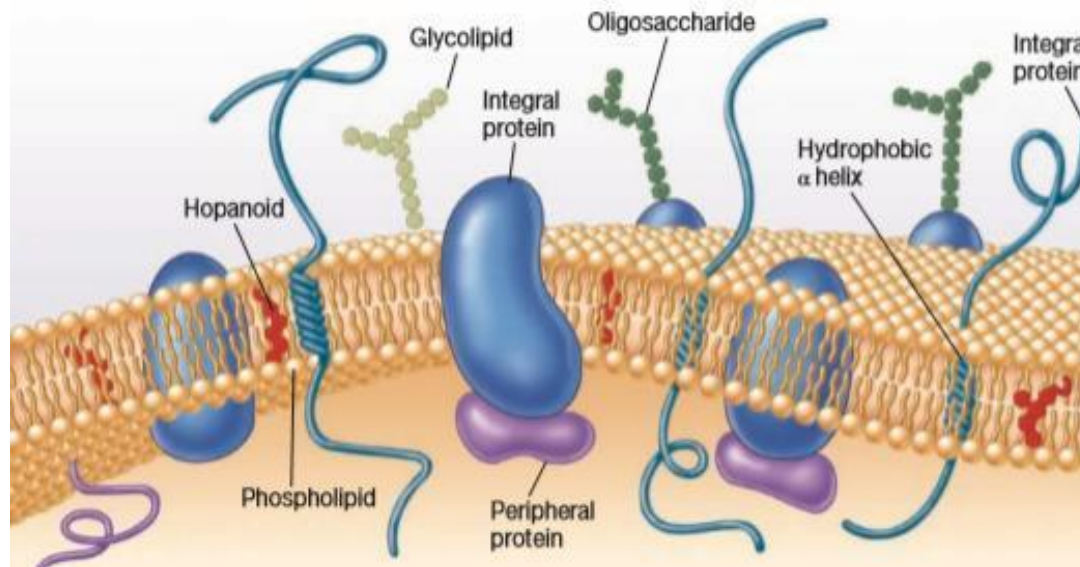


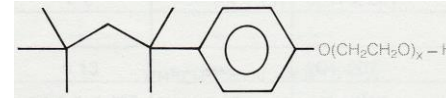
Struktura lipidnih mikrodomen

Singer-Nicholsonov model organizacije BM kot tekočega (fluidnega) mozaika (1972)

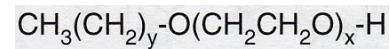


Le **del** BM je **topen** pri nizki T ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) v detergentu:

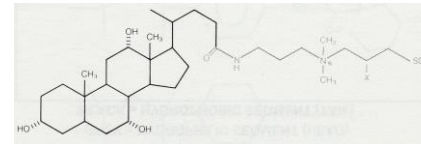
Triton X-100 (NP-40)



Brij-58

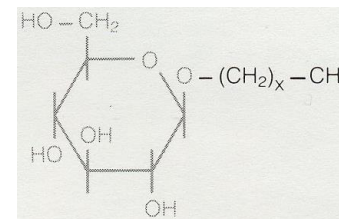


CHAPS



Preostanek membran je topen v detergentu:

oktil glukozid

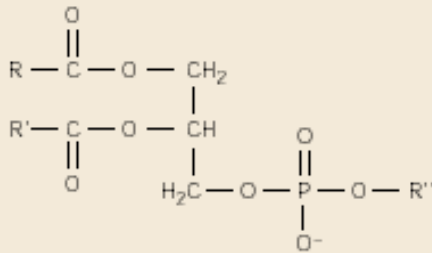


zgoraj naštetih detergentih pri višji T

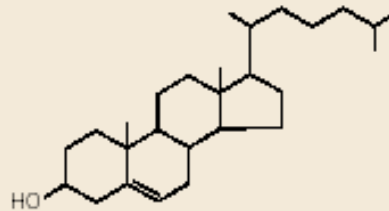
Modelne membrane:

nekateri lipidi preferenčno medsebojno interagirajo in izzovejo fazno ločitev

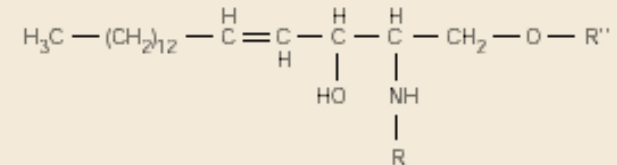
fosfolipidi



holesterol



sfigingolipidi

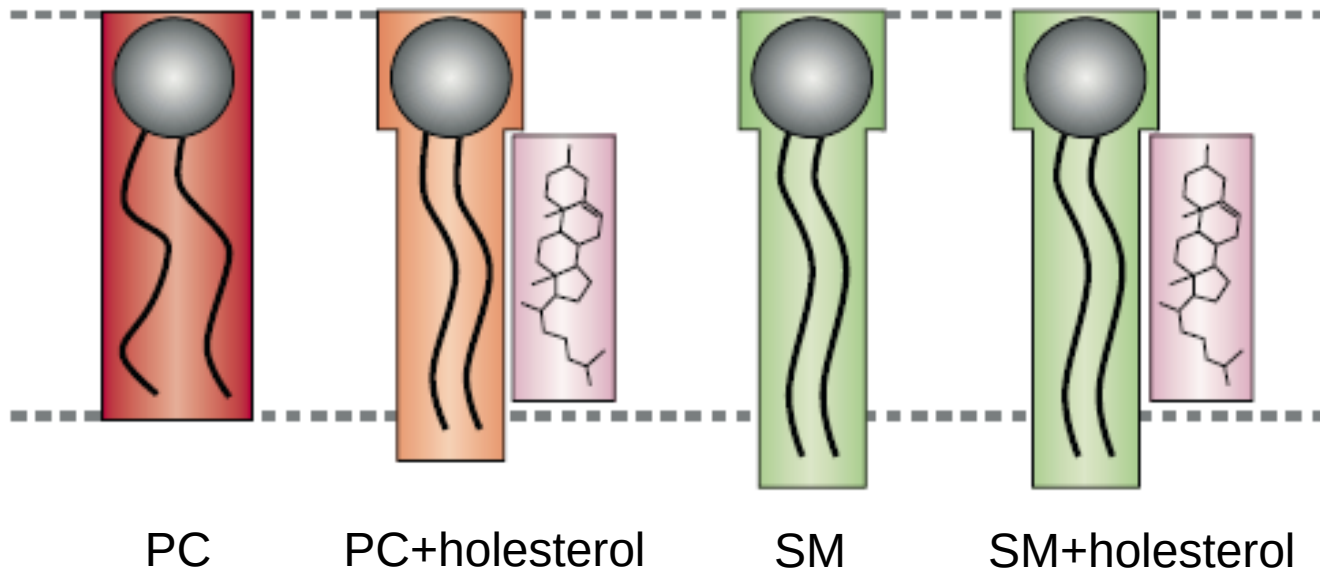


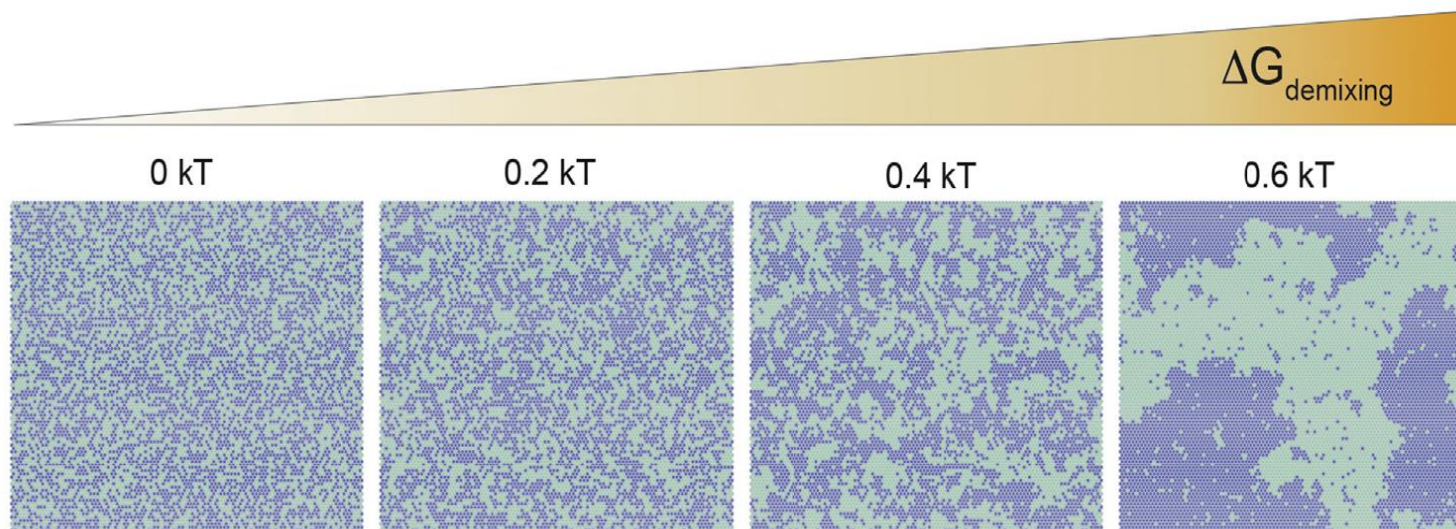
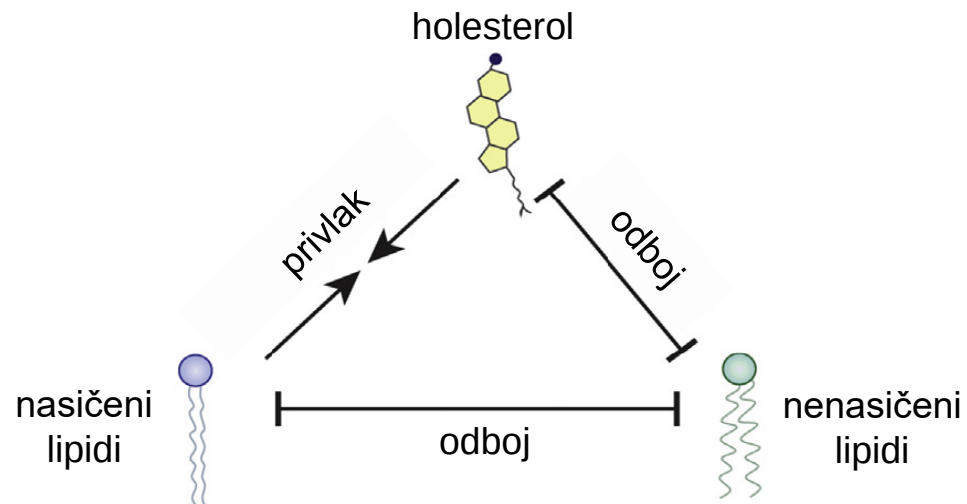
R, R' = CH verige MK
R'' = 'glava' PL/SL

Lipidi tvorijo:

- strukturo gela (pol-trdna)
- **tekočo-urejeno strukturo**
- tekočo-neurejeno strukturo (tekoči mozaik)

Holesterol lahko izzove ločitev (segregacijo) tekočih faz





Spreminjanje vsebnosti sestavin lipidnih raftov

Sekvestracija holesterola

- **Antibiotiki:**
filipin, nistatin, amfotericin
- **Porotvorne snovi:**
saponin, digitonin, streptolizin O

Ekstrakcija holesterola

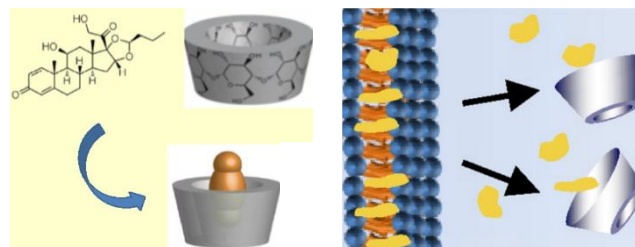
- metil- β -ciklodekstrin

Inhibicija sinteze holesterola

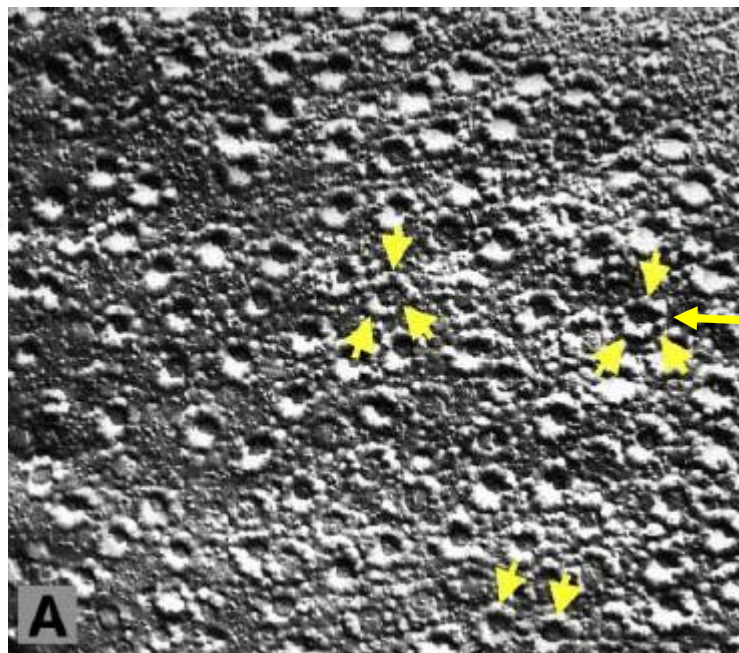
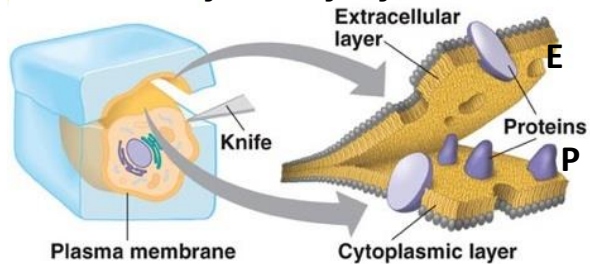
- lovastatin

Perturbacija stabilnosti rafta

- Eksogeni holesterol
- Eksogeni gangliozidi
- Eksogene polinenasičene maščobne kisline

