

تفکیک غشاء سلولی

خلاصه

بسیاری از فرایندهای مرتبط با غشاء سلولی نیازمند جدایی فضا-زمانی گذرای اجزاء در اندازه‌هایی در مقیاس مولکول-های جفت شده تا میکرومتر هستند. درک این فرایندها نیازمند درک چگونگی خود-سازماندهی لیپیدها و پروتئین‌ها و میانکنش آنها با کورتکس سلول است. در اینجا ما پیشرفت‌های اخیر کالبدشکافی مکانیسم‌های تشکیل غشاء سلولی را مرور می‌کنیم. ما به چالش‌های موجود در مطالعه‌ی سازماندهی غشاء سلولی، درک فعلی از خود-سازماندهی غشاء سلولی برای تشکیل دومین‌های گذرا و نقش داربست پروتئینی در سازماندهی غشاء سلولی اشاره می‌کنیم. ما درباره‌ی دومین‌های پیام‌رسانی به عنوان یک نمونه‌ی مهم از تشکیل غشاء گذرا بحث می‌کنیم. ما با اشاره به محدودیت‌های موجود برای اندازه‌گیری سازماندهی غشاء در سلول‌های زنده و قدم‌هایی که برای پیشرفت این رشته لازم هستند نتیجه‌گیری خواهیم کرد.

مقدمه: چالش‌های پیش روی مطالعه‌ی سازماندهی غشاء سلولی

درک سازماندهی غشاء پلاسمایی تقریباً به مدت نیم قرن یکی از اهداف اصلی زیست‌شناسی سلولی و بیوفیزیک بوده است. علی‌رغم شناسایی اکثر واحدهای ساختمانی اصلی (لیپیدها، پروتئین‌ها و قندها) و بیشتر اصول سازماندهی، ما درک کافی از چگونگی میانکنش‌های مولکولی بین اجزاء غشاء و جوړشدن آن با کورتکس سلول و ایجاد ساختار و عملکرد در غشاء‌های سلولی نداریم. چندین دلیل برای خلا آگاهی وجود دارد: اول اینکه، مقیاس طول مربوط به تشکیل سیستم غشاء-اسکلت سلولی خیلی کوچک است به طوری که با میکروسکوپ نوری دارای قدرت تفکیک محدود قابل حل نیست و ماهیت گذرا بودن آنها گرفتن تصویر مستقیم با استفاده از میکروسکوپ دارای رزولوشن بالا

را پیچیده می‌کند. دوم اینکه ترکیب مولکولی غشاء سلول بسیار پیچیده است (بیش از 500 گونه‌ی مختلف لیپید، بیش از یک‌هزار گونه‌ی قندی و بیش از 400 پروتیین غشایی). برخلاف پروتیین‌ها، ما روشی برای تشخیص بسیاری از گونه‌های درونی قندها و لیپیدها در شرایط سلول زنده نداریم. بنابراین، ما اطلاعات گسترده‌ی مولکولی برای بسیاری از اجزاء تشکیل دهنده‌ی غشاء سلولی نداریم. سوم اینکه، سلولهای زنده از نامتعادل هستند و فرایندهای ناشی از انرژی به طور مداوم انجام شده و سیستم را بازآرایی می‌کنند. این فرایندهای فعال، نقل و انتقالات غشایی و متابولیسم و پلیمریزاسیون و انقباض موتوری کورتکس سلول را درگیر می‌کند. چگونگی جور شدن این فرایندها با ترکیبات و ساختار غشاء سلولی مطلبی است درک جزئی در مورد آن وجود دارد. اخیراً، شبیه سازی‌های دینامیک مولکولی غشاء‌ها برای پیش بینی رفتار پایین به بالای غشاء در مقیاس مربوط به تشکیل غشاء خیلی کوچک و کوتاه هستند، این مقیاس حداقل یک میکرومتر و یک ثانیه است. همه‌ی این حقایق، اندازه‌گیری مستقیم بسیاری از فرایندها مربوط به غشاء سلولی و بیان آگاهی‌های به دست آمده از سیستم های مدل حداقل لیپیدها و یا مدل‌های MD برای غشاء سلولهای سالم را با چالش مواجه می‌کند.

اکنون، ما به این نتیجه رسیده‌ایم که اندیکاتورهای قدرتمندی برای شناسایی اجزاء غشاء سلول وجود دارد. ما این استدلال‌ها را به صورت سلسله مراتبی ارائه می‌کنیم که با پیچیدگی میانکنش‌های مولکولی و خود-سازماندهی (وضعیت پایه) غشاء پلاسمایی شروع می‌کنیم و به تشکیل دومین‌های پیام رسان گذرا و دومین‌های پایدارتر و بزرگتر در زمینه‌ی عملکردهای سلول می‌رسیم.

خود سازماندهی غشاءهای ساده و پیچیده

سلولها از مولکول‌هایی در مقیاس میکروسکوپی تشکیل می‌شوند تا امکان کنترل فضا-زمانی واکنش‌های بیوشیمیایی فراهم شود. اندامک‌های سلولی به وسیله‌ی غشاءهای لیپیدی اختصاصی از سیتوپلاسم جدا میشوند این غشاء ها بدیهی ترین شکل تشکیل شدن است. با این وجود، به دلیل ماهیت دو بعدی (2D) و سیال بودنشان ، غشاء ها خودشان ساختارهای ایده‌آلی برای سازماندهی و کنترل واکنش‌های بیوشیمیایی هستند. در حقیقت، بسیاری از فرایندهای مهم

سلولی مانند پیام رسانی، دریافت پیام، تبدیل انرژی و متابولیسم در غشاء ها اتفاق می افتد. کاهش ساده‌ی ابعاد متصل به غشاء های دو بعدی منجر به افزایش موثر در غلظت شده و در نتیجه سرعت واکنش ها را افزایش میدهد و به عنوان سوئیچی برای کنترل برخی از واکنش های پیام رسانی سلولی عمل می کند. جهت گیری مطلوب مولکول های متصل شونده به غشاء میتواند از طریق بلوکه کردن و یا در معرض قرار دادن جایگاه های واکنش، واکنش پذیری را افزایش دهد. علاوه بر این قضیه‌ی $Pólya$ تاکید می کند که انتشار دو بعدی تمام سطح را می پوشاند.

علاوه بر این تفاوت های بدیهی بین سیستم های انتشار واکنش در دو و سه بعد، غشاء های زیستی کیفیت های بیشتری را برای انجام و کنترل واکنش ها فراهم میکند. گردهمایی غشاء ها با واکنش های هیدروفوبیک لیپیدها و بدون نیاز به میانکنش های بین اجزاء همسایه انجام میشود. بسته به ترکیب لیپید ساختار دولایه میتواند به شکل جامد، شبه مایع منظم و یا شبه مایع نامنظم باشد. در غشاء های چند جزئی حتی پیوندهای ضعیف بین اجزاء (بار، تمایل به پیوند هیدروژنی و غیره) میتواند منجر به تفکیک اجزاء و ایجاد دومین هایی با ترکیب اختصاصی شود. علاوه بر این، تطبیق خصوصیات مولکولی اتصال اجزاء غشاء سلولی با ویژگی های موضعی غشاء مانند ضخامت، انحنا، و بار سطحی دسته بندی مولکول ها در غشاء ها را بیشتر تحت تاثیر قرار می دهد. این ویژگی های خود سازماندهی غشاء های لیپیدی در سیستم های مدل سازی ساده‌ی غشاء کار شده اند و همه‌ی این اصول برای عملکرد غشاء سلول مهم ارزیابی شده اند. غشاء سلولی یک ترکیب لیپیدی پیچیده با انواعی از پروتئین هاست به طوری که یک سوم از ژن های ما پروتئین های غشایی را کد می کنند. بسته به نوع سلول، و روش اندازه گیری، این پروتئین ها 23 تا 40 درصد از سطح پروتئین را اشغال می کنند.

