome: A raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8):2641–2646.
- Brugger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J. B., Lehmann, W. D., Nickel, W. & Wieland, F. T. (2000). Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of copicoated vesicles. *Journal of Cell Biology*, 151(3):507–517.
- Butikofer, P. (2001). Gpi-anchored proteins: now you see 'em, now you don't. *Faseb Journal*, 15(2):545–548.
- Cheong, K. H., Zacchetti, D., Schneeberger, E. E. & Simons, K. (1999). Vip17/mal, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in mdck cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11):6241–6248.
- Dahiya, P., Findlay, K., Roberts, K. & McCann, M. C. (2006). A fasciclin-domain containing gene, zefla11, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of zinnia elegans cv envy. *Planta*, 223(6):1281–1291.

- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A. & Jacob, R. (2007). Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic*, 8(4):379–388.
- Delacour, D. & Jacob, R. (2006). Apical protein transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21):2491–2505.
- Doxey, A. C., Yaish, M. W. F., Moffatt, B. A., Griffith, M. & McConkey, B. J. (2007). Functional divergence in the arabidopsis beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*, 24(4):1045–1055.
- Eddidin, M. (2003). The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32:257–283.
- Eisenhaber, B. (2003). Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for arabidopsis and rice. *PLANT PHYSIOLOGY*, 133(4):1691–1701.
- Elortza, F., Nuhse, T. S., Foster, L. J., Stensballe, A., Peck, S. C. & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(12):1261–1270.
- Faik, A., Abouzouhair, J. & Sarhan, F. (2006). Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (fla) in wheat (*triticum aestivum*) and rice (*oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(5):478–494.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. & Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*, 99(2):189–198.
- Friedrichson, T. & Kurzchalia, T. V. (1998). Microdomains of gpi-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, 394(6695):802–805.
- Fullekrug, J. & Simons, K. (2004). *Lipid rafts and apical membrane traffic*.
- Galweiler, L., Guan, C. H., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by atpin1 in arabidopsis vascular tissue. *Science*, 282(5397):2226–2230.
- Gaspar, Y., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A. & Schultz, C. J. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2):161–176.
- Giocondi, M. C., Vie, V., Lesniewska, E., Goudonnet, J. P. & Le Grimmelc, C. (2000). In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 131(1):38–43.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. & De Matteis, M. A. (2004). Fapps control golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to arf and ptdins(4)p. *Nature Cell Biology*, 6(5):393–+.
- Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J. & Tanner, W. (2006). Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5(6):945–953.
- Gurkan, C., Koulov, A. V. & Balch, W. E. (2007). An evolutionary perspective on eukaryotic membrane trafficking. *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution*, 607:73–83.
- Hala, M., Cole, R., Synek, L., Drdova, E., Pecenkova, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J. E. & Zarsky, V. (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in arabidopsis and tobacco. *THE PLANT CELL*, 20(5):1330–1345.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophysical Journal*, 83(5):2693–2701.
- Hemsley, P. A. & Grierson, C. S. (2008). Multiple roles for protein palmitoylation in plants. *Trends in Plant Science*, 13(6):295–302.