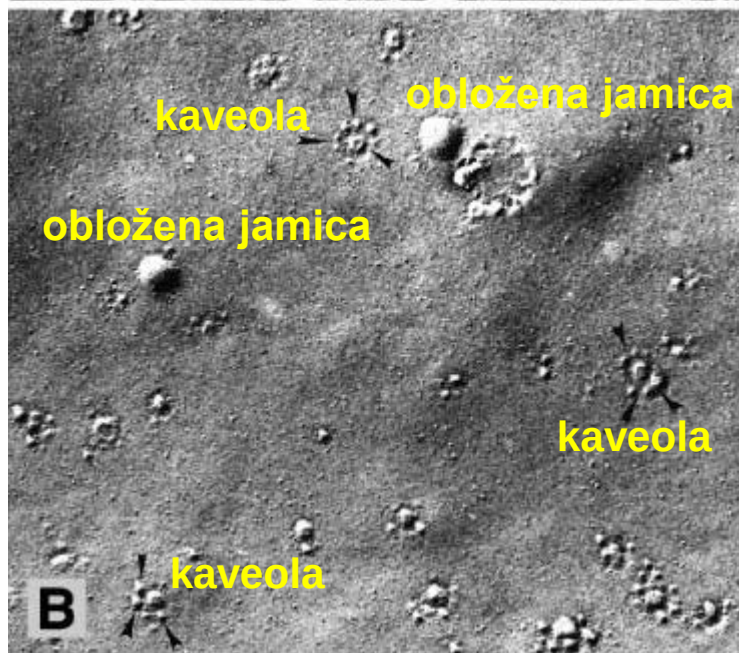


Zamrzovanje-lomljenje



PM endotelijske celice
Proto- ali P-stran

Oborina kompleksa
filipin-holesterol

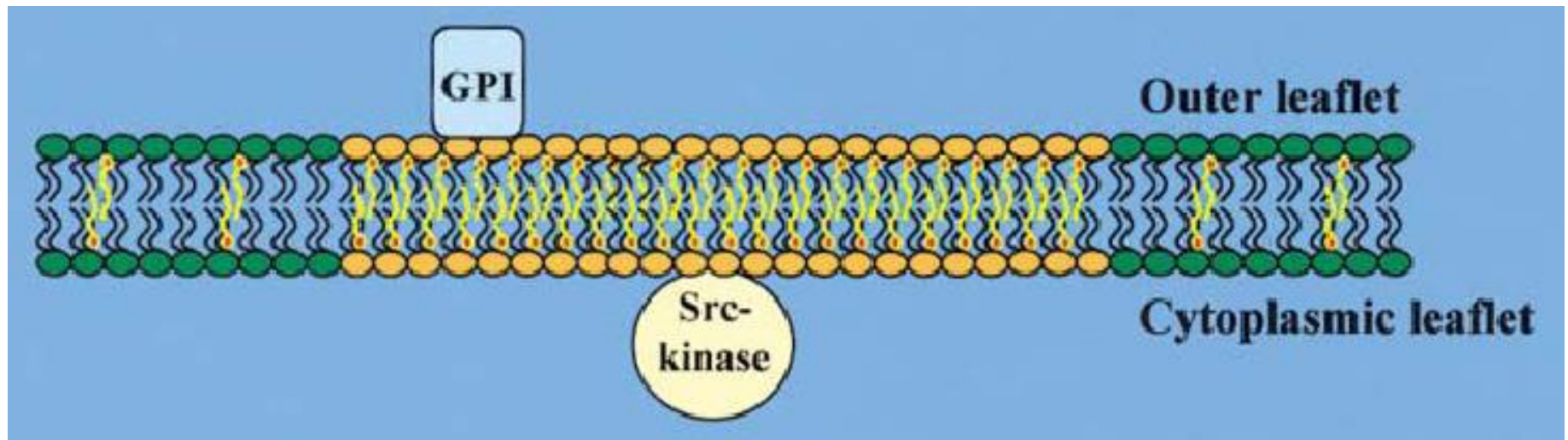


PM celice gladke mišice
Ecto- ali E-stran

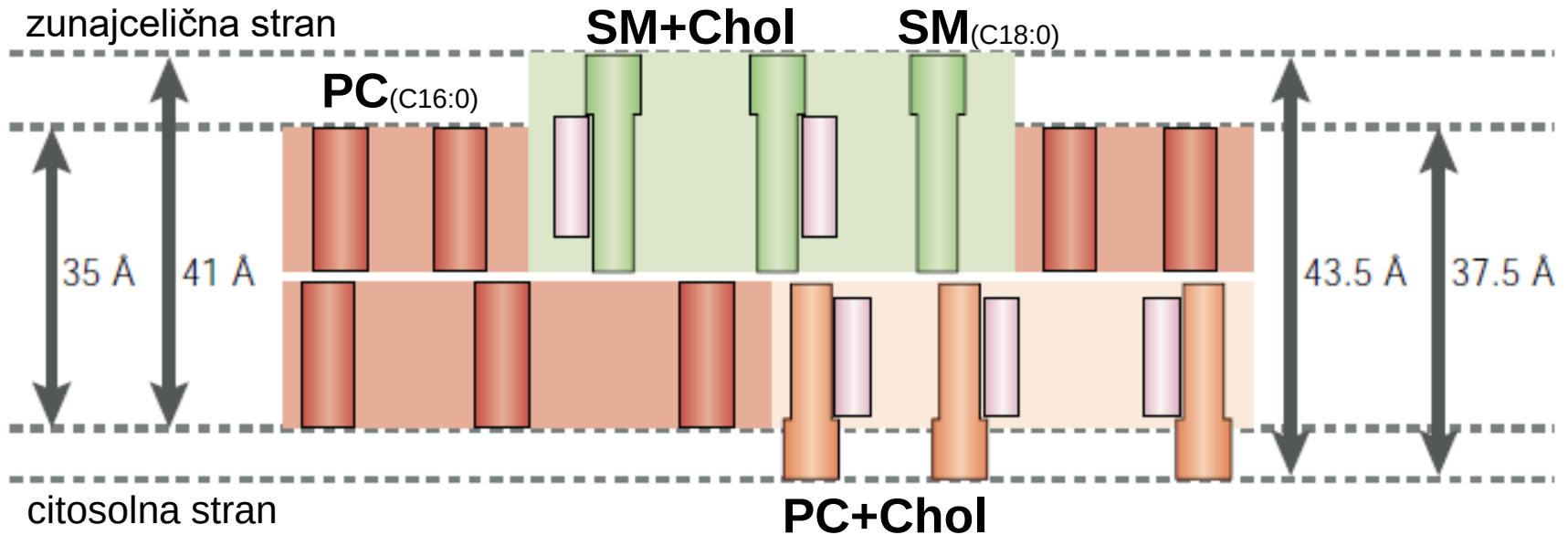
**Holesterol v BM
ni enakomerno
razporejen!**

BM so notranje urejene:

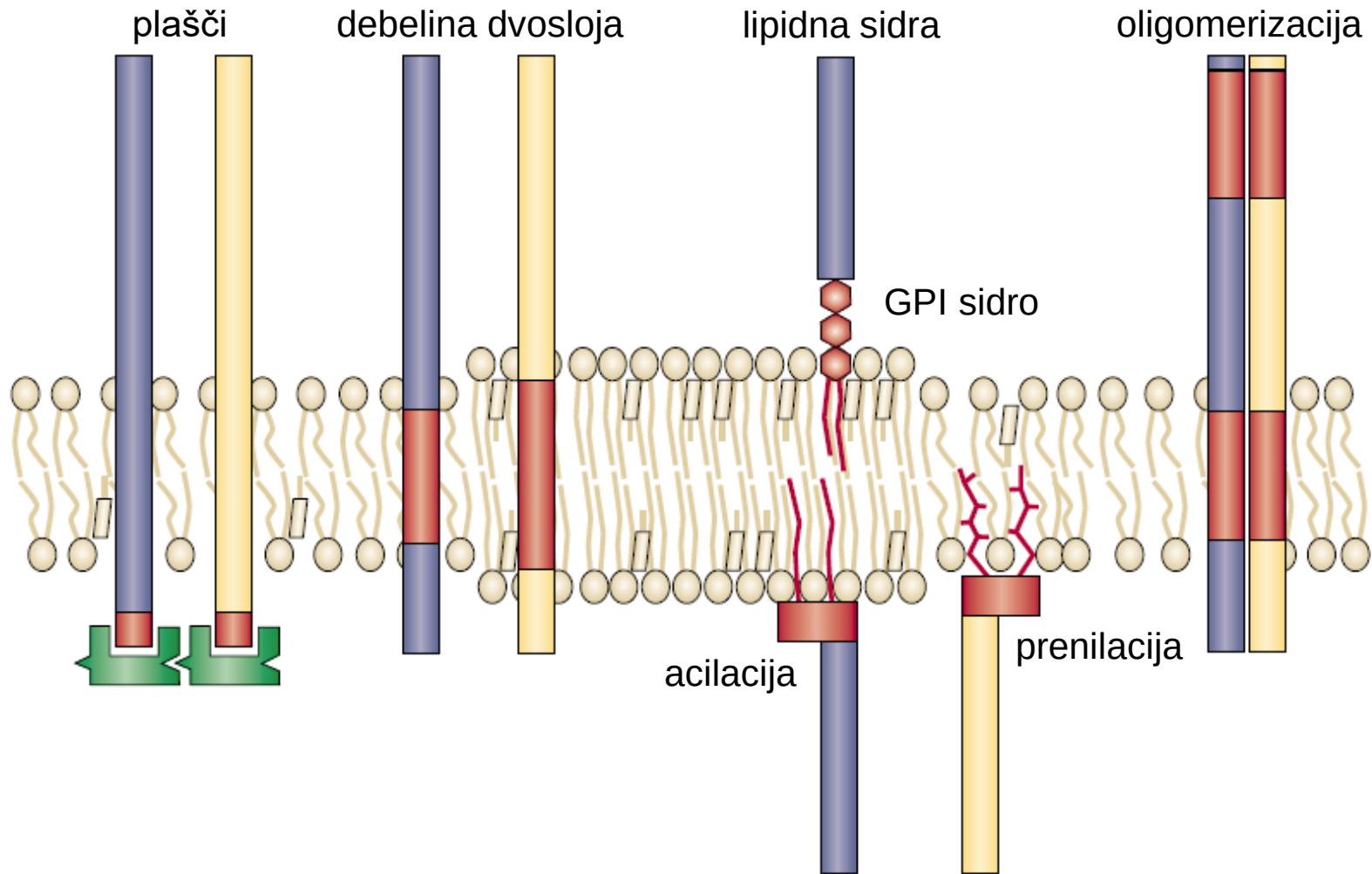
koncept lipidnega rafta



Debelina lipidne membrane je odvisna od njene sestave

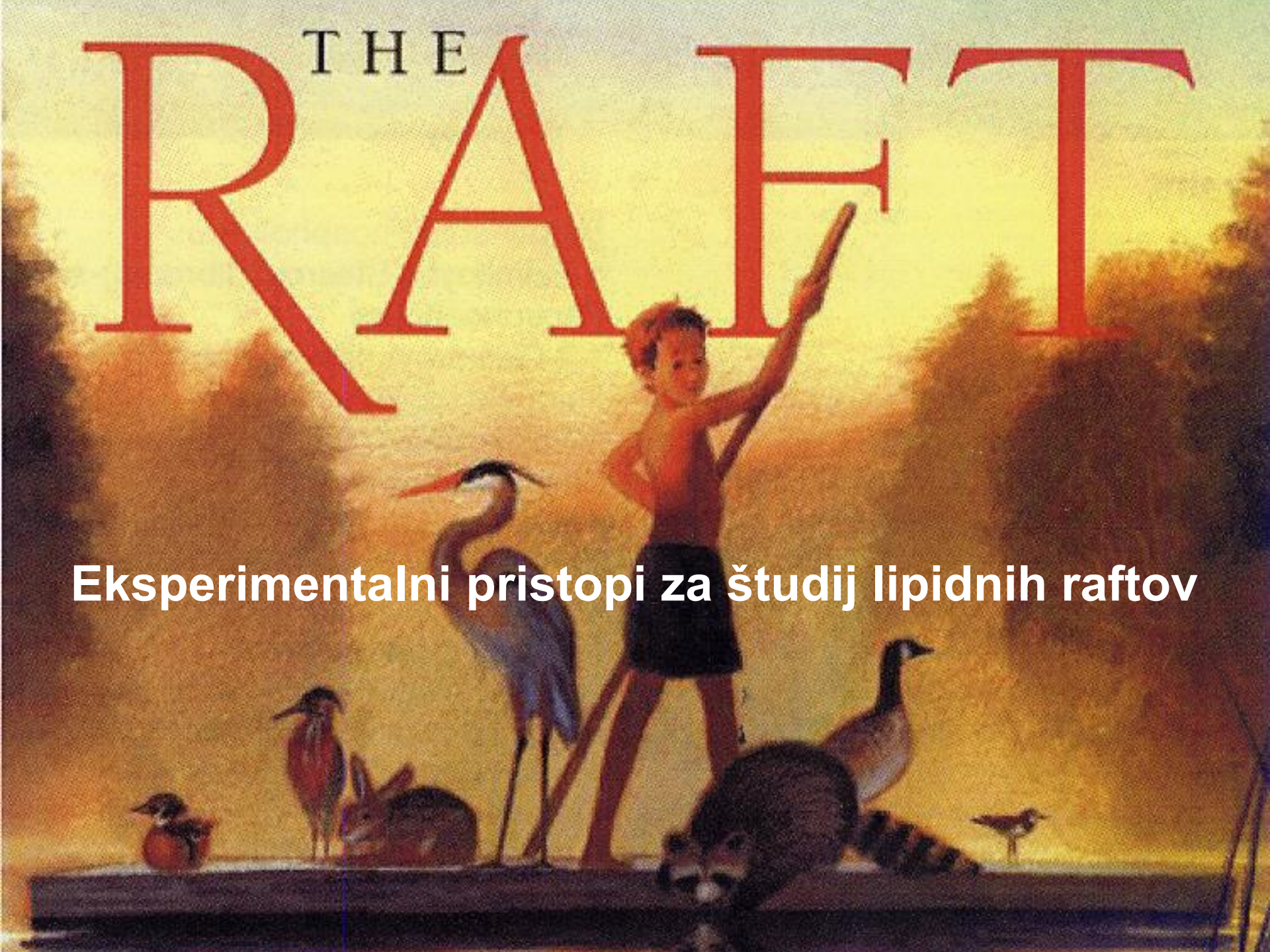


Lateralno razvrščanje membranskih proteinov

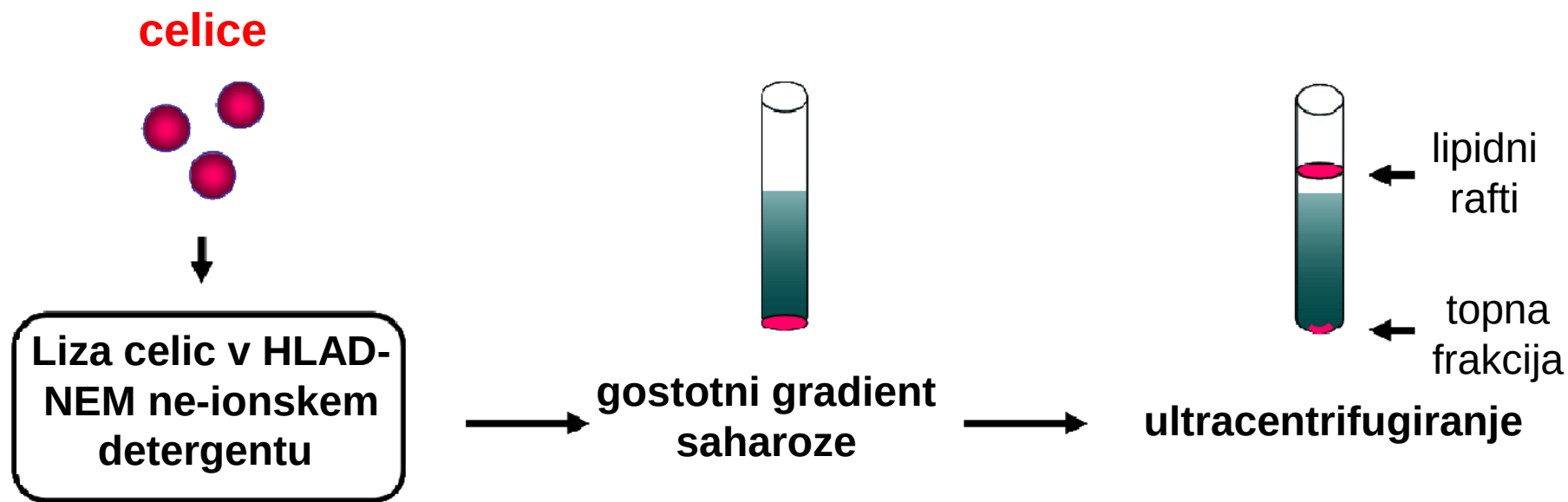


THE RAFT

Eksperimentalni pristopi za študij lipidnih raftov



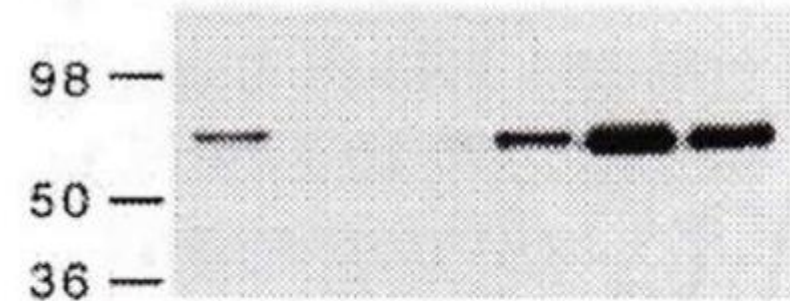
Flotacija v detergentu-netopnih membran



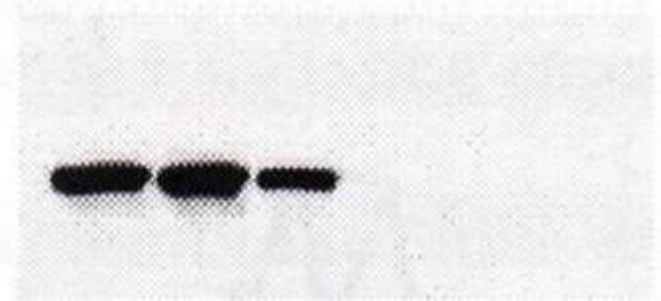
Raztapljanje BM v 2% (v/v) TR X-100 pri 4°C ali 30°C in analiza vzorca s centrifugiranjem v gradientu saharoze (flotacijska analiza).