با محتوی بالای کلسترول و پروتئین، وضعیت کلی غشاء سلولی با میزان لیپید نسبتا بالا به صورت مایع است و در سلول های غیرقطبی توزیع پروتئین های غشایی مانند گیرنده ها و ترسیرهای چربی فلورسنت در مقیاسی بیش از 200 نانومتر همگن به نظر می رسند. با این وجود، اندازه گیری دقیق با رزولوشن بالای لیپید فلورسنت و ردیاب های پروتئینی در سلول های زنده ویژگی های انتشار ناهمسان یا کلاستر شدن در مقیاس پایین تر از 200 نانومتر را نشان داده است، که حبس گذاری اجزاء غشاء در اجزاء اسکلت سلولی و دومین های لیپید- پروتئین را نشان می دهد. شناسایی دومین های

لیپید- پروتئینی در مقیاس نانو در سلول‌های سالم از اندازه‌گیریهای غیرمستقیم بدست می‌آید زیرا این دومین‌ها کوچک و پویا هستند و ساختار آنها به سادگی با فیکساسیون تغییر میکند که برای تکنیک‌های با رزولوشن بالا ضروری است. اندازه‌گیری منتشر پروتئین‌ها و یا لیپیدهای در حال واکنش با نانوکلاسترها نیازمند رزولوشن فضا-زمان بالای است زیرا زمان باقی ماندن مولکول‌های واحد در نانودومین‌ها احتمالا کمتر از 100 میلی ثانیه و اندازه‌ی دومین‌ها کوچکتر از 60 نانومتر است. رزونانس انتقال انرژی فوستر (FRET) نیز برای تعیین اینکه آیا پروتئینی با نانودومین‌ها میانکنش دارد یا نه استفاده شده است. از آنجاییکه، تعداد کمی پروتئین در داخل هر کلاستر وجود دارد، FRET یکدست نسبت به FRET دورنگ نتایج ثابت تری را ایجاد می‌کند. زمان کم میانکنش مولکول‌هایی که با نانودومین‌ها در حال انتشار هستند نشان میدهد که انرژی‌های پیوند خیلی بیشتر از انرژی گرمایی $k_B T$ نیست. از آنجاییکه ما تنها میتوانیم میانکنش‌های مولکول‌های واحد با نانودومین‌ها را اندازه‌گیری کنیم (اما نمیتوانیم از دومین‌ها تصویر برداری کنیم) در حال حاضر ما هیچ اطلاعاتی در خصوص طول عمر و پویایی شکل دومین‌ها نداریم.

نانودومین‌ها یا ناهمگنی‌های غشاء سلولی میتواند با دومین‌های بزرگتر ادغام شود. اتصال عرضی اجزاء پروتئینی یا لیپیدی با توکسین‌های مالتی والانت یا آنتی بادی‌ها میکرو دومین‌ها را در غشاء سلولی القا میکند که یاد آور دومین‌های شبه مایع منظم و شبه مایع نامنظم در غشاءهای مدل است. دومین‌های مشابه در وزیکول‌های استخراج شده از غشاء پلاسمایی که در دمای پایین‌تر از دمای اتاق سرد شده‌اند مشاهده می‌شود. این آزمایشات نشان می‌دهند که ترکیب پیچیده‌ی غشاء پلاسمایی طوری تکامل یافته تا به یک وضعیت گذار نزدیک شود که در آن برخی از اجزاء از نظر فضا - زمانی از هم جدا هستند. تنوع مایع مشاهده شده در غشاء پلاسمایی میتواند یکی از راههای نزدیک شدن به این نقطه باشد و جلوگیری از جدا شدن خودبه خوی به این دلیل است که لیپیدهای مختلف انرژی سطح را کاهش میدهند و به عنوان بافر عمل می‌کنند. علاوه بر این لنگراندازی برخی از اجزاء غشاء سلول به اسکلت سلولی و یا اتصال به ماتریکس خارج سلولی از تفکیک جلوگیری می‌کند. در زیر با جزئیات بیشتری در خصوص این پدیده بحث خواهیم کرد.

یکی دیگر از جنبه‌های ساختاری مهم غشاهای سلولی نامتقارن بودن آنهاست. بیشتر اسفنگولیپیدها و گانگلیوزیدها در لایه‌ی خارجی غشاء ولی بیشتر لیپیدهای دارای بار منفی مانند فسفاتیدیل سرین و گونه‌های فسفاتیدیل اینوزیتول (PIPS) در لایه‌ی داخلی یافت میشوند. این عدم تقارن به صورت فعال و توسط آنزیم فلیپاز و پروتیین‌های انتقال دهنده‌ی لیپید ایجاد و حفظ میشود. در لایه‌ی داخلی کلاستر لیپید پروتیین با میانجیگری میانکنش‌های الکترواستاتیک بین کاتیون‌های دو طرفیتی یا موتیف‌های پروتیینی پلی بازیک انجام میشود که اغلب در نزدیکی سطح سیتوپلاسمی غشاء و گروه‌های سر لیپیدی دارای بار منفی یافت می‌شوند. این مکانیسم کلاستری شدن همراه با تبدیل سریع وضعیت فسفریلاسیون PIP به وسیله‌ی آنزیم‌ها یک لایه‌ی تنظیم کننده را برای تشکیل کلاسترهای غشاء پیشنهاد می‌کند. روی هم رفته، خصوصیات ترمودینامیکی غشاء‌ها امکان تفکیک و دسته بندی خود به خودی پروتیین‌ها و لیپیدها را فراهم میکند. در غشاء‌های سلولی این خصوصیات باید از نظر فضا-زمان کنترل شود تا عملکرد ایجاد شود. یکی از فرضیات جالب این است که ترکیب پیچیده‌ی غشاء سلولی همراه با کورتکس سلول یک سیال خوب ترکیب شده را ایجاد می‌کند که میتواند در آشفتگی‌های کوچک مانند اتصال لیگاند به کلاسترهای عملکردی بازآرایی کند. علاوه بر این تبادلات آنزیمی گونه‌های پلی‌آنیونیک PIP در لایه‌ی سیتوپلاسمی غشاء یک مکانیسم نیرومندی را برای کنترل تشکیل کلاسترها به وسیله‌ی میانکنش‌های الکترواستاتیکی اختصاصی فراهم می‌کند. هر دو مکانیسم برای پیام رسانی در غشاء پلاسمایی مهم هستند. در حقیقت جور شدن بازآرایی محلی القاء شده با اتصال لیگاند و turnover موضعی PIPS برای ارسال پیام‌های اتصال لیگاند برای گیرنده‌های غیر ترانس متصل به GPI (گلیکوزل فسفاتیدیل اینوزیتول) ضروری است.