- Hepler, P. K., Vidali, L. & Cheung, A. Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:159–187.
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (gpi)-anchored proteins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(4):409–417.
- Ito, S., Suzuki, Y., Miyamoto, K., Ueda, J. & Yamaguchi, I. (2005). Atfla11, a fasciclin-like arabinogalactan-protein, specifically localized in sclerenchyma cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69:1963–1969.
- Jacobs, J. & Roe, J. L. (2005). Sks6, a multicopper oxidase-like gene, participates in cotyledon vascular patterning during arabidopsis thaliana development. *Planta*, 222(4):652–666.
- Johnson, K. L., Jones, B. J., Bacic, A. & Schultz, C. J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of arabidopsis. a multigene family of putative cell adhesion molecules. *PLANT PHYSIOLOGY*, 133:1911–1925.
- Jones, M. A., Raymond, M. J. & Smirnov, N. (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in arabidopsis. *Plant Journal*, 45(1):83–100.
- Kenworthy, A. K., Nichols, B. J., Rimmert, C. L., Hendrix, G. M., Kumar, M., Zimmerberg, J. & Lippincott-Schwartz, J. (2004). Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *Journal of Cell Biology*, 165(5):735–746.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P. B., Wisniewska, J., Paciorek, T., Benkova, E. & Friml, J. (2008). Arf dependent transcytosis and polar delivery of pin auxin carriers in arabidopsis. *Current Biology*, 18(7):526–531.
- Ko, J. H., Kim, J. H., Jayanty, S. S., Howe, G. A. & Han, K. H. (2006). Loss of function of cobra, a determinant of oriented cell expansion, invokes cellular defence responses in arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 57(12):2923–2936.
- Konopka-Postupolska, D. (2007). Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells. *Protoplasma*, 230(3-4):203–215.
- Lajoie, P. (2007). Regulation of raft-dependent endocytosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4):644–653.
- Laloi, M., Perret, A. M., Chatre, L., Melsner, S., Cantrel, C., Vaultier, M. N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J. M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M. A. & Moreau, P. (2007). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *PLANT PHYSIOLOGY*, 143(1):461–472.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H. & Yalovsky, S. (2007). A novel rop/rac effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Current Biology*, 17(11):947–952.
- Lawrence, J. C., Saslowsky, D. E., Edwardson, J. M. & Henderson, R. M. (2003). Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 84(3):1827–1832.
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M. A., Michelson, L. V., Carde, J. P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J. A., Cullimore, J., Bessoule, J. J. & Mongrand, S. (2007). Characterization of lipid rafts from medicago truncatula root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *PLANT PHYSIOLOGY*, 144(1):402–418.
- Lin, W. C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V. & Longo, M. L. (2006). Lipid asymmetry in dlpc/dspc-supported lipid bilayers: A combined afm and fluorescence microscopy study. *Biophysical Journal*, 90(1):228–237.
- Low, S. H., Vasanthi, A., Nanduri, J., He, M., Sharma, N., Koo, M., Drazba, J. & Weimbs, T. (2006). Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Molecular Biology of the Cell*, 17(2):977–989.

- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. & Jaworski, J. G. (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32):22684–22694.
- Marmagne, A., Rouet, M. A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. & Ephritikhine, G. (2004). Identification of new intrinsic proteins in arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(7):675–691.
- Mayor, S. & Maxfield, F. R. (1995). Insolubility and redistribution of gpi-anchored proteins at the cell-surface after detergent treatment. *Molecular Biology of the Cell*, 6(7):929–944.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. & Bessoule, J. J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton x-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35):36277–36286.
- Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J. J., Blein, J. P. & Simon-Plas, F. (2006). Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Molecular Cellular Proteomics*, 5(8):1396–1411.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell*, 115(4):377–388.
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C. A. O., Herzog, V. & Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*, 378:509–518.
- Nichols, B. J. (2003). Gm1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Current Biology*, 13(8):686–690.
- Paladino, S. (2002). Detergent-resistant membrane microdomains and apical sorting of gpi-anchored proteins in polarized epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(6-7):439–445.
- Palme, K. & Galweiler, L. (1999). Pin-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5):375–381.
- Parton, R. G. & Richards, A. A. (2003). Review lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: New insights and common mechanisms. *Traffic*, 4(11):724–738.
- Peskan, T., Westermann, M. & Oelmuller, R. (2000). Identification of low-density triton x-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 267(24):6989–6995.
- Pralle, A. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 148(5):997–1007.
- Pratelli, R., Sutter, J. U. & Blatt, M. R. (2004). A new catch in the snare. *Trends in Plant Science*, 9(4):187–195.
- Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A. & Ott, T. (2007). Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. *PLANT PHYSIOLOGY*, 145(3):593–600.
- Rajendran, L. & Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*, 118(6):1099–1102.
- Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Malaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the spfh domain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(3):343–357.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelsbach, R., Borner, G. H. H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T. I., Dupree, P., Wasteneys, G. O. & Benfey, P. N. (2005). Cobra, an arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *THE PLANT CELL*, 17(6):1749–1763.
- Roudier, F., Schindelman, G., DeSalle, R. & Benfey, P. N. (2002). The cobra family of