PLAP (PLacental Alkaline Phosphatase)

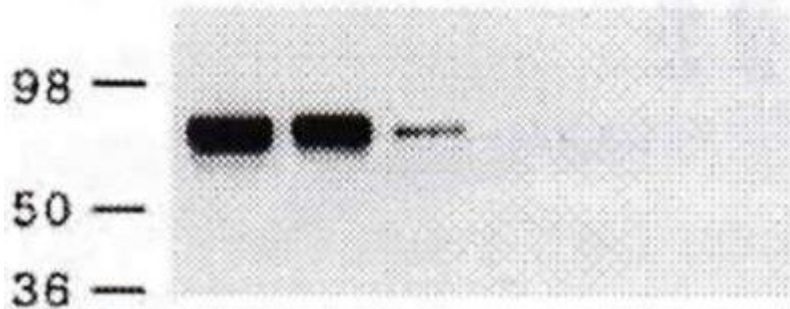
VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein)



0 °C



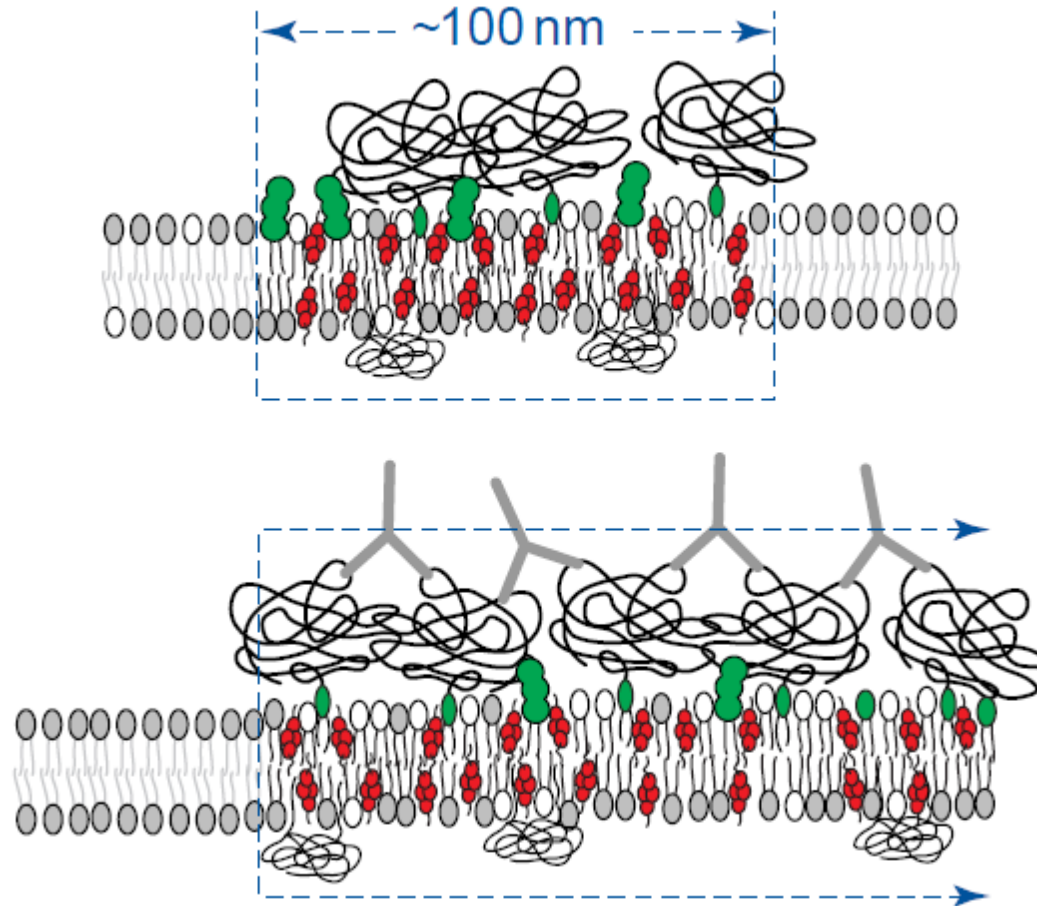
30 °C



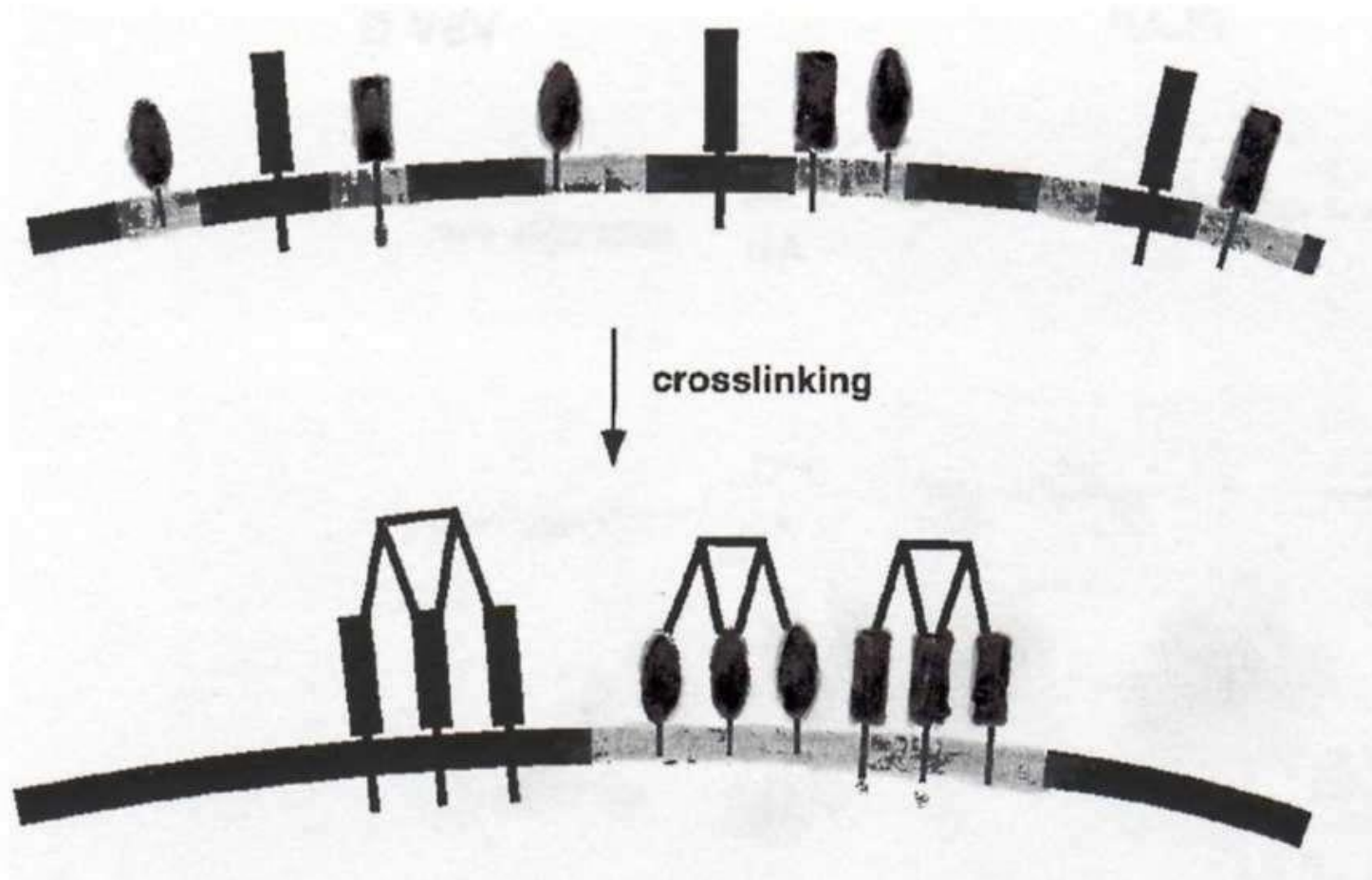
višja → nižja gotota

višja → nižja gotota

Skepljanje membranskih komponent (patching)

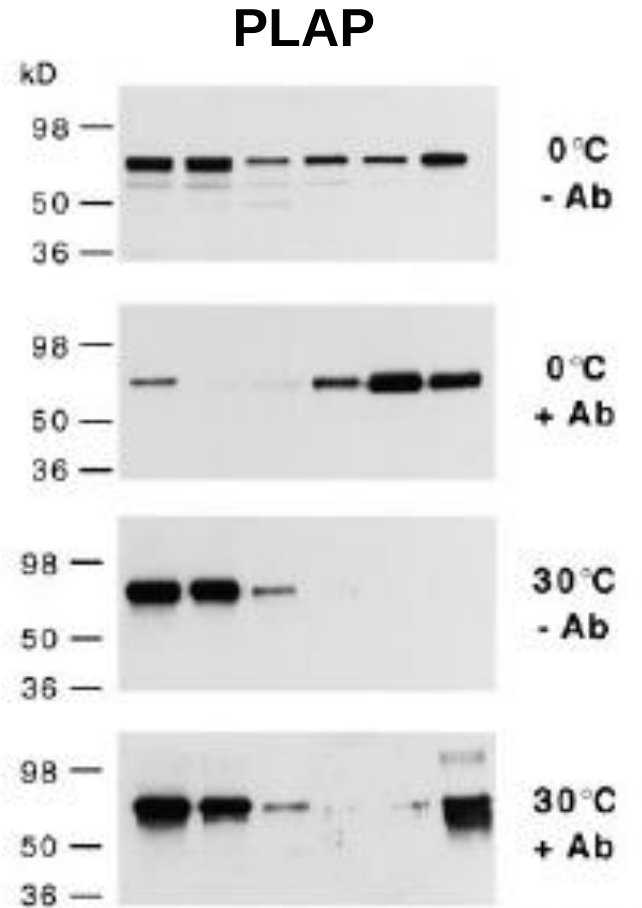


Ločevanje membranskih faz s skepljanjem membranskih komponent (patching)



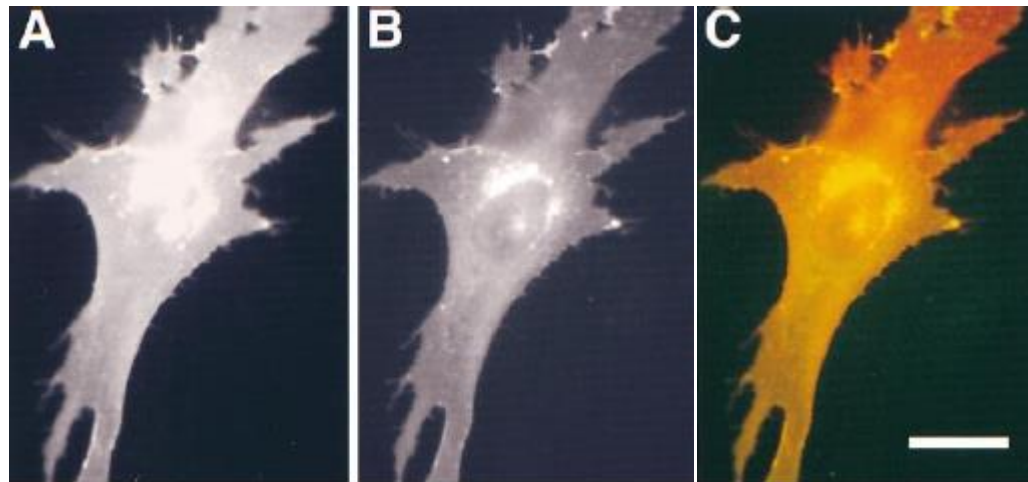
Stabilizacija membranskih domen s prečnim povezovanjem MP s protitelesi

GPI-protein PLAP izražen v nepolariziranih fibroblastoidnih BHK-21 celicah

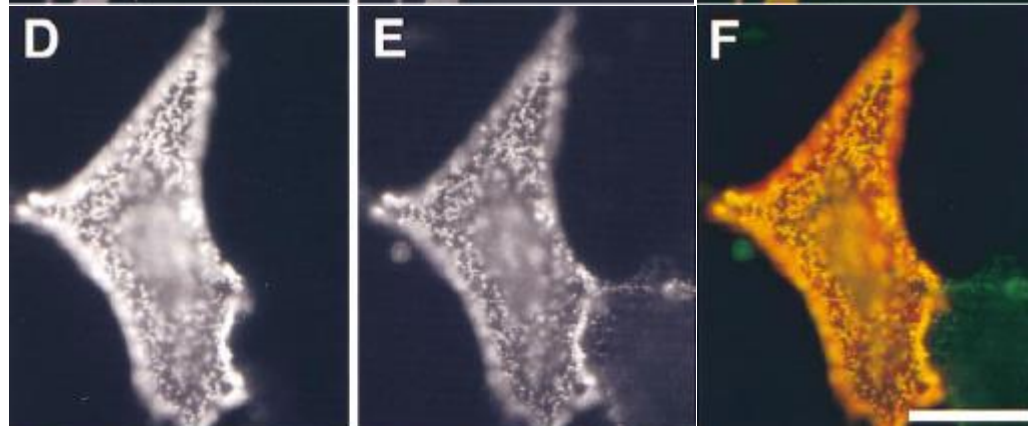


višja → nižja gostota

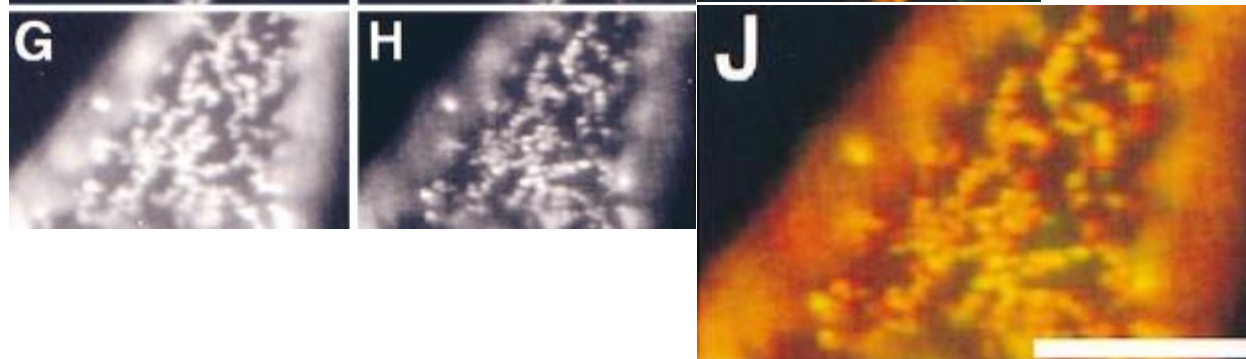
Skepljanje PLAP (rdeče) in HA (zeleno), proteina iz virusa gripe, so-izraženih v nepolariziranih BHK-21 celicah