نقش داربست‌ها در سازماندهی غشاء

غشاء پلاسمایی یوکاریوتی به وسیله‌ی انواعی از پروتیین‌های آداپتور به کورتکس سلول متصل می‌شود که به پروتیین‌های ممبران یا لیپیدهای لایه‌ی داخلی غشاء مانند فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اینوزیتول اتصال دارند. نوع و الگوی لنگراندازی در غشاء پلاسمایی بین انواع سلولها متغیر است و حتی در درون یک سلول واحد، غشاء پلاسمایی اغلب

به دومین های ممبران و با یک ساختار کورتکس ویژه تمایز پیدامی کند. میانکنش کورتکس اکتومیوزین با غشاء پلاسمایی ابتدا مکانیک و مورفولوژی سلول را تنظیم می کند. یکی از شناخته شده ترین داربست های غشایی غشاء پلاسمایی اریتروسیت است که به یک شبکه ی شش گوش به خزانه های 100 نانومتری تفکیک می شود. این شبکه از تترامرهای اسپکترین تشکیل شده است که با فیلامنت های کوتاه اکتین دارای اتصال عرضی هستند. فیلامنت های اسپکترین به وسیله ی پروتیین آداپتور آنکیرین به پروتیین های گذرنده از عرض غشاء متصل می شوند. اخیرا با استفاده از یک روش میکروسکوپی با وضوح بالا یک ساختار اسکلت غشایی مرتبط در سلولهای آکسون کشف شده است. مانند گلبول های قرمز، داربست اکتین - اسپکترین غشاء پلاسمایی آکسونی را نیز در بر گرفته است. با این وجود ، برخلاف گلبولهای قرمز خون، اکتین در اطراف لوله ی آکسونی حلقه تشکیل می دهد. حلقه های اکتین به صورت دوره ای حدود 180 نانومتر به وسیله ی تترامرهای اسپکترین جدا می شوند که با آنکیرین به کانال های یونی متصل می شوند. در هردو مورد داربست غشایی نیروی مکانیکی ایجاد می کند. در آکسیون ، داربست احتمالا توزیع و حضور پروتیین ها و لیپیدهای غشایی را نیز سازماندهی می کند. در برآمدگی آکسونی، سد بین آکسون و غشاء پیکری (داربست های مشابهی که به کانال های سدیم لنگر می اندازند.) به اندازه ی کافی ضخیم هستند که از انتشار سایر پروتیین ها و کلاسترها جلوگیری کرده و به لیپیدهای واحد اجازه ی عبور میدهند.

در کل، دومین های غشایی قطبیده در بسیاری از انواع سلولها به وسیله ی انواع خاصی از داربست های غشایی سازمان می یابند. شکل 1 یک ساختار عمومی از داربست غشایی را نشان میدهد. این ساختار میتواند به لایه های عملکردی تقسیم شود. با شروع از بخش خارج سلولی ، اکتودومین های گیرنده های گذرنده از عرض غشاء با افکتورهای متحرک و ساختارهای ثابت میانکنش می کنند. چگونگی اتصال لیگاند گذرنده از عرض غشاء برای القای به خدمت گرفتن آداپتور کاملا معلوم نیست. اغلب، اتصال لیگاند با دایمریزاسیون گیرنده همراه است. در طرف داخل سلولی، پروتیین های آداپتور موتیف های پپتیدی را در دنباله های سیتوپلاسمی گیرنده ها شناسایی می کنند. بیشتر پروتیین های آداپتور دارای تعدادی میانکنش های پروتیین-پروتیین هستند که منجر به منزوی شدن بقیه ی پروتیین های ترانس ممبران، سایر داربست ها ، مولکول های پیام رسان و فیلامنت های اکتین می شود. علاوه براین مولکول های داربست کننده میتوانند به

طور مستقیم از طریق موتیف های متصل شونده به لیپید با پروتیین میانکنش کنند. وابستگی متقابل فضا-زمانی این شبکه‌ی میانکنشی شامل بازخوردهای مثبت و منفی است از طریق تعیین هویت مولکولی و ساختار و عملکرد دومین ممبران مربوطه است. به ویژه اینکه این گردهمایی‌ها بوسیله‌ی نانوکلسترهای لیپیدی حاوی کلسترول، PIP2 و یا هر دو ماجول می‌شود. چنین کلاسترهایی فقط به اسکلت سلولی متصل نمی‌شوند بلکه پروتیین‌های پلیمریزاسیون اکتین را جذب و ساختار اسکلت سلولی را ماجوله می‌کند. درگیر کردن این شبکه‌های میانکنشی در فضا و زمان نیازمند یک اتصال سیستماتیک از روش‌های آزمایشگاهی و مدل سازی جدید است. نمونه‌های داربست‌های غشایی مهم اتصالات ماتریکس سلولی (چسبندگی کانونی) اتصالات سول-سلول (ادهرنس، محکم و اتصالات عصبی و دسموزوم‌ها) و برآمدگی‌های غشایی قطبیده (لاملی پودیا، آکسون، brush, border و پرزهای سلولهای اپیتلیال) هستند.

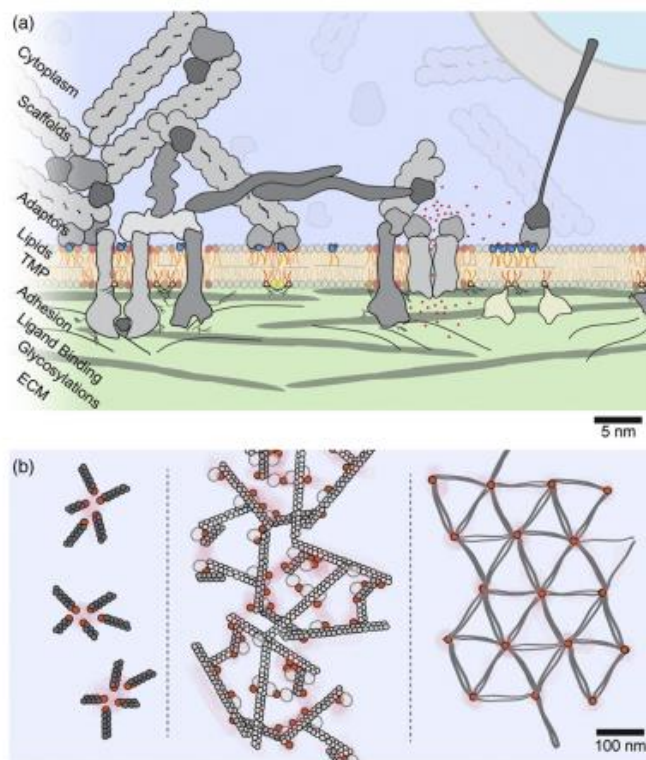


Fig. 1. Cartoon showing some of the main features of plasma membrane organization. (a) Cross-section of the plasma membrane. Green represents the extracellular matrix that is separated from the cytoplasm (blue) by the lipid bilayer. Proteins are shown in saturated gray tones. Lipids are shown in light gray or, if involved in membrane domain formation, in red tones. The outer leaflet of the bilayer contains glycosylated lipids and ectodomains of transmembrane proteins or GPI-anchored proteins (yellowish). The inner leaflet contains anionic lipids, which can interact with transmembrane and cytosolic proteins or with divalent cations (red). Transmembrane proteins and lipids can be bound by adapter proteins on the inner leaflet of the membrane. The adapters often interact with cytoskeletal scaffolding proteins such as actin or spectrin. Coupling of extracellular ligand binding or adhesion to transient internal scaffold assembly via clustering of transmembrane domains and lipids is shown on the left side (docking of an exocytosis vesicle). (b) Top view on the plasma membrane from the cytoplasm showing three types of membrane scaffold structures. Left shows active actin fiber polymerizing binding to the membrane constituents and driving clustering via aster formation [67]. Middle shows actin fence formation and binding to transmembrane proteins and lipids via adapter proteins [1]. Right shows regular spectrin/actin/ankyrin-based membrane scaffold as found in red blood cells and neurons [46,47].