- putative gpi-anchored proteins in arabidopsis. a new fellowship in expansion. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130:538–548.
- Sanderfoot, A. (2007). Increases in the number of snare genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 144(1):6–17.
- Saslowky, D. E., Lawrence, J., Ren, X. Y., Brown, D. A., Henderson, R. M. & Edwardson, J. M. (2002). Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30):26966–26970.
- Scheiffele, P., Peranen, J. & Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial-cells. *Nature*, 378(6552):96–98.
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbys-hire, P., McCann, M. C. & Benfey, P. N. (2001). Cobra encodes a putative gpi-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in arabidopsis. *Genes and Development*, 15(9):1115–1127.
- Schroeder, R., London, E. & Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (gpi)-anchored proteins - gpi-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25):12130–12134.
- Schultz, C. J., Johnson, K. L., Currie, G. & Bacic, A. (2000). The classical arabinogalactan protein gene family of arabidopsis. *THE PLANT CELL*, 12(9):1751–1767.
- Schultz, C. J., Rumsewicz, M. P., Johnson, K. L., Jones, B. J., Gaspar, Y. M. & Bacic, A. (2002). Using genomic resources to guide research directions. the arabinogalactan protein gene family as a test case. *PLANT PHYSIOLOGY*, 129:1448–1463.
- Sedbrook, J. C., Carroll, K. L., Hung, K. F., Masson, P. H. & Somerville, C. R. (2002). The arabidopsis sku5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *THE PLANT CELL*, 14(7):1635–1648.
- Shahollari, B., Peskan-Berghofer, T. & Oelmuller, R. (2004). Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in triton x-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiologia Plantarum*, 122(4):397–403.
- Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A. & Oelmuller, R. (2007). A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus piriformospora indica in arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 50(1):1–13.
- Sharma, N., Low, S. H., Misra, S., Pallavi, B. & Weimbs, T. (2006). Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *Journal of Cell Biology*, 173(6):937–948.
- Shi, H. Z., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B. & Zhu, J. K. (2003). The arabidopsis sos5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *THE PLANT CELL*, 15(1):19–32.
- Shimomura, S. (2006). Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the c-terminus of auxin-binding protein 1: A photoaffinity crosslinking study. *Plant Molecular Biology*, 60(5):663–677.
- Shogomori, H. & Brown, D. A. (2003). Use of detergents to study membrane rafts: The good, the bad, and the ugly. *Biological Chemistry*, 384(9):1259–1263.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1):31–39.
- Simons, K. & van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial-cells. *Biochemistry*, 27(17):6197–6202.
- Simons, K. & Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:269–295.

- Sindhu, A., Langewisch, T., Olek, A., Multani, D. S., Mccann, M. C., Vermerris, W., Carpita, N. C. & Johal, G. (2007). Maize brittle stalk2 encodes a cobra-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity. *PLANT PHYSIOLOGY*, 145(4):1444–1459.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science*, 175(4023):720–&.
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E. & Yalovsky, S. (2007). Activation status-coupled transient s acylation determines membrane partitioning of a plant rho-related gtpase. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6):2144–2154.
- Sutter, J. U., Campanoni, P., Tyrrell, M. & Blatt, M. R. (2006). Selective mobility and sensitivity to snares is exhibited by the arabidopsis kat1 k+ channel at the plasma membrane. *THE PLANT CELL*, 18(4):935–954.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. & Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease aux1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the arabidopsis root apex. *Genes and Development*, 15(20):2648–2653.
- Tarahovsky, Y. S., Muzafarov, E. N. & Kim, Y. A. (2008). Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 314(1-2):65–71.
- ter Beest, M. B. A., Chapin, S. J., Avrahami, D. & Mostov, K. E. (2005). The role of syntaxins in the specificity of vesicle targeting in polarized epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16(12):5784–5792.
- Thompson, T. E. & Tillack, T. W. (1985). Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma-membranes of mammalian-cells. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14:361–386.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K. & Sato, M. H. (2004). Systematic analysis of snare molecules in arabidopsis: Dissection of the post-golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function*, 29.
- van Meer, G. & Simons, K. (1982). Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma-membrane domain of mdck cells have unique phospholipid compositions. *Embo Journal*, 1(7):847–852.
- Varma, R. & Mayor, S. (1998). Gpi-anchored proteins are organized in sub-micron domains at the cell surface. *Nature*, 394(6695):798–801.
- Vieira, O. V., Verkade, P., Manninen, A. & Simons, K. (2005). Fapp2 is involved in the transport of apical cargo in polarized mdck cells. *Journal of Cell Biology*, 170(4):521–526.
- Wagner, A. J., Loew, S. & May, S. (2007). Influence of monolayer-monolayer coupling on the phase behavior of a fluid lipid bilayer. *Biophysical Journal*, 93(12):4268–4277.
- Wasteneys, G. O. & Fujita, M. (2006). Establishing and maintaining axial growth: wall mechanical properties and the cytoskeleton. *Journal of Plant Research*, 119(1):5–10.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. & London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36):33540–33546.
- Yang, J. & Showalter, A. M. (2007). Expression and localization of atagp18, a lysine-rich arabinogalactan-protein in arabidopsis. *Planta*, 226(1):169–179.
- Yang, Z. & Fu, Y. (2007). Rop/rac gtpase signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5):490–494.
- Zacharias, D. A. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric gfps into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296(5569):913–916.