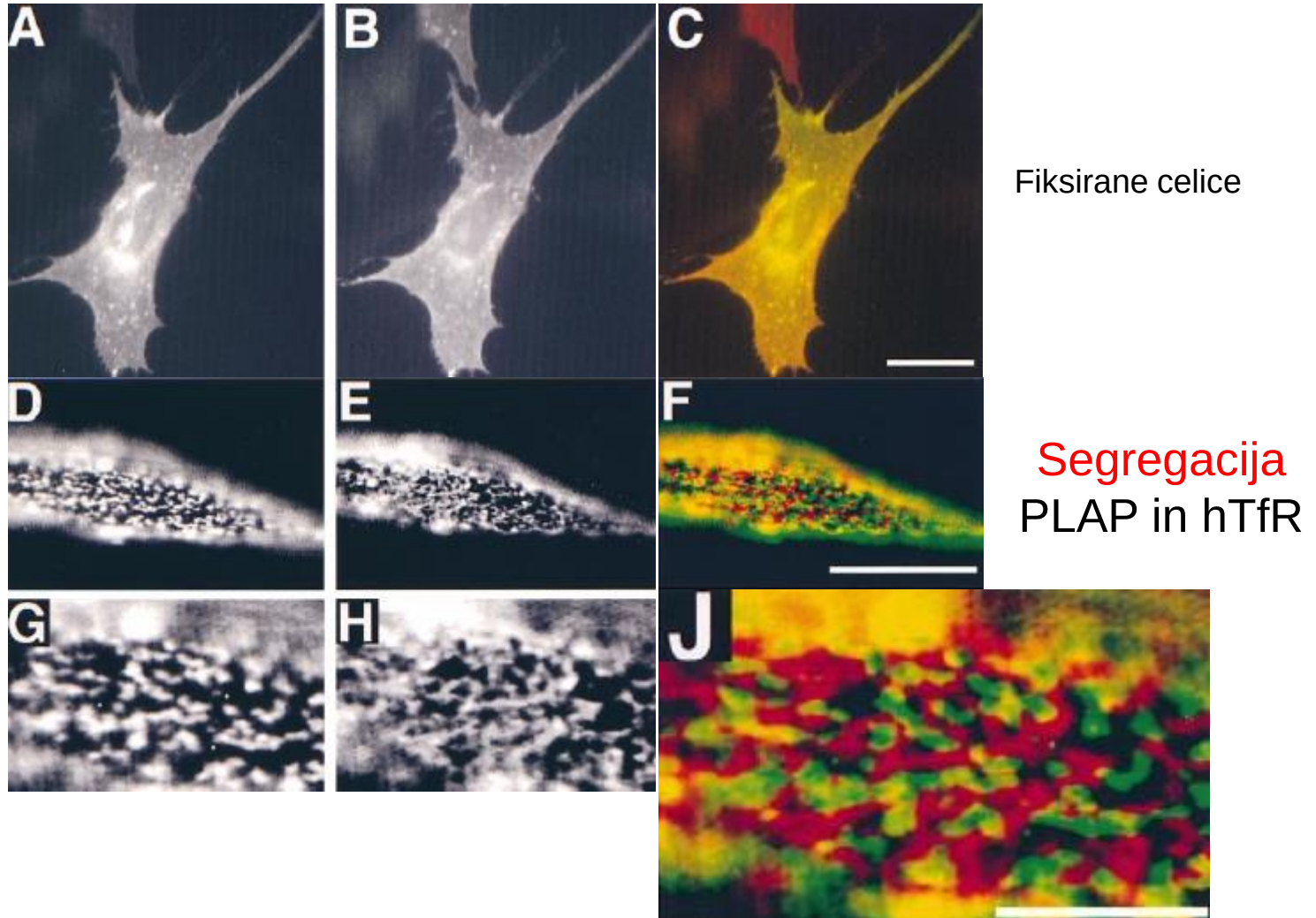
Fiksirane celice



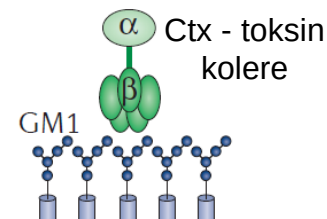
Kolokalizacija
PLAP in HA



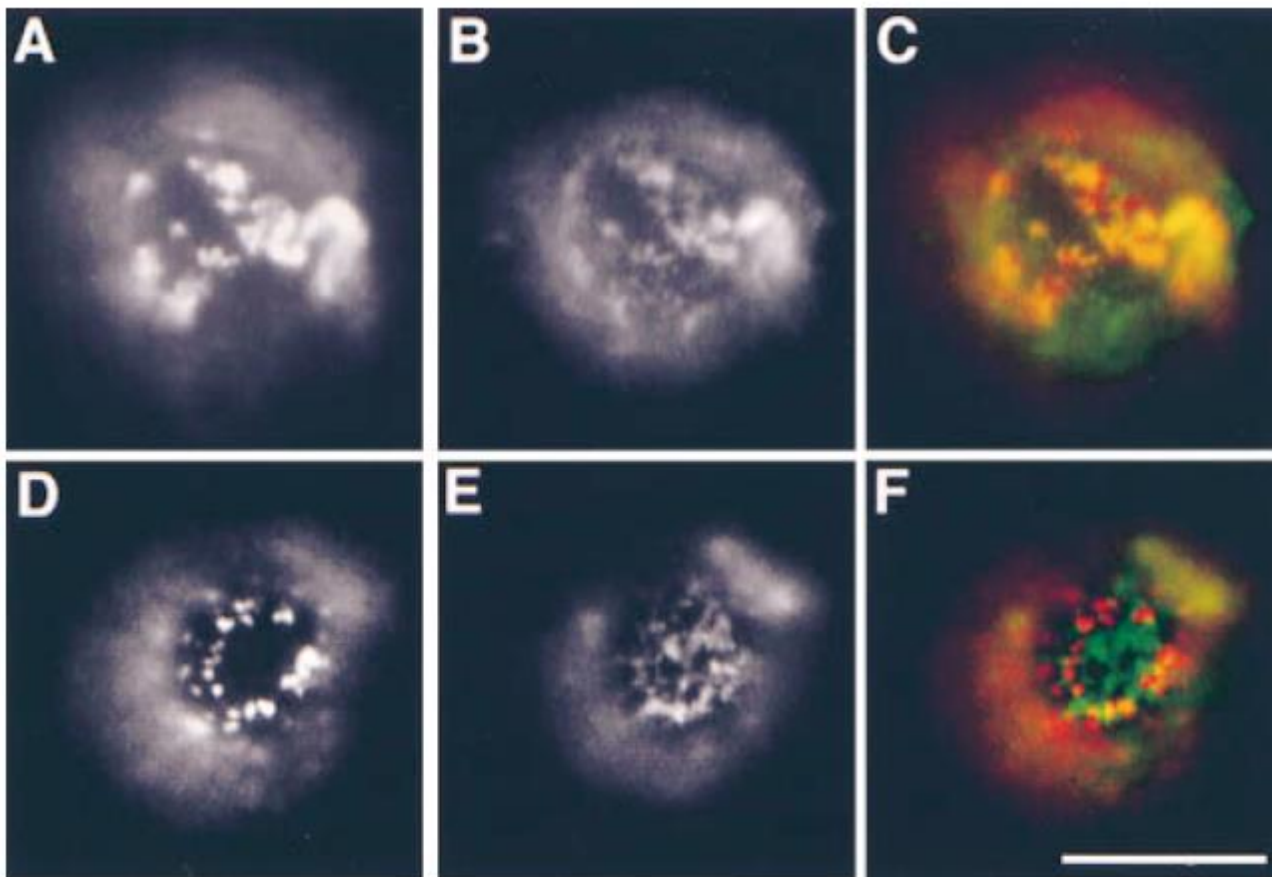
Skepljanje PLAP (zeleno) in hTfR (rdeče), človeškega receptorja za transferin, so-izraženih v nepolariziranih BHK-21 celicah



Skepljanje PLAP ali hTfR (rdeče), prehodno izraženih v nepolariziranih Jurkat celicah, in gangliozida GM1 (zeleno)

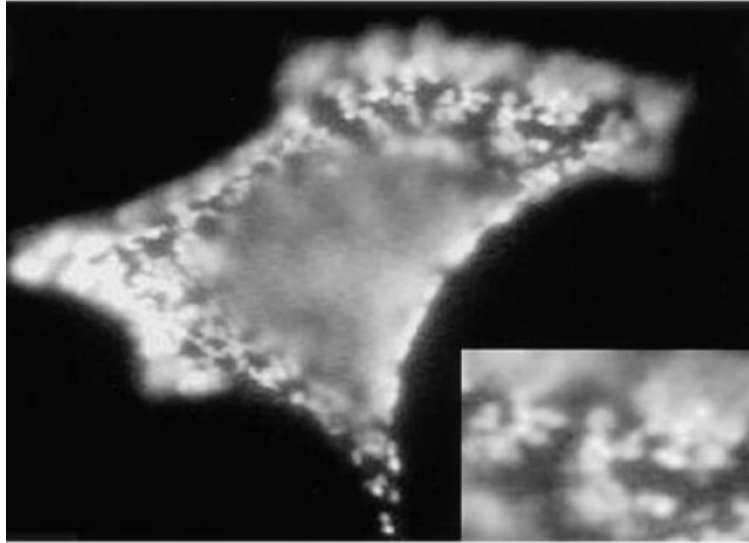


Kolokalizacija
PLAP in GM1

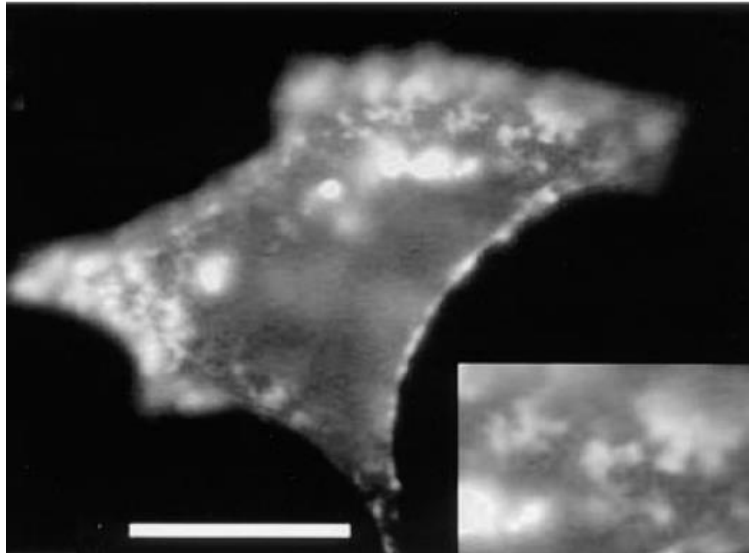


Segregacija
hTfR in GM1

**Skepljanje PLAP v BHK-21 celicah izzove enak vzorec
akumulacije src-podobne Tyr kinaze Fyn na citosolni strani PM**



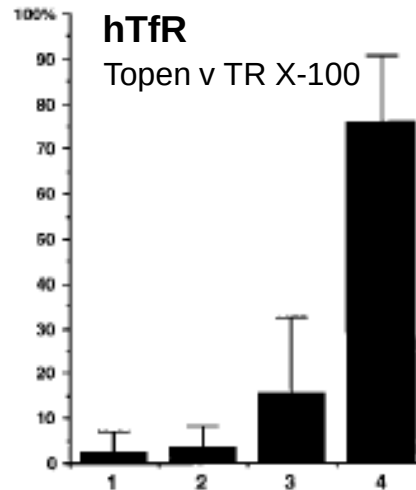
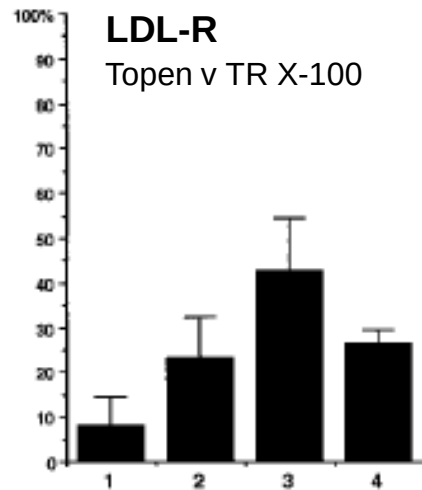
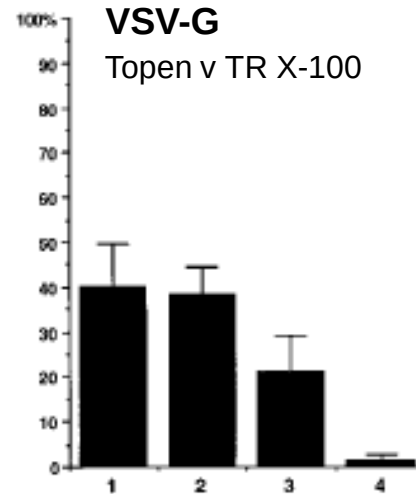
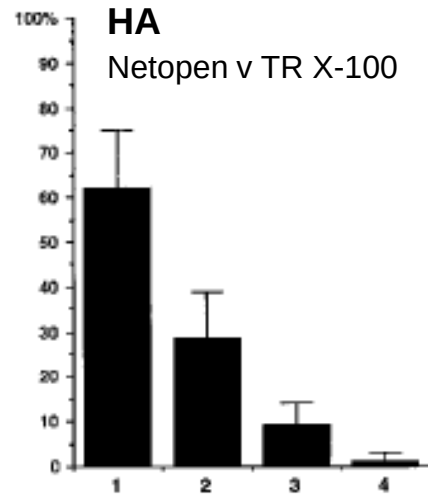
Razporeditev PLAP
po **skepljanju z Ab**



Razporeditev Fyn
po **skepljanju PLAP**

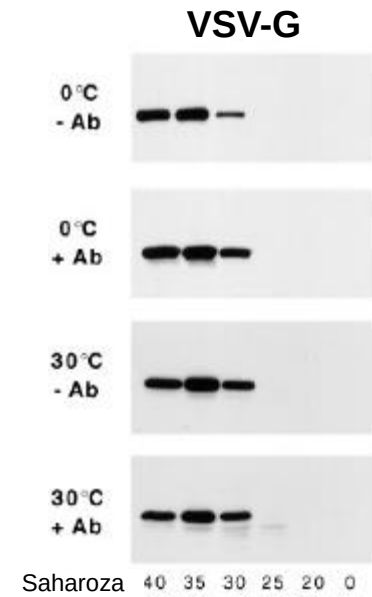
Nekateri proteini izražajo šibko, a občutno interakcijo z rafti, ki je ne moremo zaznati s kriterijem topnosti v TR X-100