اینکه داربست‌های غشایی چگونه می‌توانند بر تفکیک پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی در مقیاس نانو تاثیر بگذارند در مطالعه‌ی منی توسط گروه Kusumi's نشان داده شده است. ردیابی تک ذره‌ای سریع پروتئین‌های ترانس ممبران و آنالوگ‌های لیپیدهای لایه‌ی خارجی غشاء یک الگوی انتشار محدود در مقیاس فضایی محدود در زیر حد پراش میکروسکوپ نوری نشان داد. پروتئین‌ها و لیپیدهای غشاء به صورت موضعی سریع حرکت میکنند (کمتر از 60 تا 200 نانومتر) اما در هر بخش قبل از جهیدن به بخش همسایه بیش از یک میلی ثانیه باقی می‌مانند. Aki Kusumi این الگوی انتشار را انتشار هاپ نامید و پیشنهاد کرد که فیلامنت‌های اکتین متصل شونده به غشاء که در سطح سیتوپلاسمی غشاء قرار دارند، به عنوان مرزهایی برای پروتئین‌های ترانس ممبران در حال انتشار عمل می‌کنند. علاوه بر این پروتئین‌های غشایی که که اسکلت سلولی را به غشاء سلولی لنگر می‌کنند به عنوان موانعی درون صفحه‌ی غشاء عمل می‌کنند که انتشار لیپیدها حتی در لایه‌ی خارجی را نیز محدود می‌کند. این یافته که بسیاری از پروتئین‌ها می‌توانند بین وضعیت متصل به اکتین یا غیر متصل به اکتین تغییر کنند یک مدل جامعی را ایجاد می‌کند که بسیاری از این دینامیک‌های غشایی مشاهده شده را توضیح می‌دهد.

شبیه‌سازی‌ها و آزمایشات اخیر نشان می‌دهد که داربست‌های غشایی میتواند بر سازماندهی لیپیدها اثر نیرومندی داشته باشد که بسیار فراتر از موانع انتشار منفعل است. در غشاءهای پیچیده که به فا گذر نزدیک هستند، پین گذاری اجزاء سازنده‌ی غشاء با یک داربست می‌تواند دومین‌های لیپید را تحریک یا سرکوب کند که به دما و الگوی پین گذاری بستگی دارد. شبیه‌سازی‌های ساده‌ی مدل دوبعدی آیزینگ رفتار انتقال فاز و غشاءهای مدل سه تایی و حتی وزیکول-های پیچیده‌ی مشتق شده از سلول را نشان داده است. شبیه‌سازی‌های پیشرفته تر پیش بینی کرده اند که پین گذاری فضا زمان اجزاء تشکیل دهنده‌ی غشاء منجر به از دست رفتن گسترده و حتی کامل انتقال فاز خواهد شد. این مکانیزم از ماده چگال و فیزیک آماری به عنوان اختلال در فرو نشستن شناخته شده است و در مواد شیشه مانند و انتقال فرومغناطیس مطالعه شده است. پیش بینی‌های in-silico برای غشاءهای لیپیدی اخیرا در بسیاری از روش‌های آزمایشگاهی (in vitro) اثبات شده است. با استفاده از چسبندگی به عنوان منبع پین گذاری لیپید در وزیکول‌های تک سلولی غول پیکر در تفکیک فاز، Zhao و همکاران دادن که در دمای بالاتر از دمای انتقال فاز دومین‌های

لیپیدی در محل‌های چسبندگی پایدار می‌شوند. Honigmann و همکارانش از یک کورتکس مصنوعی استفاده کرد که به یک غشاء حمایت شده با لنگرهای لیپیدی متصل بود. مطابق شبیه سازی‌ها، پین گذاری با meshwork های اکتین متراکم از تفکیک فاز بزرگ مقیاس در دمای پایین جلوگیری کرده و دومین‌های لیپید را در دماهای بالا تثبیت می‌کند. با استفاده از روشی مشابه ، Arumugam و همکارانش به نتیجه‌ی مشابهی در مورد GUVs رسیدند. کار in vitro و incilico به وضوح نشان نشان می‌دهد که یک مکانیسم نامطلوب خاموش شده می‌تواند برای توصیف وضعیت فیزیولوژیک غشاءهای سلولی مهم باشد. این مشاهدات به وسیله‌ی مشاهدات تفکیک فاز مقیاس وسیع و زیگل‌های مشتق شده از غشاء پلاسمایی که برخی از پروتیین‌ها و لیپیدهای غشاء را دارد ولی فاقد ارتباط با کورتکس سلول است حمایت می‌شود. این قضیه نشان می‌دهد که در سلول‌های سالم ، تفکیک در مقیاس وسیع به وسیله‌ی کورتکس ممانعت می‌شود. در راستای این پیش بینی‌ها ، چندین مطالعه‌ی گزارش شده در مورد ناهمگنی های غشاء و رفت‌های لیپیدی به این نتیجه رسید که دپلیمیریزاسیون اکتین منجر به ایجاد غشاء همگن در دمای فیزیولوژیک می‌شود.

علاوه بر این، کورتکس به طور پیوسته با دپلیمیریزاسیون اکتین و فیبرهای میکروتوبولی و حرکات مبتنی بر موتور پروتیین‌ها بازآرایی می‌شود. Satyajit Mayor اخیراً مدلی را پیشنهاد کرده است که نقش رشته‌ی کوتاه اکتین متحرک برای ایجاد دومین‌های لیپیدی trans-leaflet را تعیین می‌کند. رشته‌های کوتاه اکتین که با پروتیین‌های آداپتور به لیپید فسفاتیدیل سرین حاوی زنجیره‌های آسیل بلند و اشباع متصل می‌شود می‌تواند باعث القای کلاسترهای پروتیین لنگر شده با GPI بر روی لایه‌ی خارجی غشاء پلاسمایی شود.