Stopnja kolokalizacije s skepljenim PLAP



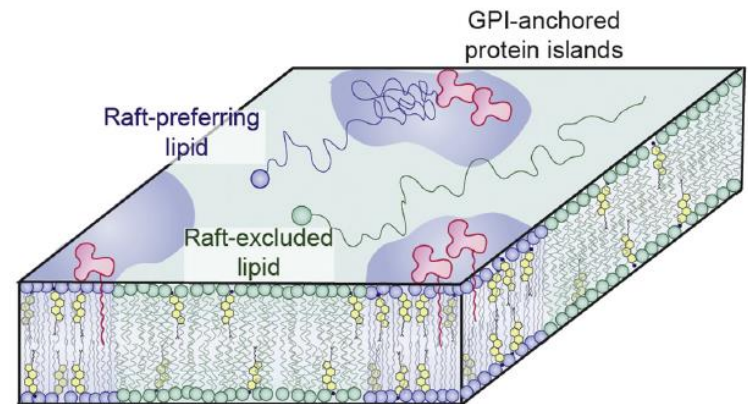
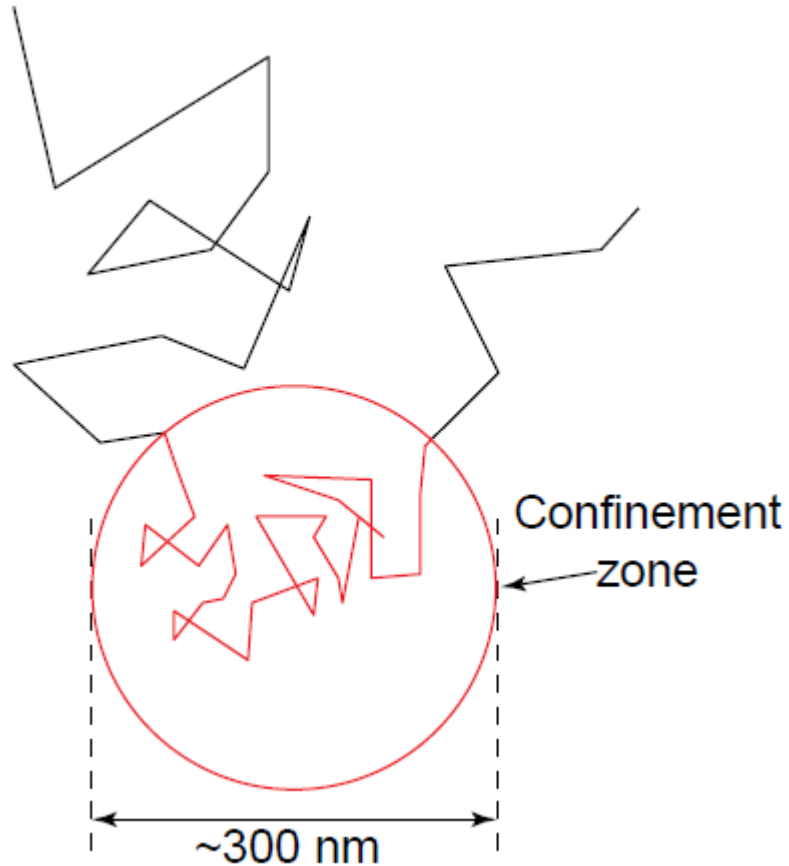
- (1) >80% prekrivanje
- (2) Delno prekrivanje
- (3) Delna segregacija
- (4) Popolna segregacija

Topnost v TR X-100



Sledenje posameznemu delčku (angl. 'Single Particle Tracking' – SPT)

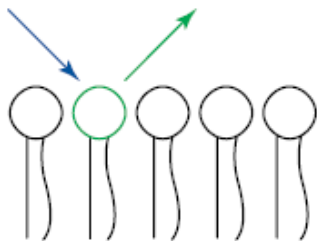
SPT



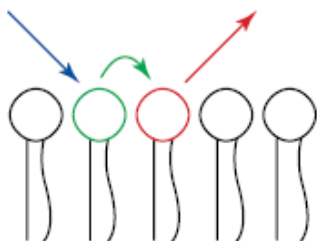
Prenos energije fluorescenčne resonance – FRET

Fluorescence
Resonance
Energy
Transfer

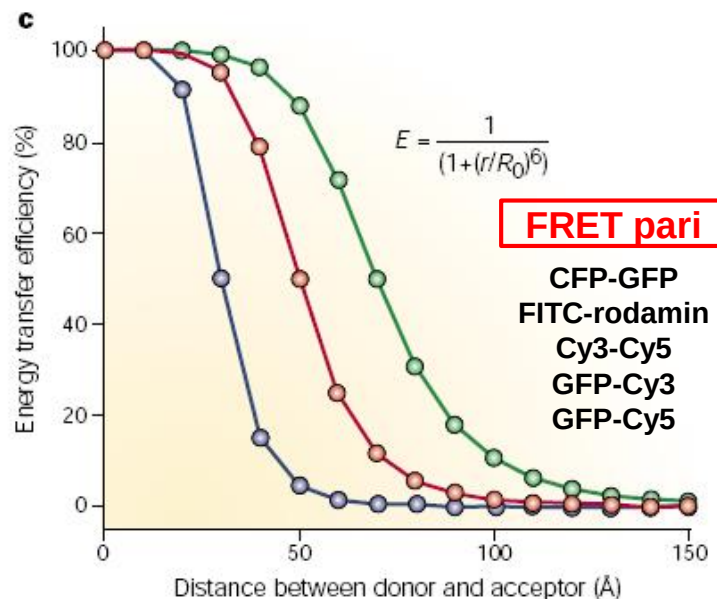
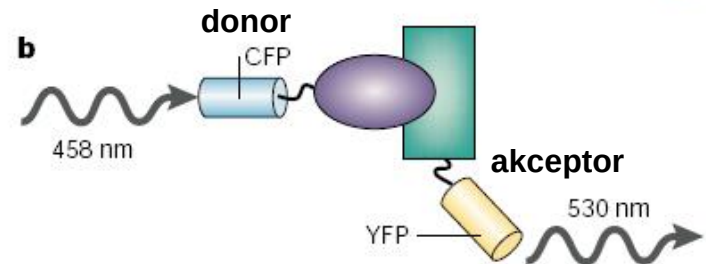
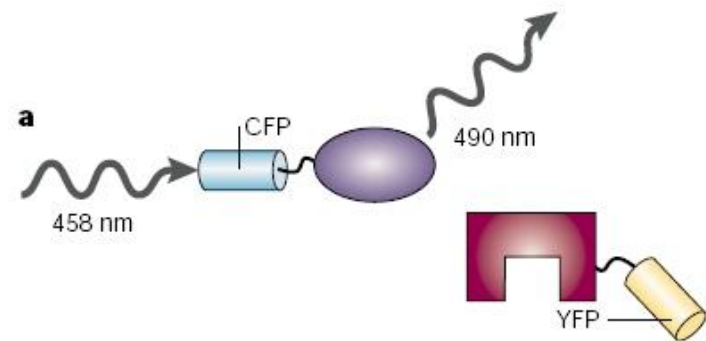
Conventional FRET
Excitation Emission



Normal donor emission in dilute solution

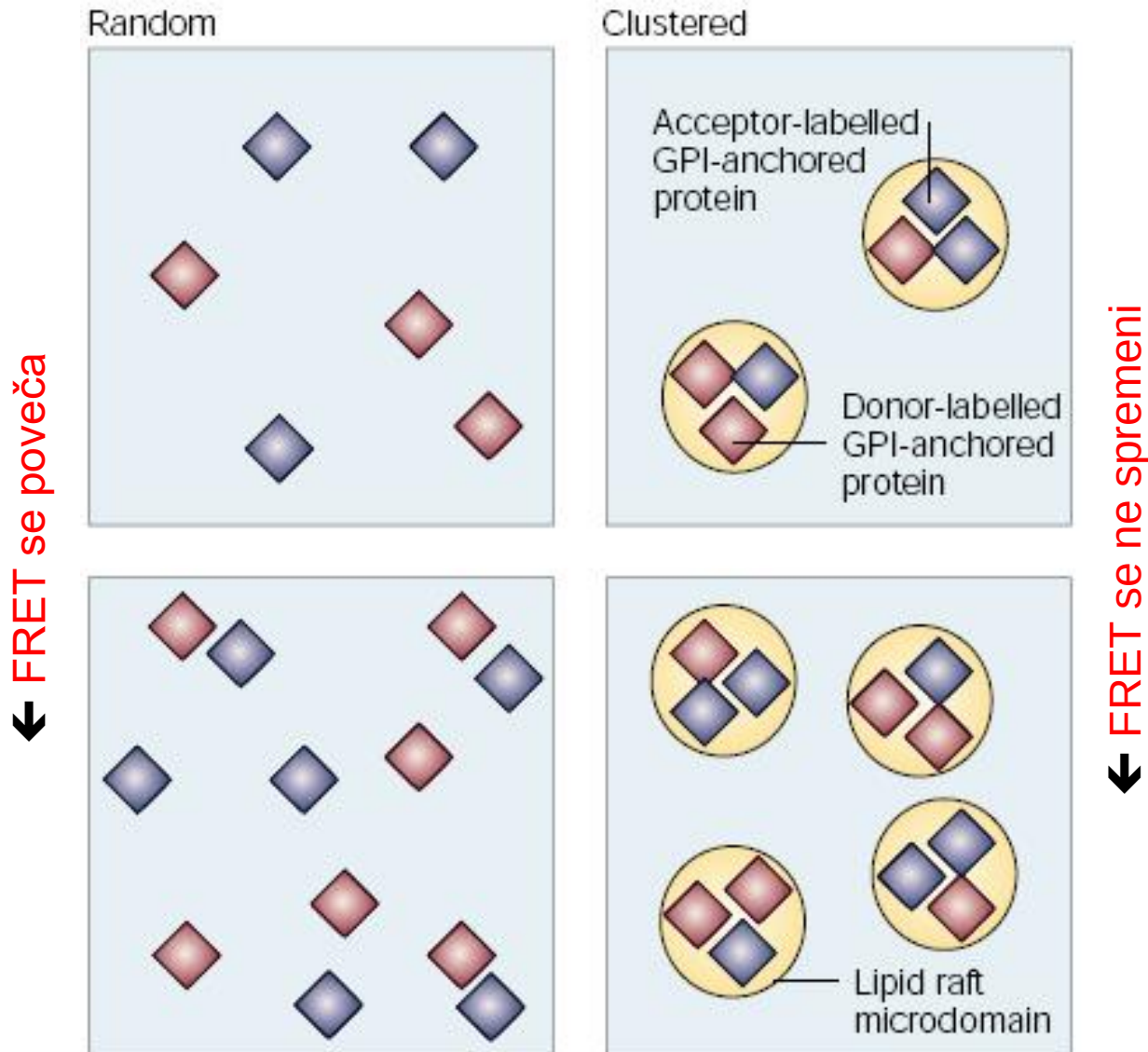


Red-shifted acceptor emission via donor-acceptor energy transfer in concentrated solution



FRET za detekcijo lipidnih raftov

FRET kot funkcija površinske gostote donorja in akceptorja



Metoda	Pridobljena informacija	Žive celice	Komentarji
Flotacija za raztapljanje v detergentu-odpornih membran (DRM)	Potencialna asociacija z rafti	Ne	• Preprosta izvedba • Najbolj običajna identifikacija potencialnih signalizacijskih proteinov • Artefakti so možni • Težko zazna šibko asociacijo z rafti
Skepljanje s protitelesi in imunofluorescenčna mikroskopija	Potencialna asociacija z rafti	Ne	• Preprosta izvedba • Običajen pristop • Bolje od flotacije zazna šibko asociacijo z rafti • Zahtevna kvantifikacija zaradi variabilnosti od celice do celice
Imunoelektronska mikroskopija	Lokacija raftnih komponent	Ne	• Obetavni rezultati • Tehnično zahtevna
Prečno povezovanje na kemijski način	Identifikacija kompleksov nativnih raftnih proteinov	Da	• Neposredna • Empirična izbira primernih pogojev in reagentov
Mikroskopsko sledenje posamičnega fluorofora	Difuzija in dinamika posamezne molekule v membrani	Da	• Zahteva visoko specializirano opremo in usposobljenost
Mikroskopija na fotonsko silo	Difuzijska konstanta, velikost in dinamika posameznih raftov	Da	• Zelo informativna tehnika • Zahteva visoko specializirano opremo in tehnično izurjenost • Časovno potraten zajem podatkov in analiza rezultatov
FRET	Bližina dveh raftnih komponent v prostoru (npr. <10 nm)	Da	• Zelo zmogljiva tehnika • Pomembna je izbira ustreznega para donor–akceptor

Komponente raftov / kaveol

Lipidi

Holesterol
Sfingomielin
Glikosfingolipidi (npr. GM₁)
PIP₂

Proteini

Integralni/strukturni

Kaveolini (Cav-1, Cav-2 in Cav-3)
Flotilini (FLO-1 in FLO-2, aka, Reggies ali Cavatellini)
LAT/PAG
MAL/BENE
Stomatini
VIP36

Acetilirani

Eksoplazemski
GPI-vezani proteini (npr. Thy-1, alkalna fosfataza, folatni receptor)

Citoplazemski

Tyr kinaze iz družine Src (NRTK)
G proteini
eNOS
H-Ras

'Scavenger' receptorji

CD36
SRBI
RAGE

Drugi receptorji

Receptorji Tyr kinaze (RTK) (npr. EGF-R, PDGF-R, insulinski R)
Heptahelikalni receptorji (npr. endotelinski R)

Razporeditev in gibanje raftov sta odvisna od vrste celice

Polarizirana epiteljska celica (tesni stiki)

- akumulacija v apikalnem delu PM

Motorični nevron (citoskelet, zunajcelični matriks)

- akumulacija v aksonskem delu PM

Osteoklast (citoskelet, zunajcelični matriks)

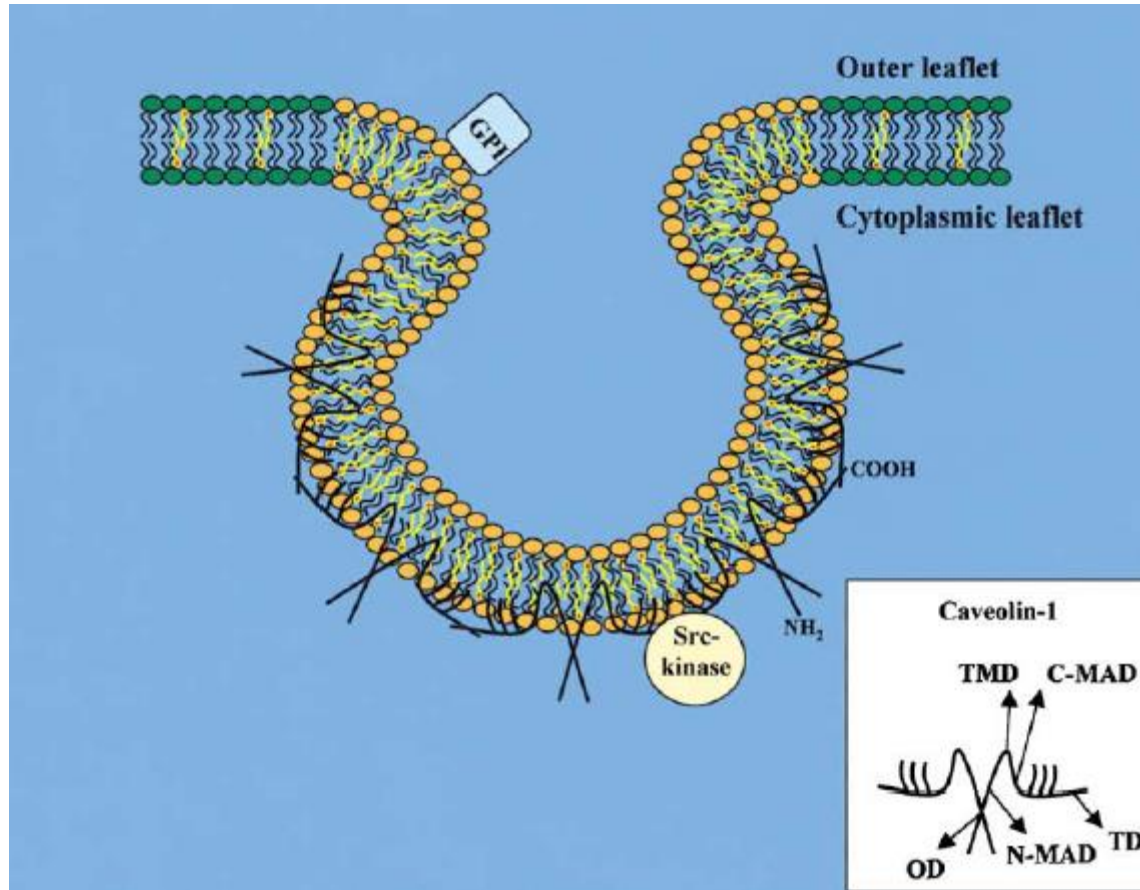
- asimetrična porazdelitev v PM

Limfocit in fibroblast

- enakomerna porazdelitev v PM

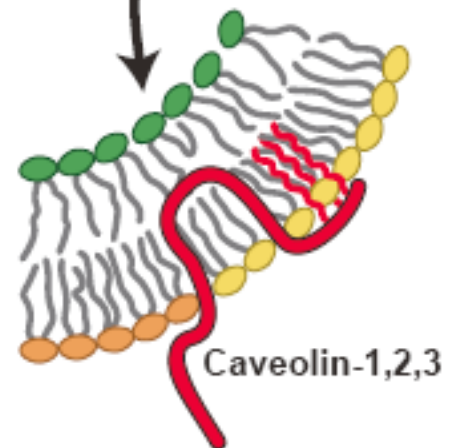
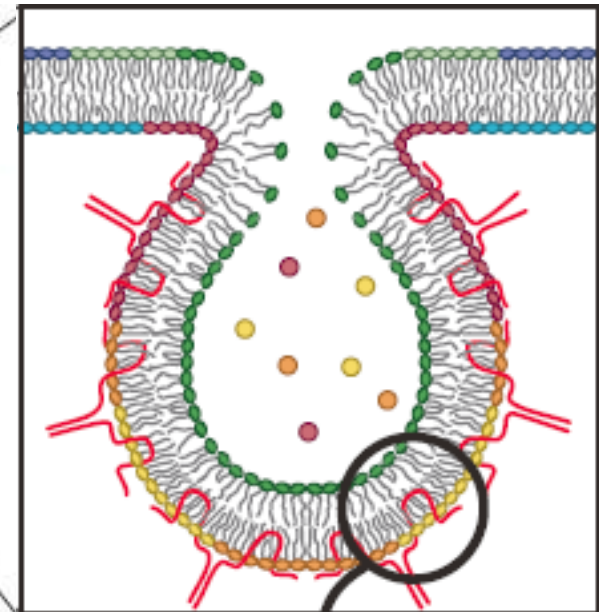
Kaveola (caveolae)

vrsta visoko-specializiranega lipidnega rafta



'Anatomija' kaveole

Hu fibroblast



Kaveolini (Cav)

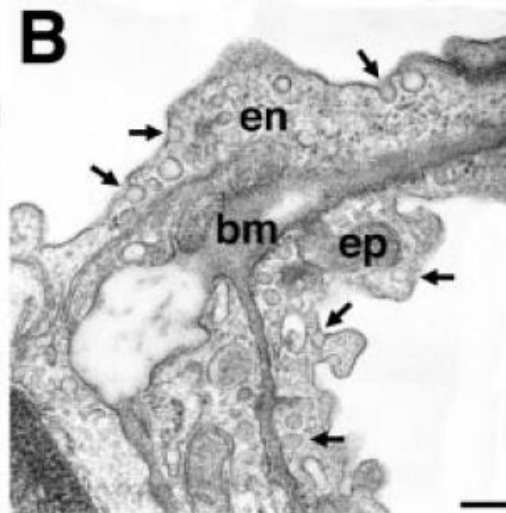
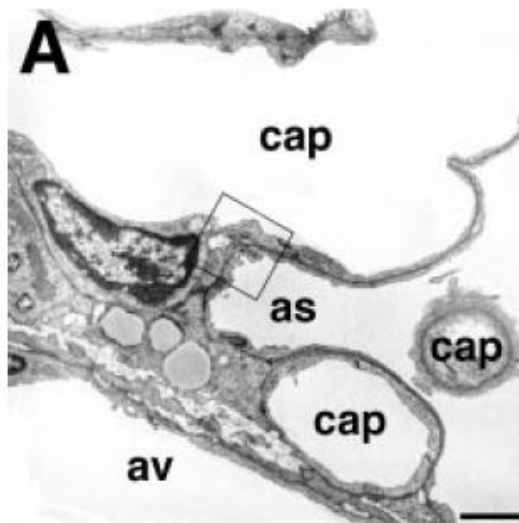
- Nujni za nastanek kaveole.
- Družina genov *Cav* je strukturno in funkcijsko ohranjena od črva (*C. elegans*) do človeka.
- Pri sesalcih: Cav-1 (α in β), Cav-2 in Cav-3 (21- bo 25-kDa).
- Integralni membranski proteini (tri-palmitoilirani).
- Cav-1 in Cav-2 se so-izražata, Cav-3 je mišično-specifičen.
- Polimerizirajo (14-16) in tako oblikujejo kaveolo.
- Vežejo holesterol, maščobne kisline in interagirajo s širokim naborom proteinov, ki sodelujejo pri prenosu signalov (npr. RTyr kinaza, eNOS, G-proteini).
- Limfociti in nevroni jih ne vsebujejo.

Funkcija lipidnih mikrodomen

V celicah $cav-1^{-/-}$ mišk NI kaveol:

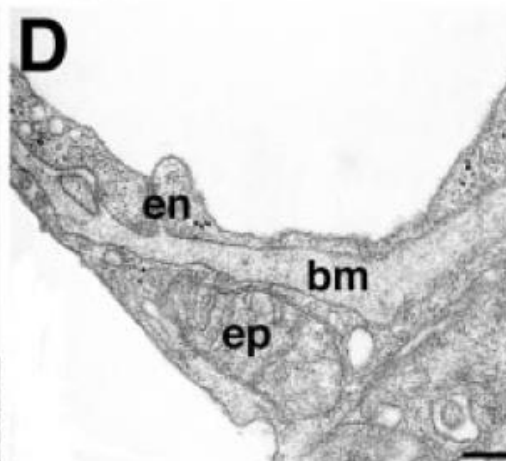
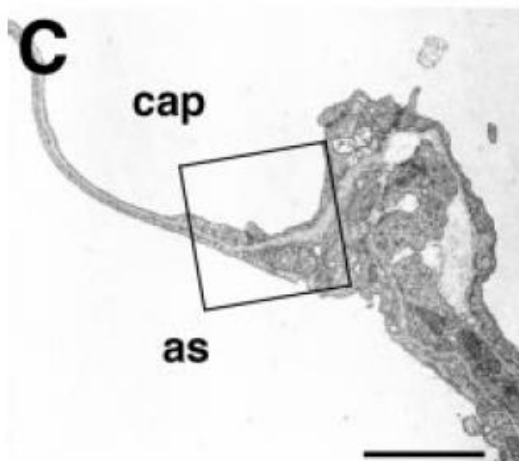
pljučno tkivo pod elektronskim mikroskopom

divji tip (WT)

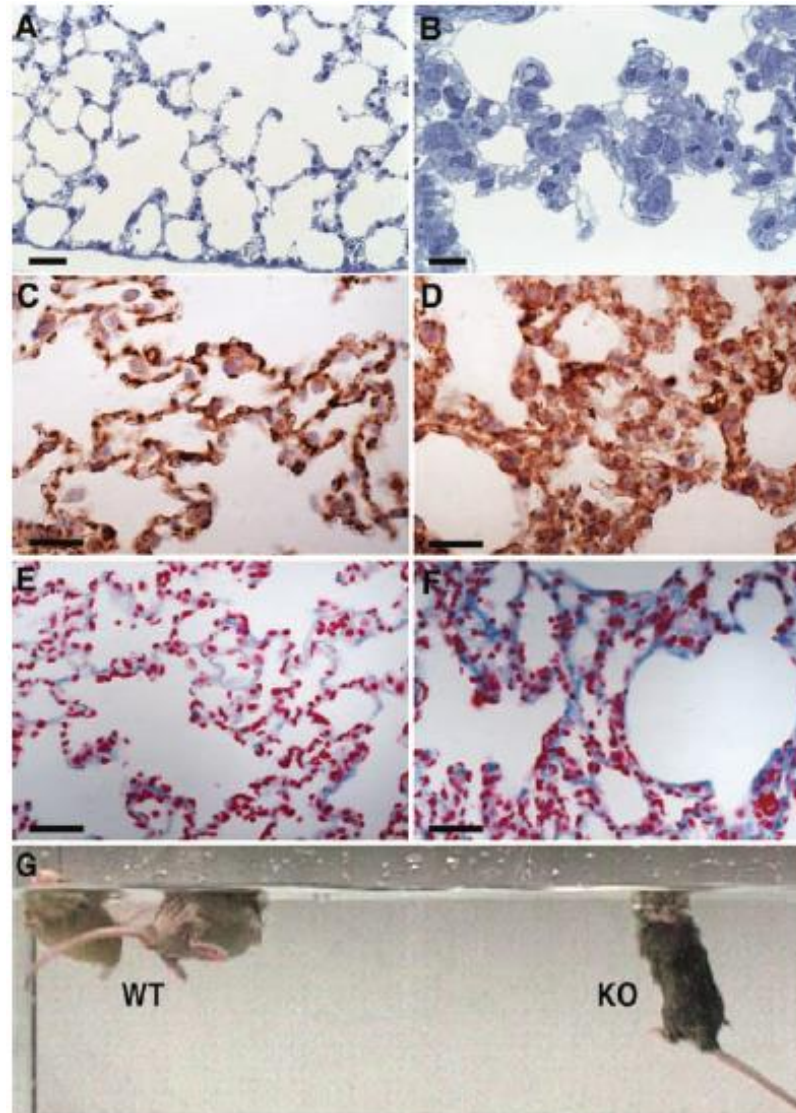


as – alveolarni prostor
cap – kapilara
av – arterija
en – endotelij
ep – epitelij
bm – bazalna membrana

$cav-1^{-/-}$ (KO)



Patomorfološke spremembe pljuč pri cav-1^{-/-} miški rezultirajo v njeni fizični šibkosti



**Odebelitev
alveolarnih sten**

Povzroči jo:

- nenadzorovana rast
endotelijskih celic
(Cav-1 je tumorski supresor)

- Povečana vsebnost
izvenceličnega
fibrilarnega
matriksa (fibroza)

**Rezultat je
fizična šibkost**

Celični procesi, ki vključujejo lipidne rafte

- **Prenos signalov**
- **Transport in razvrščanje proteinov in lipidov**
- **Od klatrina neodvisna endocitoza:**
 - kaveolin-odvisna (potocitoza)
 - kaveolin-neodvisna endocitoza
- **Homeostaza Ca^{2+}**

Nekatere signalne molekule v lipidnih raftih

Transmembranski receptorji

EGF receptor

Bradikininski receptor B2

Eph receptorji

TCR

BCR

Fc ϵ RI

Integrini β 1

Lipidne signalizacijske molekule

Sfingomielin

Ceramid

Fosfoinozitidi

Diacilglicerol

GPI-proteini

CD59

uPAR

Efrin A5

Signalni efektorji

G α i1, G α i2, G α i3

Src-kinaze

Ras

PKC α

Shc

Adenilat ciklaza

eNOS

PLC γ

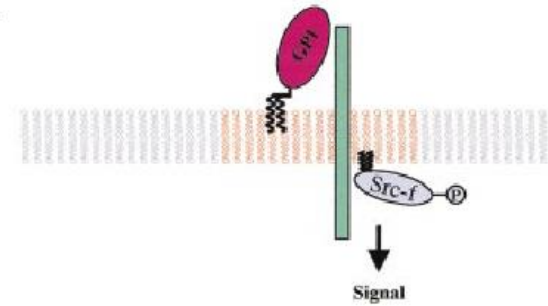
PI3K

SHIP

Cbp/PAG

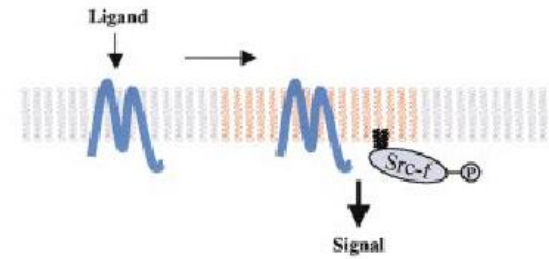
Predlagani načini za prenos signalov potom lipidnih raftov

A



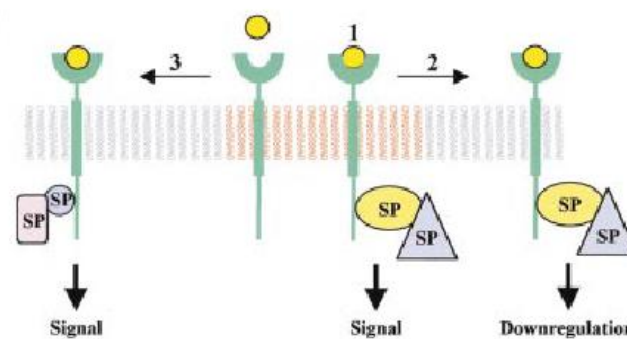
CD59, efrin A5

B



CD20, FcεRI

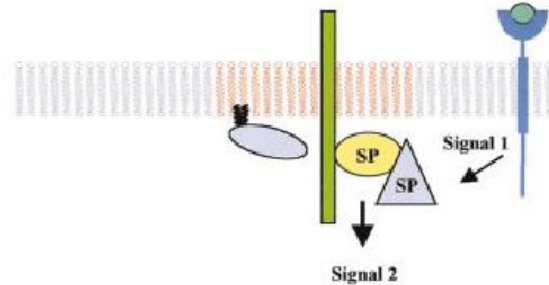
C



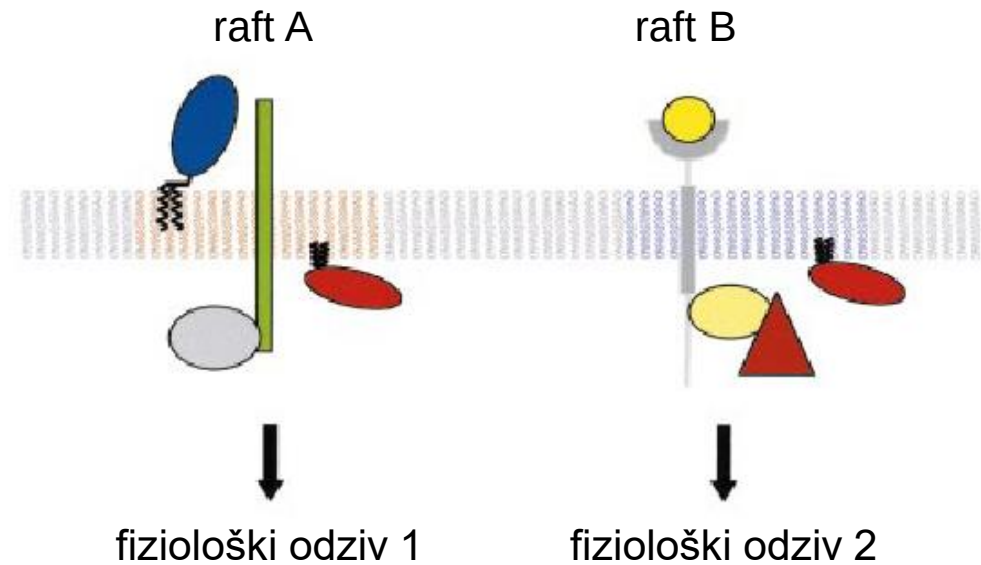
(1,2) EGFR, PDGFR

(3) IL-2R

D



Signalna specifičnost
različnih sub-populacij
lipidnih raftov.