تشکیل دومین‌های پیام رسانی

در طول پیام رسانی سلولی اطلاعات باید در طول غشاء انتقال داده شود تا پاسخ سلولی ایجاد گردد. ینکه چگونه پیام هایی از یک گیرنده‌ی واحد با هم ترکیب می‌شوند تا تصمیم‌های سلولی کلی ایجاد کنند هنوز کاملاً درک نشده است. مثال‌هایی از فرایندهای پیام رسانی که به خوبی مطالعه شده اند نشان می‌دهد که مراحل تکثیر برای ترجمه‌ی اتفاقات

فعال سازی یک گیرنده‌ی واحد به تنظیمات رونویسی لازم هستند. با توجه پیشرفتهای فسفو پروتئومیکس، این موضوع در حال روشن شدن است که دیدگاه قدیمی که با شمای ساده‌ای از واکنش‌های خطی آبخار پیام رسانی را توصیف می‌کرد باید با مدل‌های متغیر جایگزین شود که در آنها تصمیم‌گیری‌ها نتیجه‌ی میانکنش‌های پیچیده‌ای در شبکه‌های در هم تنیده است. علاوه بر این، در سال‌های اخیر، روشن شده است که بسیاری از فرایندهای پایین‌دست در آبخار پیام رسانی بعد از فعال سازی گیرنده در حقیقت به طور مستقیم در محل فعال سازی گیرنده جایگیری می‌کند. این کار از طریق تشکیل کلاسترهای پیام رسانی به دست می‌آید که حاوی گیرنده‌های فعال شده‌ی چندگانه و مولکول‌های داربستی است که به صورت گذرا به خدمت گرفته می‌شود و کینازها و سایر پروتئین‌های پیام رسانی باهم ترکیب می‌کند. کلاستر کل با بازآرایی اکتین-کورتکس پایدار شده و در نهایت با اندوسیتوزیس غیرفعال می‌گردد. برای بردن به اینکه کدام مکانیسم در حقیقت تشکیل و پایان این کلاسترهای پیام رسانی را به پیش می‌برد باید به اصول سازماندهی غشاء و میانکنش آن با کورتکس برگشت.

بسیاری از مکانیسم‌های سازماندهی غشاء که در پاراگراف‌های قبلی معرفی شدند در تشکیل دومین‌های پیام رسانی دخیل هستند. از میان انواع مخالف گیرنده‌های قرار گرفته در غشاء پلاسمایی، برخی از گیرنده‌ها ممکن است به صورت واحدهای مستقل عمل کنند مانند کانال‌های یونی ولتاژی، و برخی از گیرنده‌های جور شده با پروتئین‌های G. با این وجود برخی از گیرنده‌ها از جمله کینازهای تیروزین، نیازمند دیمریزاسیون القا شده با لیگاند برای انتقال پیام هستند. به نظر می‌رسد که دیمریزاسیون و مرحله‌ی فسفریلاسیون بعد از آن تحت تاثیر محیط موضعی غشاء قرار می‌گیرد. گیرنده‌های متصل به GPI، که تنها به لایه‌ی خارجی غشاء متصل هستند به نظر می‌رسد که با کلاستر کردن و شکل رفت‌های لیپیدی پیام رسانی می‌کنند که کلاستر را از طریق جفت کردن دولایه از لایه‌ی خارجی به لایه‌ی اخلی منتقل می‌کند.

در کل، کلاستر شدن گیرنده‌ی فعال شده راهی را برای بهینه کردن پیام رسانی به نیازهای خاص است: 1) پیام رسانی تعاونی گیرنده‌های آشفته را به یک سیستم متمرکز تبدیل می‌کنند. II) اتصال پی در پی یک لیگاند ضعیف به یک دسته از گیرنده‌ها باعث تکثیر و افزایش حساسیت می‌شود III) کلاستر شدن گذرا امکان سوئیچینگ بین پیام‌های

موضعی و پوشش فضای بیشتر را فراهم می‌کند. عملکردهای ویژه اندازه، دینامیک و سازماندهی کلاسترها را تکامل بخشیده است. مدل‌سازی نشان داد که کلاستر 4 تا 8 پروتیین تعاونی به صورت بهینه یک سیگنال را با تمرکز بالا با گیرنده‌های آشفته از عرض غشاء و با حداقل انرژی فعال‌سازی عبور می‌دهند. کلاستر پروتیین‌های CD59 لنگر شده به GPI با جمع شدن 3 تا 9 پروتیین CD59 لنگر شده به GPI یک کلاستر واحد را تشکیل می‌دهند در حالیکه کلاسترهای GTPase Ras دارای حدوداً 6 مولکول هستند. کلاسترهای کوچک برای افزایش تمرکز مناسب تر هستند زیرا، جمع شدن و باز شدن سریع امکان انتشار سریع برای پوشش فضایی گسترده را فراهم می‌کند.

همانطور که در بالا بحث شد، تغییرات کوچک در ماینکنش‌های بین مولکولی به راحتی منجر به تفکیک موضعی اجزاء غشاء و تشکیل نانودومین‌ها می‌شود. برای تشکیل نانودومین‌های پیام‌رسانی گذرا، برخی از ویژگی‌ها مولکول‌های پیام‌رسان ممکن است با رویداد پیام‌رسانی مدوله شود. برای مثال شیب دومین‌های گذرنده از عرض غشاء برای برخی از کانال‌های یونی و گیرنده در طی فعال‌سازی تغییر می‌کند که نشان می‌دهد که آنها اکنون ضخامت غشایی متفاوتی را ترجیح می‌دهند. همچنین، سایر فرایندهای فعال‌سازی مانند فسفریلاسیون یا پلیمریزاسیون، بار یا سطح آبگریزی پروتیین‌های غشاء را تغییر می‌دهند و به این ترتیب تمایل آنها به محیط‌های موضعی خاص را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این مکانیسم‌ها می‌تواند شروع تشکیل کلاسترهای گیرنده‌های فعال شده را به پیش ببرد. علاوه بر این پلیمریزاسیون فعال با مصرف انرژی و کینتیک‌های واکنش موضوع مطالعات اخیر بوده است. همکاری بین گروه‌های Ron Vale و Michael Rosen اخیراً نشان داده است که چگونه فسفریلاسیون گیرنده‌ی سلول-T با پروتیین‌های پایین دست شناسایی شده و با کمک آداپتورهای مالتی والانت و پروتیین‌های داربستی و اسکلت سلولی اکتین به کلاستر پیام‌رسان تبدیل می‌شود. داربست‌کننده‌ها و آداپتورها به مولکول‌های موضعی و گذرا مانند کیناز و سایر مولکول‌های پیام‌رسان امکان منزوی شدن را می‌دهد. جالب توجه است که گردهمایی کلاسترهای پیام‌رسان با پروتیین‌های داربست به نظر میرسد که بر جدا سازی فاز مایع پروتیین‌های داربستی چندظرفیتی متکی باشند که امکان تکثیر و تشکیل محیط واکنش ویژه را فراهم کرده و از نظر فرضی بسیار شبیه به چیزی است که برای جداسازی فازها برای لیپیدها و

پروتیین‌های درون غشاء پیشنهاد شده است. بالاتر از این، جریان مولکولی ناشی از پروتیین‌های موتوری برای پلت فرمهای ریز پیام رسانی مانند سیناپس ایمونولوژیکی، و ممکن است حتی در دومین‌های کوچکتر هم اتفاق بیافتد.