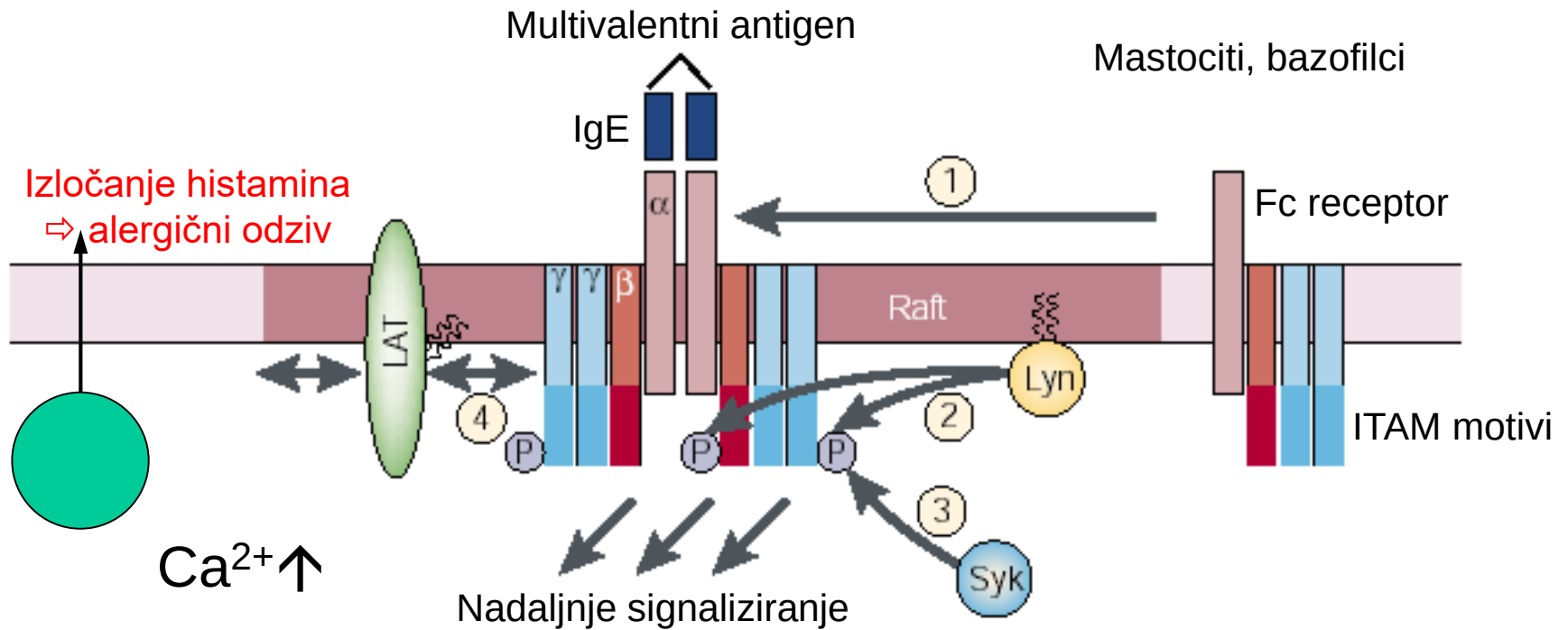


Tvorba signalnih
kompleksov višjega reda
z združevanjem
lipidnih raftov:

- ojačitev signala
- povezovanje signalnih poti
- prostorska regulacija



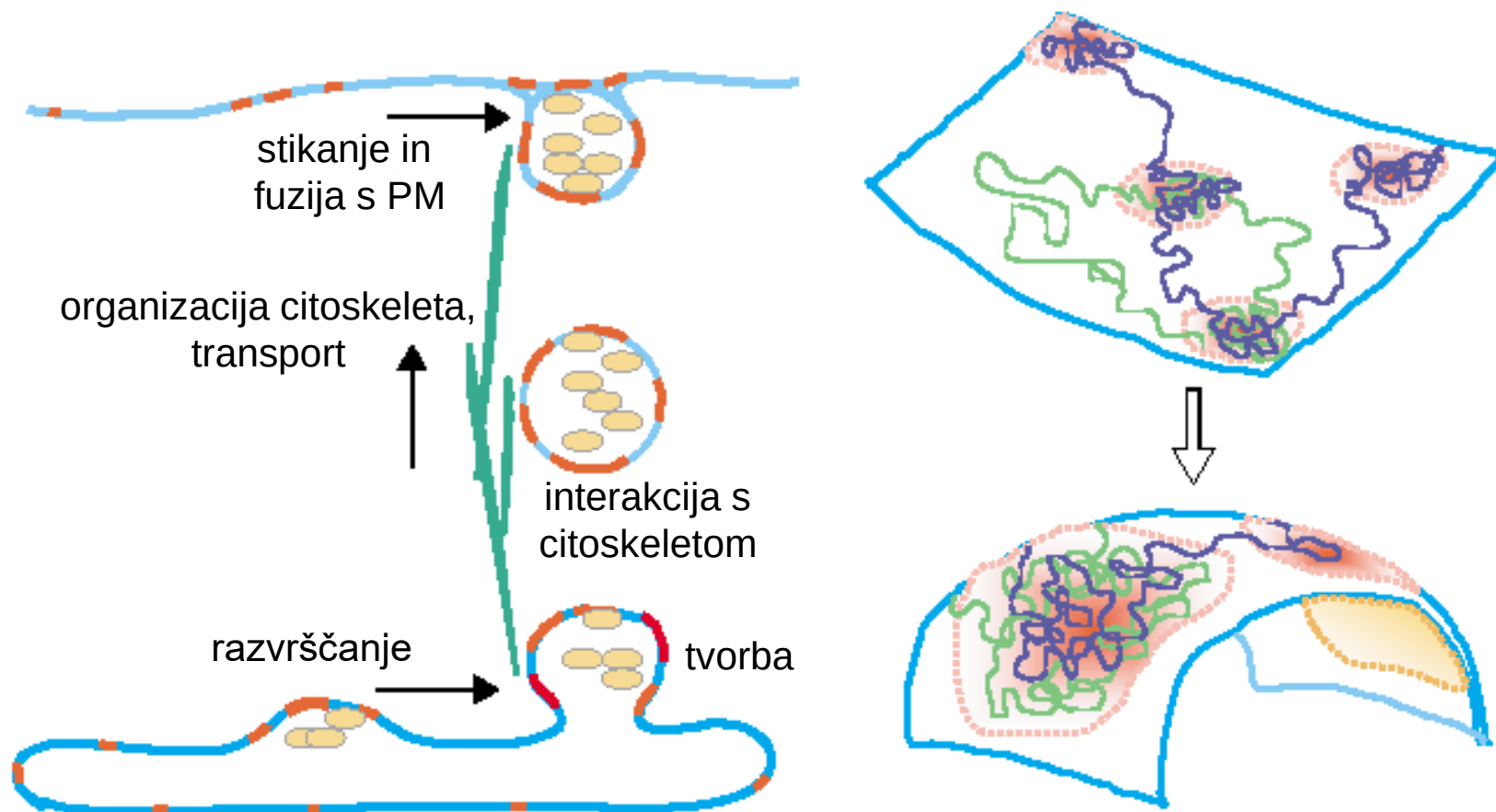
Alergični imunski odziv: signalizacija preko IgE receptorja (FcεRI)



Celični procesi, ki vključujejo lipidne rafte

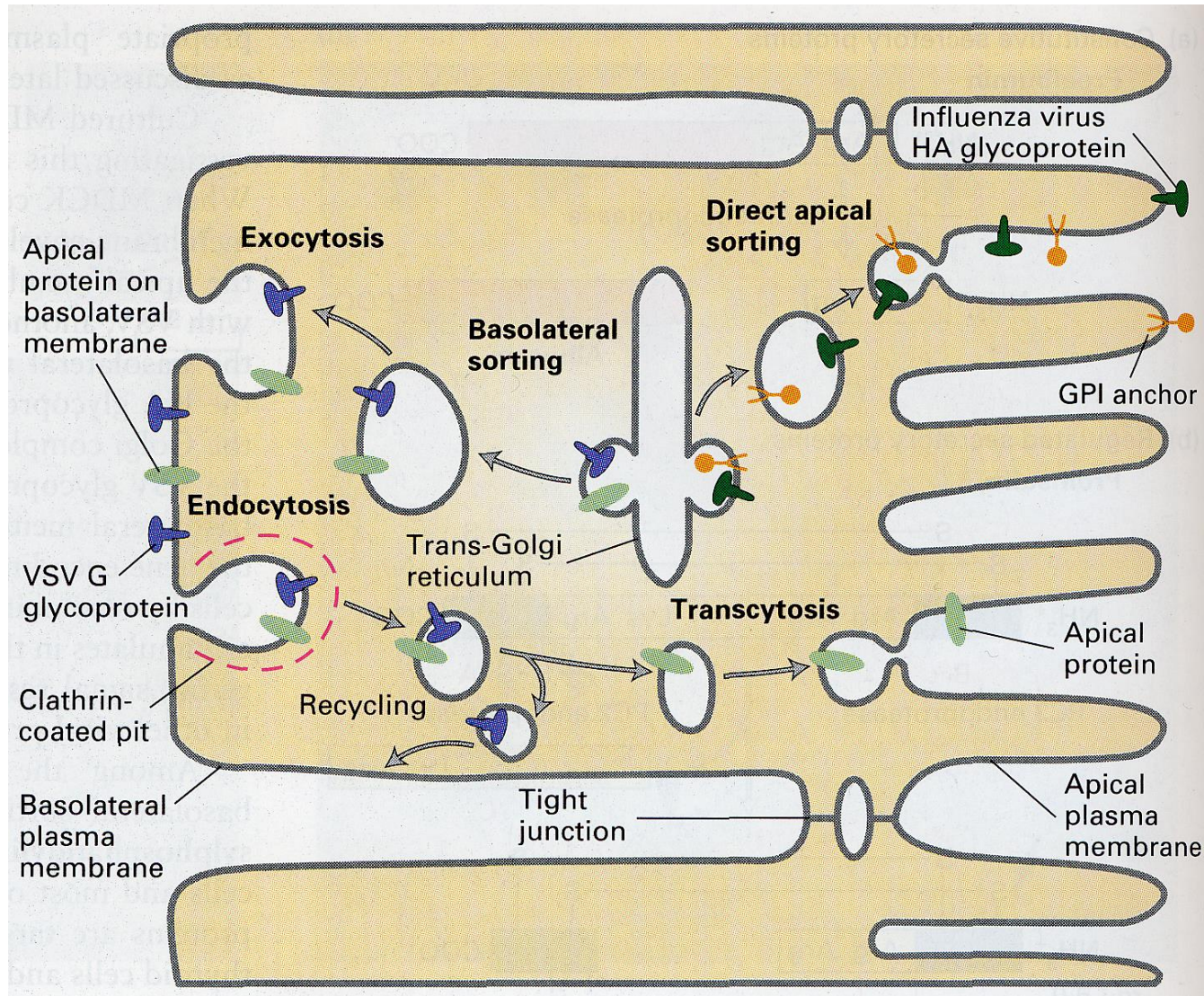
- Prenos signalov
- **Transport in razvrščanje proteinov in lipidov**
- Od klatrina neodvisna endocitoza:
 - keveolin-odvisna (potocitoza)
 - keveolin-neodvisna endocitoza
- Homeostaza Ca^{2+}

Funkcije lipidnih raftov v transportu mešičkov

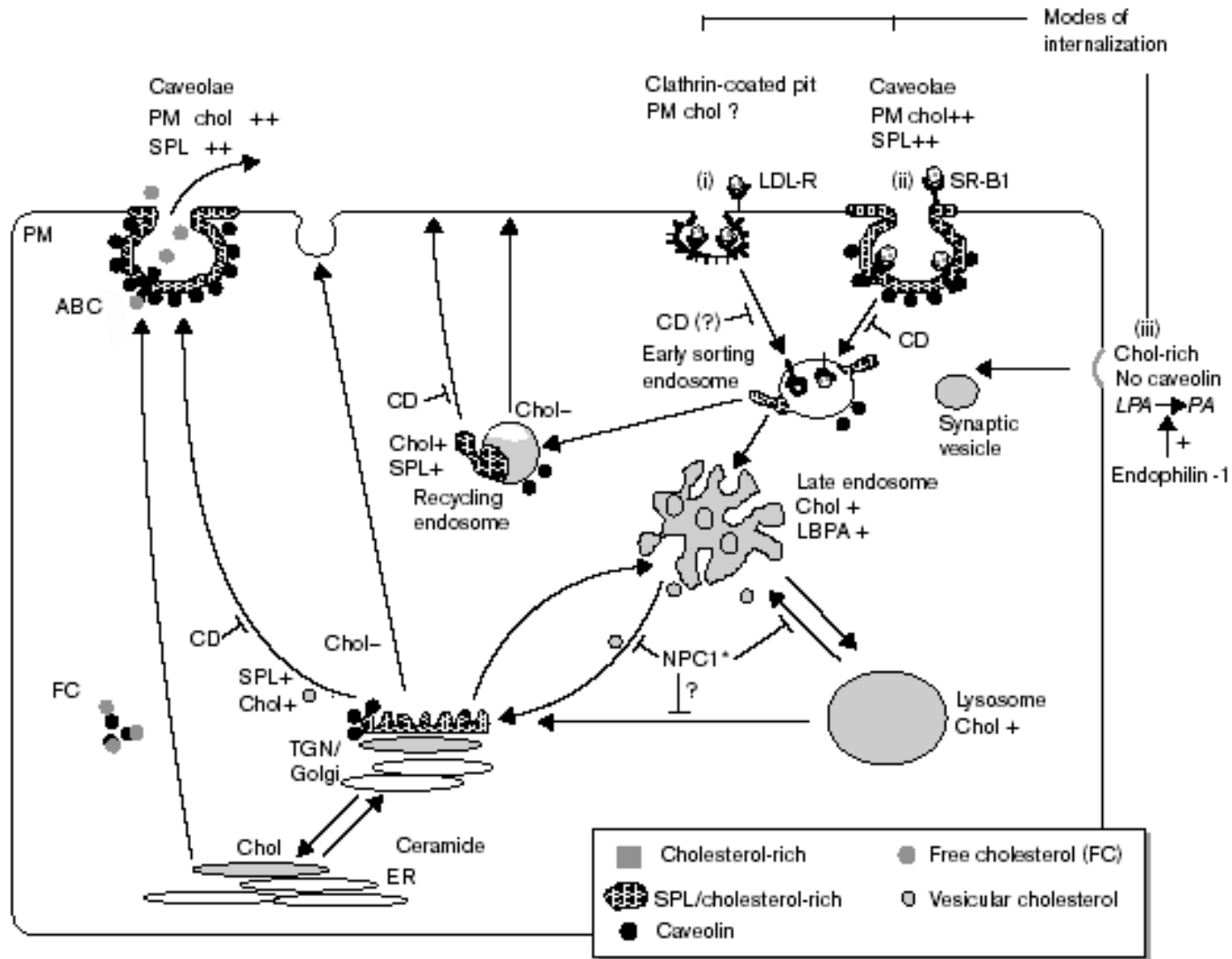


Razvrščanje proteinov v polariziranih celicah

(npr. v epitelijski celici)