نقش لیپیدها در تشکیل کلاسترهای پیام رسانی در لایه‌ی داخلی غشاء شناخته شده تر است، در اینجا کلاستری شدن بیشتر به وسیله‌ی میانکنش‌های الکترواستاتیکی بین کاتیون‌های دو ظرفیتی یا موتیف‌های پروتیینی پلی بازیک که اغلب در مجاورت بخش سیتوپلاسمی غشاء و گروه‌های لیپیدی دارای بار منفی یافت می‌شوند. پیشنهاد شده است که یون‌های دو ظرفیتی مانند شارش کلسیم در حین پیام رسانی میتواند این لیپیدهای باردار را گردهم آورد و لوپ‌های فیدبک احتمالی بوجود آورد. مراحل مختلف فسفریلاسیون PIP میتواند به وسیله‌ی دومین‌های متصل شونده به لیپید مانند دومین همولوژی Pleckstrin، دومین‌های C2 و یا دومین‌های PDZ به طور اختصاصی سازماندهی شود که برای مثال به عنوان آداپتورهای ردیاب اختصاصی جایگاه برای وزیکول‌های سیناپسی در نورون یا به عنوان مدول‌های مختلف داربست‌های پیام رسانی چند ظرفیتی عمل می‌کنند این نانوکلاسترهای PIP2 ارتباط بین غشاء و اسکلت سلولی را قویتر کرده و به حرکت پیام از غشاء سلولی به سمت هسته کمک کند.

در سلولهای سالم، رشد دومین، به وسیله‌ی پین گذاری دومین‌ها از طریق میانکنش‌ها در زیر اسکلت سلولی محدود میشود، مگر اینکه فرایند از بازآرایی فعال اسکلت سلولی استفاده کند. به تدریج اتفاق پیام رسانی مجبور به پایان رسیدن است و نانودومین‌ها باید از هم جدا شوند. راه انداز این فرایند ناشناخته است و میتواند از اثرات فیدبک اتفاقات پایین دست باشد. با این وجود، ساده ترین راه انداز میتواند اندازه‌ی نانو دومین و هماهنگی آن با اسکلت سلولی کورتکسی باشد. قانون متداول برای حذف کمپلکس پیام رسانی فعال شده اندوسیتوز است. که میتواند با افزایش پلیمریزاسیون اکتین بر روی نانو دومین‌های در حال رشد بر روی لایه‌ی داخلی غشاء راه بیافتد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از فرایندهای سلولی مانند پیام رسانی، الحاق وزیکولها، جوانه زنی، تقسیم سلولی، چسبندگی سلولی، و قطبیت سلول نیازمند یک تفکیک فضایی-زمانی در اجزاء غشاء و اسکلت سلولی کورتکس در مقیاسی بین یک جفت مولکول

تا یک میکرومتر است. درک این فرایند مهم در سطح مکانیکی نیازمند درک چگونگی خود-سازماندهی غشاء هاست. پیشرفت های اخیر در تکنیک های اپتیک و اسپکتروسکوپی به روشن شدن سازمان یابی غشاء در سلولهای زنده با رزولوشن فضایی-زمانی بالا کمک کرده است. این ابزارها به امکان میدهند تا پیش بینی های نظری بر اساس آزمایشات مدلی غشاء را در سلولهای زنده ارزیابی کنیم. با این وجود بسیاری از لیپیدهای درونی غشاء هنوز با روش های فلورسنسی قابل تشخیص نیستند که دانش ما را در باره ی سازمان یابی غشاء محدود می کند. برای غلبه به این خلا نیاز به ایجاد روش ها و ابزارهای پیشرفته تری است. علاوه براین تعداد مکانیسم ها، فرایندها، و اجزاء مولکولی درگیر در تعریف ساختار عملکردی غشاء سلولی در حال بزرگتر شدن است. بنابراین، ایجاد مدل های چند مقیاسی برای ساختار غشاء سلولی برای پیوند دادن مقیاس خود سازماندهی مولکولی به مقیاس سلولی و بافتی مفید خواهد بود.

References

- [1] A. Kusumi, K.G.N. Suzuki, R.S. Kasai, K. Ritchie, T.K. Fujiwara, Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 604–615, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.001>.
- [2] E. Klotzsch, G.J. Schütz, A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 368 (2013) 2,0120,033, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0033>.
- [3] W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, Computer simulations of lipid membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 1765–1776, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.004>.
- [4] C. Eggeling, A. Honigsmann, Closing the gap: the approach of optical and computational microscopy to uncover biomembrane organization, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* (2016) 2558–2568, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.025>.
- [5] M. Schmick, P.I.H. Bastiaens, The interdependence of membrane shape and cellular signal processing, *Cell* 156 (2014) 1132–1138, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.007>.
- [6] L.P. Jackson, B.T. Kelly, A.J. McCoy, T. Gaffry, L.C. James, B.M. Collins, S. Höning, P.R. Evans, D.J. Owen, A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex, *Cell* 141 (2010) 1220–1229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.006>.
- [7] G. Pólya, Über eine Aufgabe der Wahrscheinlichkeitsrechnung betreffend die Irrfahrt im Straßennetz, *Math. Ann.* 84 (1921) 149–160.
- [8] P.F.F. Almeida, A. Pokorny, A. Hinderliter, Thermodynamics of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1720 (2005) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.12.004>.
- [9] T. Baumgart, B.R. Capraro, C. Zhu, S.L. Das, Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62 (2011) 483–506, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.012809.103450>.
- [10] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Mol. Biol. Cell* (2008) [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C).
- [11] A.D. Dupuy, D.M. Engelman, Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2848–2852, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0712379105>.
- [12] a.E. Sowers, C.R. Hackenbrock, Rate of lateral diffusion of intramembrane particles: measurement by electrophoretic displacement and rerandomization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 6246–6250.
- [13] H.-J. Kaiser, D. Lingwood, I. Levental, J.L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, K. Simons, Order of lipid phases in model and plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 16,645–16,650, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908987106>.
- [14] D.M. Owen, D.J. Williamson, A. Magenau, K. Gaus, Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1256, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2273>.
- [15] Y. Sako, A. Kusumi, Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1559–1574.
- [16] R. Varma, S. Mayor, GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface, *Nature* 394 (1998) 798–801 [<http://www.nature.com/gate.lib.buffalo.edu/nature/journal/v394/n6695/full/394798a0.html>] (accessed May 17, 2016)].
- [17] P.-F. Lenne, L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X.-J. Guo, H. Rigneault, H.-T. He, D. Marguet, Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork, *EMBO J.* 25 (2006) 3245–3256, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601214>.
- [18] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schönle, S.W. Hell, Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature* 457 (2009) 1159–1162, <http://dx.doi.org/10.1038/nature07596>.

- [19] A. Honigsmann, V. Mueller, H. Ta, A. Schoenle, E. Sezgin, S.W. Hell, C. Eggeling, Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5412, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5412>.
- [20] H. Huang, M.F. Simsek, W. Jin, A. Pralle, Effect of receptor dimerization on membrane lipid raft structure continuously quantified on single cells by camera based fluorescence correlation spectroscopy, *PLoS One* 10 (2015), e0121777, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121777>.
- [21] S.K. Saka, A. Honigsmann, C. Eggeling, S.W. Hell, T. Lang, S.O. Rizzoli, Multi-protein assemblies underlie the mesoscale organization of the plasma membrane, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4509, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5509>.
- [22] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R.S. Kasai, J. Kondo, T. Fujiwara, Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34 (2005) 351–378, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637>.
- [23] A. Pralle, P. Keller, E.-L. Florin, K. Simons, J.K.H. Hörber, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 997–1007, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.148.5.997>.
- [24] P. Kukura, H. Ewers, C. Müller, A. Renn, A. Helenius, V. Sandoghdar, High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus, *Nat. Methods* 6 (2009) 923–927, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1395>.
- [25] J. Ortega Arroyo, D. Cole, P. Kukura, Interferometric scattering microscopy and its combination with single-molecule fluorescence imaging, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 617–633, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.022>.
- [26] J.W. Krieger, A.P. Singh, N. Bag, C.S. Garbe, T.E. Saunders, J. Langowski, T. Wohland, Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 1948–1974, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.100>.
- [27] C. Di Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 12,307–12,312, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1222097110>.
- [28] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 688–699, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2977>.
- [29] M. Rao, S. Mayor, Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts, *Biochim. Biophys. Acta* 1746 (2005) 221–233 [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488905001667> (accessed May 17, 2016)].
- [30] D. Goswami, K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao, S. Mayor, Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity, *Cell* 135 (2008) 1085–1097 [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408015079> (accessed May 17, 2016)].
- [31] S.L. Veatch, S.L. Keller, Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1746 (2005) 172–185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.06.010>.
- [32] J.F. Hancock, Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 456–462, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1925>.
- [33] D. Lingwood, J. Ries, P. Schwille, K. Simons, Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10,005–10,010, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804374105>.
- [34] S.L. Veatch, P. Cicuta, P. Sengupta, A. Honerkamp-Smith, D. Holowka, B. Baird, Critical fluctuations in plasma membrane vesicles, *ACS Chem. Biol.* 3 (2008) 287–293, <http://dx.doi.org/10.1021/cb800012x>.
- [35] K.R. Levental, I. Levental, Giant plasma membrane vesicles: models for understanding membrane organization, *Curr. Top. Membr.* 75 (2015) 25–57, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.03.009>.
- [36] B.B. Machta, S. Papanikolaou, J.P. Sethna, S.L. Veatch, Minimal model of plasma membrane heterogeneity requires coupling cortical actin to criticality, *Biophys. J.* 100 (2011) 1668–1677, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.029>.
- [37] J.C.M. Holthuis, A.K. Menon, Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis, *Nature* 510 (2014) 48–57, <http://dx.doi.org/10.1038/nature13474>.
- [38] T.T. Sebastian, R.D. Baldridge, P. Xu, T.R. Graham, Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1821 (2012) 1068–1077, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.12.007>.
- [39] G. van den Bogaart, K. Meyenberg, H.J. Risselada, H. Amin, K.I. Willig, B.E. Hubrich, M. Dier, S.W. Hell, H. Grubmüller, U. Diederichsen, R. Jahn, Membrane protein sequestering by ionic protein–lipid interactions, *Nature* 479 (2011) 552–555, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10545>.
- [40] A. Honigsmann, G. van den Bogaart, E. Iraheta, H.J. Risselada, D. Milovanovic, V. Mueller, S. Müller, U. Diederichsen, D. Fasshauer, H. Grubmüller, S.W. Hell, C. Eggeling, K. Kühnel, R. Jahn, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013) 679–686, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2570>.
- [41] W.G. Ellenbroek, Y.H. Wang, D.A. Christian, D.E. Discher, P.A. Janmey, A.J. Liu, Divalent cation-dependent formation of electrostatic PIP2 clusters in lipid monolayers, *Biophys. J.* 101 (2011) 2178–2184, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.039>.
- [42] D. Xiong, S. Xiao, S. Guo, Q. Lin, F. Nakatsu, M. Wu, Oscillations by phosphoinositide waves, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2000>.
- [43] J. van Rheenen, E.M. Achame, H. Janssen, J. Calafat, K. Jalink, PIP2 signaling in lipid domains: a critical re-evaluation, *EMBO J.* 24 (2005) 1664–1673, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600655>.
- [44] K.B. Abd Halim, H. Koldsø, M.S.P. Sansom, Interactions of the EGFR juxtamembrane domain with PIP2-containing lipid bilayers: insights from multiscale molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta* 1850 (2015) 1017–1025, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.006>.
- [45] A. Kapus, P. Janmey, Plasma membrane—cortical cytoskeleton interactions: a cell biology approach with biophysical considerations, In: *Compr. Physiol.*, John Wiley & Sons, Inc., 3 (3), 2013, 1231–1281, <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c120015>.
- [46] V.M. Fowler, The human erythrocyte plasma membrane: a Rosetta stone for decoding membrane–cytoskeleton

- p>structure,
- Curr. Top. Membr.*
- 72 (2013) 39–88,
- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00002-7>
- .
- [47] K. Xu, G. Zhong, X. Zhuang, Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons, *Science* 339 (2013) 452–456, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1232251>.
 - [48] E. D'Este, D. Kamin, C. Velte, F. Göttfert, M. Simons, S.W. Hell, Subcortical cytoskeleton periodicity throughout the nervous system, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22,741, <http://dx.doi.org/10.1038/srep22741>.
 - [49] C.G. Dotti, M. Poo, Neuronal polarization: building fences for molecular segregation, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 591–594.
 - [50] Y.-H. Wang, R. Bucki, P.A. Janmey, Cholesterol-dependent phase-demixing in lipid bilayers as a switch for the activity of the phosphoinositide-binding cytoskeletal protein gelsolin, *Biochemistry* 55 (2016) 3361–3369, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01363>.
 - [51] M. Mkrtchjan, J. Li, B. Russell, Substrate stiffness and microtopography in PIP2 regulation of the actin cytoskeleton in primary cardiac fibroblasts, *FASEB J.* 29 (2015).
 - [52] Y. Sako, A. Kusumi, Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1559–1574 [<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2291191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed February 7, 2015)].
 - [53] K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara, A. Kusumi, Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques, *Biophys. J.* 88 (2005) 3659–3680, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048538>.
 - [54] J. Ehrig, E.P. Petrov, P. Schwill, Near-critical fluctuations and cytoskeleton-assisted phase separation lead to subdiffusion in cell membranes, *Biophys. J.* 100 (2011) 80–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.002>.
 - [55] T. Speck, R.L.C. Vink, Random pinning limits the size of membrane adhesion domains, *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.* 86 (2012) 31,923, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.86.031923>.
 - [56] J. Zhao, J. Wu, S.L. Veatch, Adhesion stabilizes robust lipid heterogeneity in supercritical membranes at physiological temperature, *Biophys. J.* 104 (2013) 825–834, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.047>.
 - [57] A. Honigsmann, S. Sadeghi, J. Keller, S.W. Hell, C. Eggeling, R. Vink, A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes, (2014) *eLife* 2014;3:e01671.
 - [58] S. Arumugam, E.P. Petrov, P. Schwill, Cytoskeletal pinning controls phase separation in multicomponent lipid membranes, *Biophys. J.* 108 (2015) 1104–1113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.12.050>.
 - [59] D.M. Andrade, M.P. Clausen, J. Keller, V. Mueller, C. Wu, J.E. Bear, S.W. Hell, B.C. Lagerholm, C. Eggeling, Cortical actin networks induce spatio-temporal confinement of phospholipids in the plasma membrane—a minimally invasive investigation by STED-FCS, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11,454, <http://dx.doi.org/10.1038/srep11454>.
 - [60] V. Mueller, C. Ringemann, A. Honigsmann, G. Schwarzmann, R. Medda, M. Leutenegger, S. Polyakova, V.N. Belov, S.W. Hell, C. Eggeling, STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells, *Biophys. J.* 101 (2011) 1651–1660.
 - [61] R. Raghupathy, A.A. Anilkumar, A. Polley, P.P. Singh, M. Yadav, C. Johnson, S. Suryawanshi, V. Saikam, S.D. Sawant, A. Panda, Z. Guo, R.A. Vishwakarma, M. Rao, S. Mayor, Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins, *Cell* 161 (2015) 581–594, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.048>.
 - [62] B. Bodenmiller, S. Wanka, C. Kraft, J. Urban, D. Campbell, P.G. Pedrioli, B. Gerrits, P. Picotti, H. Lam, O. Vitek, M.-Y. Brusniak, B. Roschitzki, C. Zhang, K.M. Shokat, R. Schlapbach, A. Colman-Lerner, G.P. Nolan, A.I. Nesvizhskii, M. Peter, R. Loewith, C. von Mering, R. Aebersold, Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast, *Sci. Signal.* 3 (2010), rs4 <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2001182>.
 - [63] A. Breitkreutz, H. Choi, J.R. Sharom, L. Boucher, V. Neduva, B. Larsen, Z.-Y.Y. Lin, B.-J.J. Breitkreutz, C. Stark, G. Liu, J. Ahn, D. Dewar-Darch, T. Regul, X. Tang, R. Almeida, Z.S. Qin, T. Pawson, A.-C.C. Gingras, A.I. Nesvizhskii, M. Tyers, A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast, *Science* 328 (2010) 1043–1046, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1176495>.
 - [64] M.L. Dustin, J.T. Groves, Receptor signaling clusters in the immune synapse, *Annu. Rev. Biophys.* 41 (2012) 543–556, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155238>.
 - [65] M.A. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 141 (2010) 1117–1134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
 - [66] Ü. Coskun, M. Grzybek, D. Drechsel, K. Simons, Regulation of human EGF receptor by lipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 9044–9048, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1105666108>.
 - [67] K. Gowrishankar, S. Ghosh, S. Saha, R. C. S. Mayor, M. Rao, Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules, *Cell* 149 (2012) 1353–1367, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.008>.
 - [68] B.N. Kholodenko, J.F. Hancock, W. Kolch, Signalling ballet in space and time, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 414–426, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2901>.
 - [69] T. Tian, A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R.G. Parton, J.F. Hancock, Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 905–914, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1615>.
 - [70] D. Goswami, K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao, S. Mayor, Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity, *Cell* 135 (2008) 1085–1097, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.032>.
 - [71] J.F. Hancock, R.G. Parton, Ras plasma membrane signalling platforms, *Biochem. J.* 389 (2005) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050231>.
 - [72] L. Janosi, Z. Li, J.F. Hancock, A.a. Gofre, Organization, dynamics, and segregation of Ras nanoclusters in membrane domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 8097–8102, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200773109>.
 - [73] L. Iversen, H. Tu, W. Lin, S.M. Christensen, S.M. Abel, J. Iwig, H.-J. Wu, J. Gureasko, C. Rhodes, R.S. Petit, S.D. Hansen, P. Thill, C.-H. Yu, D. Stamou, A.K. Chakraborty, J.

- Kuriyan, J.T. Groves, Ras activation by SOS: allosteric regulation by altered fluctuation dynamics, *Science* 345 (2014) 50–54, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1250373> (80-).
- [74] T. Baumgart, S.T. Hess, W.W. Webb, Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, *Nature* 425 (2003) 821–824, <http://dx.doi.org/10.1038/nature02013>.
- [75] K. Simons, J.L. Sampaio, Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–17, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>.
- [76] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572, <http://dx.doi.org/10.1038/42408>.
- [77] L. Iversen, H.-L. Tu, W.-C. Lin, S.M. Christensen, S.M. Abel, J. Iwig, H.-J. Wu, J. Gureasko, C. Rhodes, R.S. Petit, S.D. Hansen, P. Thill, C.-H. Yu, D. Stamou, A.K. Chakraborty, J. Kuriyan, J.T. Groves, Ras activation by SOS: allosteric regulation by altered fluctuation dynamics, *Science* 345 (2014) 50–54 [<http://science.sciencemag.org/content/345/6192/50.abstract> (80-)].
- [78] S. Saha, I.-H. Lee, A. Polley, J.T. Groves, M. Rao, S. Mayor, Diffusion of GPI-anchored proteins is influenced by the activity of dynamic cortical actin, *Mol. Biol. Cell* 26 (2015) 4033–4045, <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0397>.
- [79] D.V. Köster, K. Husain, E. Ilijazi, A. Bhat, P. Bieling, R.D. Mullins, M. Rao, S. Mayor, Actomyosin dynamics drive local membrane component organization in an *in vitro* active composite layer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E1645–E1654, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1514030113>.
- [80] X. Su, J.A. Ditlev, E. Hui, W. Xing, S. Banjade, J. Okrut, D.S. King, J. Taunton, M.K. Rosen, R.D. Vale, Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction, *Science* (2016) 595–599, [aad9964](http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9964) <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9964>.
- [81] S. Banjade, M.K. Rosen, Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors, *Elife* 3 (2014), e04123 <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.2014.3:e04123>.
- [82] P. Li, S. Banjade, H.-C. Cheng, S. Kim, B. Chen, L. Guo, M. Laguno, J.V. Hollingsworth, D.S. King, S.F. Banani, P.S. Russo, Q.-X. Jiang, B.T. Nixon, M.K. Rosen, Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins, *Nature* 483 (2012) 336–340, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10879>.
- [83] J. Xie, C.M. Tato, M.M. Davis, How the immune system talks to itself: the varied role of synapses, *Immunol. Rev.* 251 (2013) 65–79, <http://dx.doi.org/10.1111/immr.12017>.
- [84] M.A. Lemmon, Membrane recognition by phospholipid-binding domains, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 99–111, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2328>.
- [85] A.M. Wawrzyniak, R. Kashyap, P. Zimmermann, Phosphoinositides and PDZ domain scaffolds, *Adv. Exp. Med. Biol.* 991 (2013) 41–57, http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_4.
- [86] D. Milovanovic, M. Platen, M. Junius, U. Diederichsen, I.A.T. Schaap, A. Honigsmann, R. Jahn, G. van den Bogaart, Calcium promotes the formation of syntaxin 1 mesoscale domains through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Biol. Chem.* (2016) <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.716225>.
- [87] A. Sorkin, M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 609–622, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2748>.
- [88] J.R. Silvius, Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1610 (2003) 174–183 [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273603000166> (accessed May 17, 2016)].
- [89] F.R. Maxfield, I. Tabas, Role of cholesterol and lipid organization in disease, *Nature* 438 (2005) 612–621, <http://dx.doi.org/10.1038/nature04399> (accessed March 20, 2016).
- [90] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39, <http://dx.doi.org/10.1038/35036052> (accessed August 19, 2015).
- [91] L.J. Pike, Lipid rafts: bringing order to chaos, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 655–667 [<http://www.jlr.org/content/44/4/655.full> (accessed April 5, 2016)].
- [92] M.F. Hanzal-Bayer, J.F. Hancock, Lipid rafts and membrane traffic, *FEBS Lett.* 581 (2007) 2098–2104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.019>.