Lipidni rafti sodelujejo pri transportu holesterola in sfingolipidov

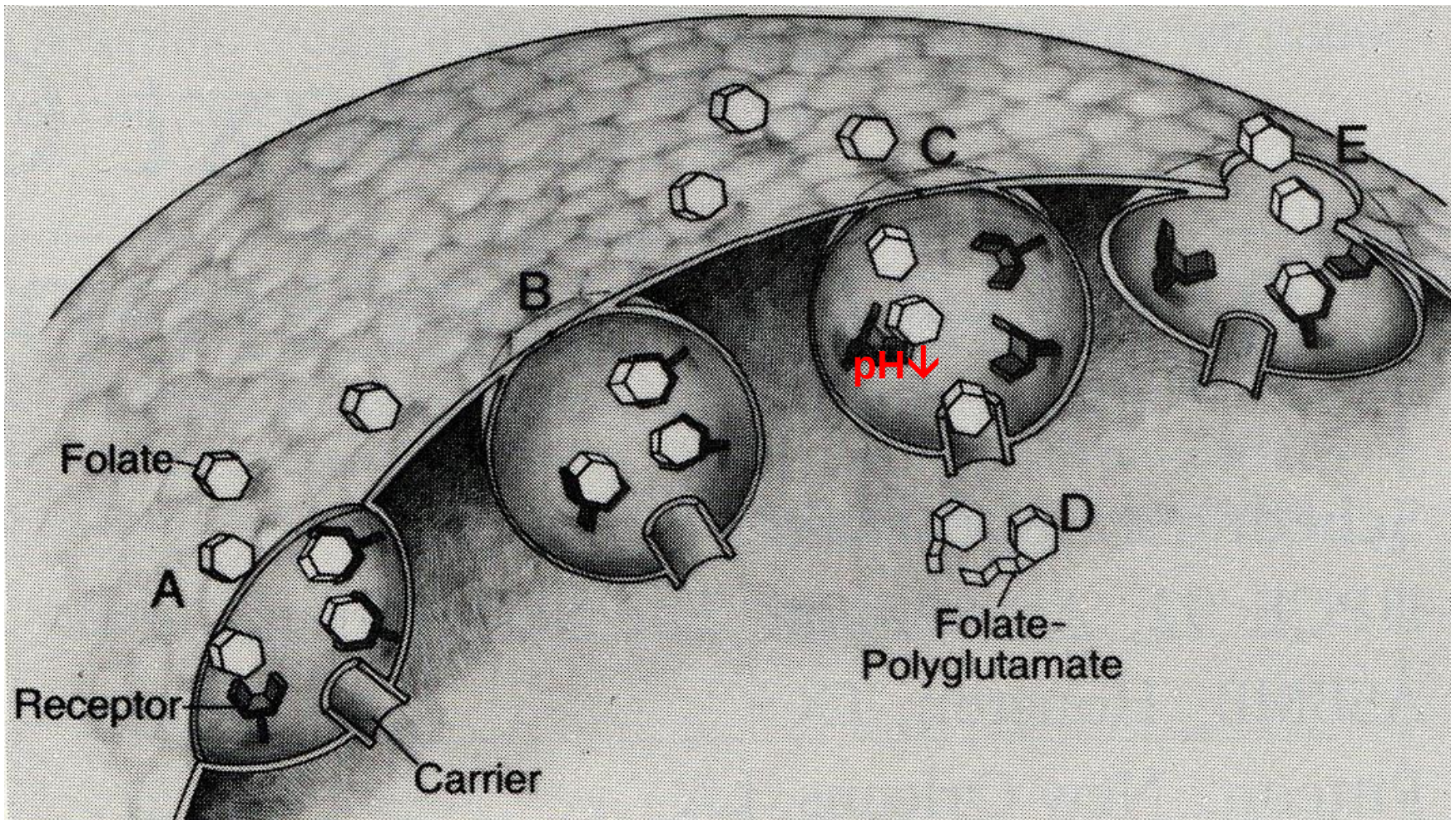


Celični procesi, ki vključujejo lipidne rafte

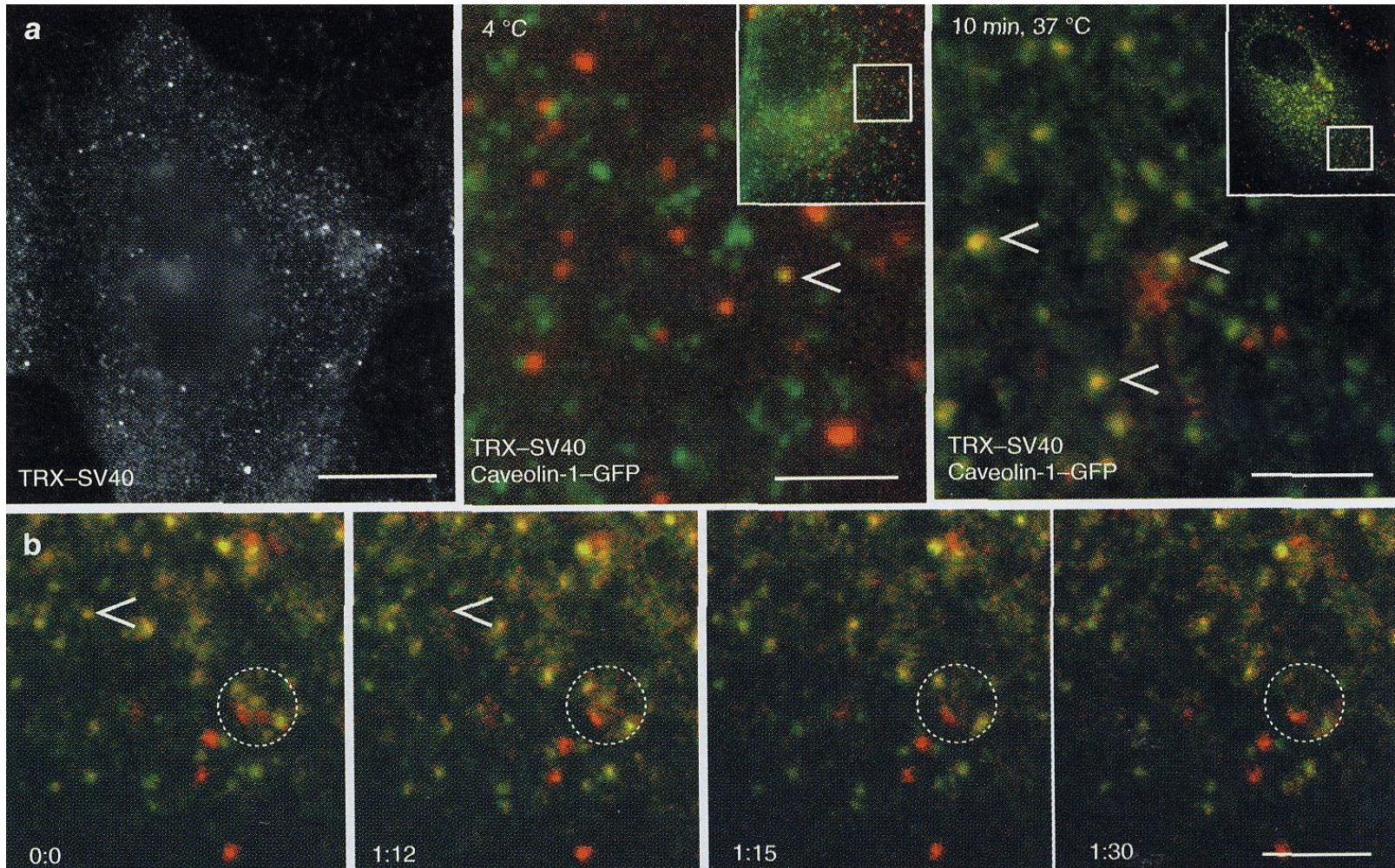
- Prenos signalov
- Transport in razvrščanje proteinov in lipidov
- **Od klatrina neodvisna endocitoza:**
 - **keveolin-odvisna (potocitoza)**
 - keveolin-neodvisna endocitoza
- Homeostaza Ca^{2+}

Potocitoza:

zajetje in vnos molekul/ionov v celico s kaveolo

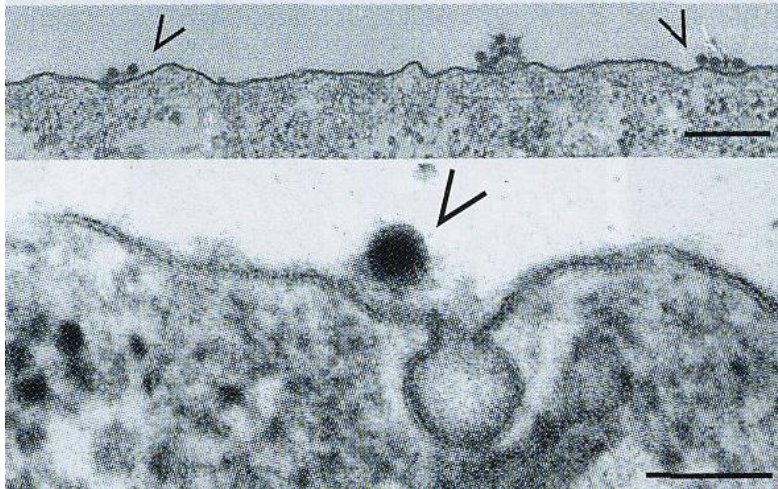


Opički virus 40 (SV40) vstopa v celico s potocitozo

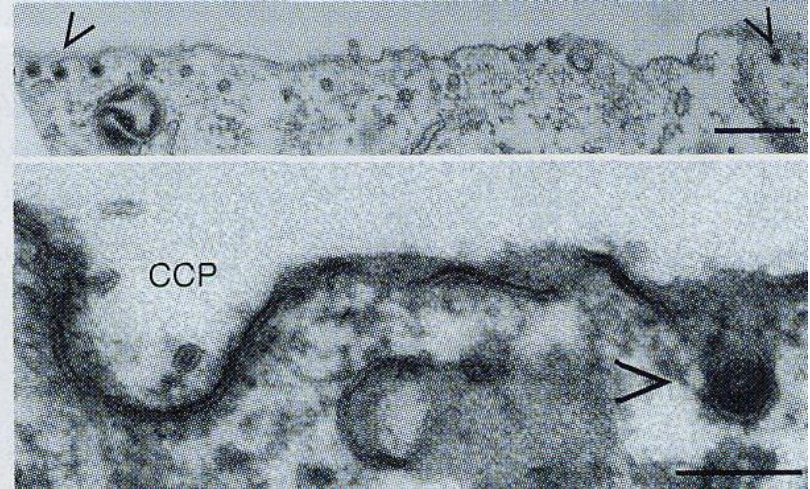


Kaveolarna endocitoza SV40

4°C

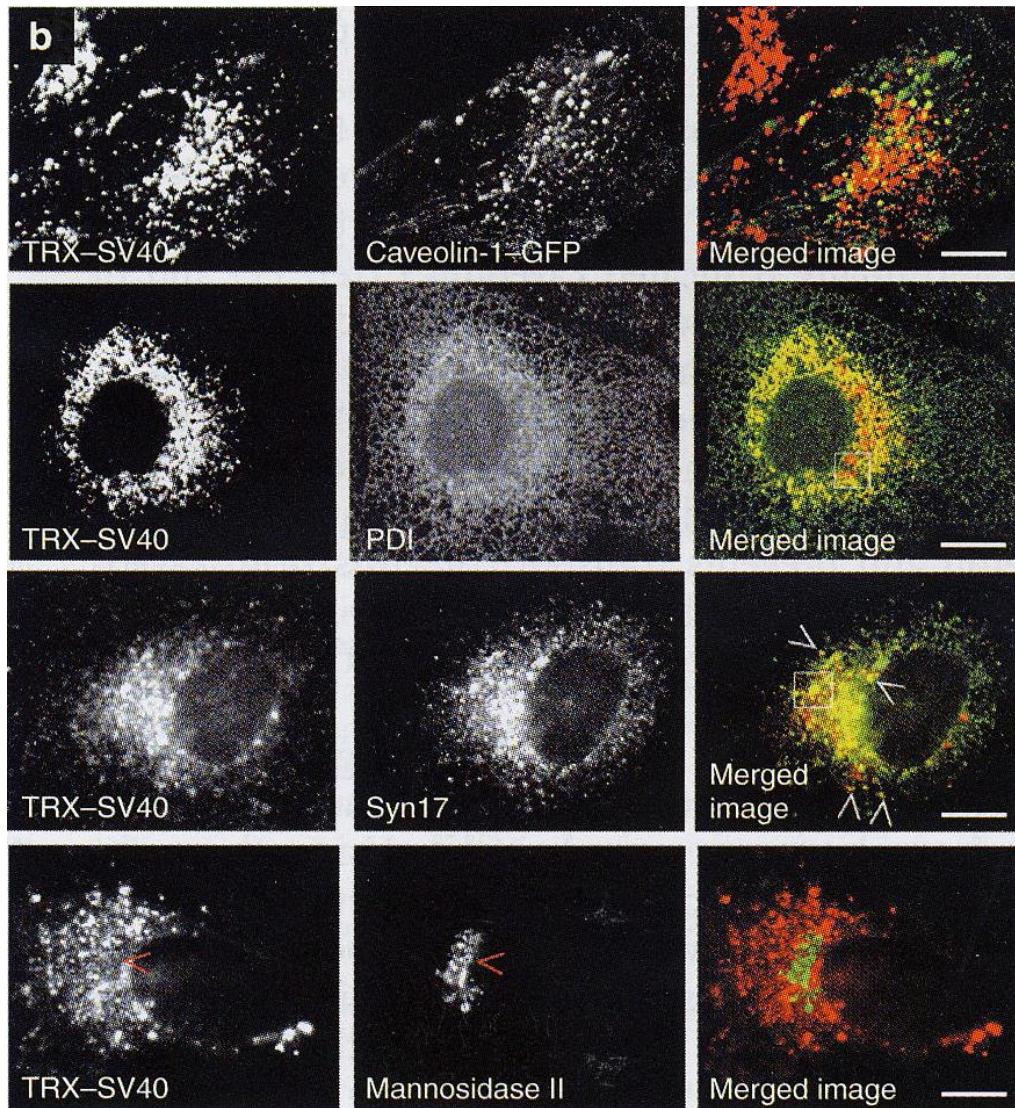


15 min, 37°C



Lokalizacija virusa SV40 v celicah

(16h po izpostavitvi CV-1 celic virusu pri 37°C)



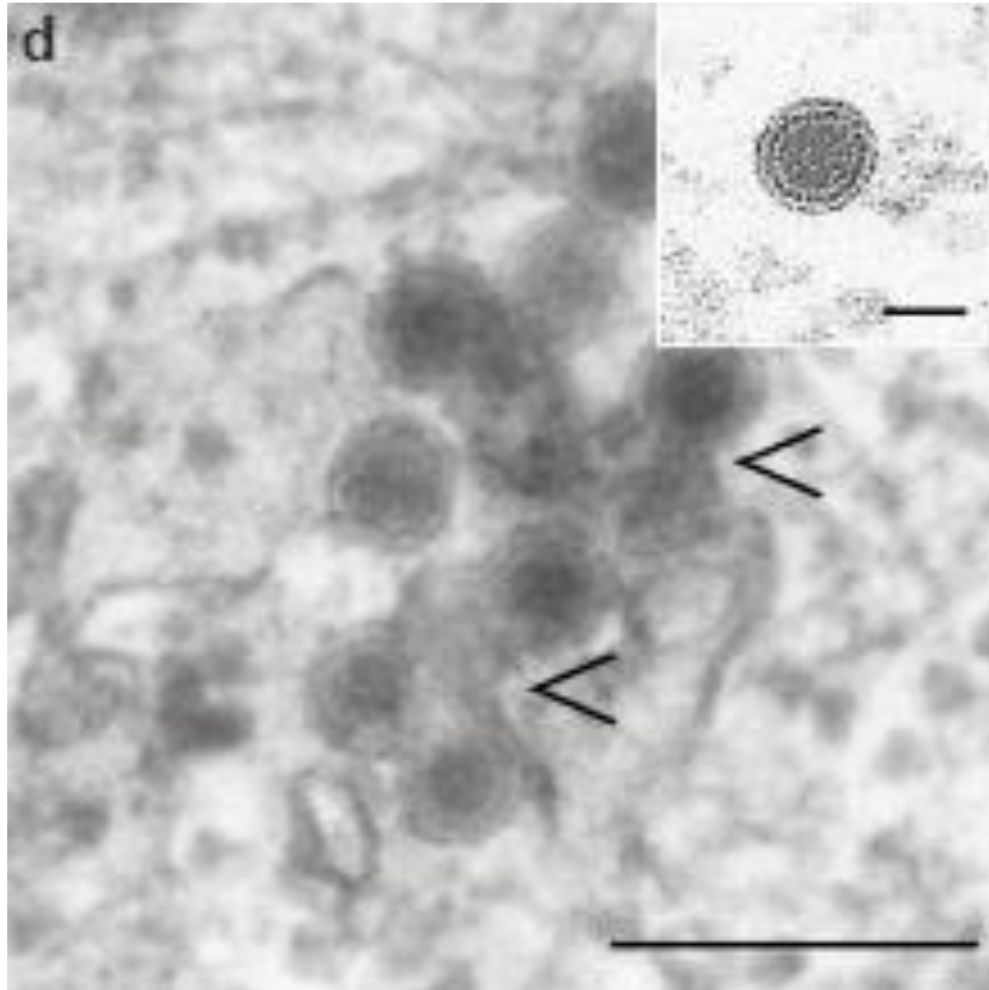
Cav-1⁺ organeli
9% prekrivanje

retikularni ER
70% prekrivanje

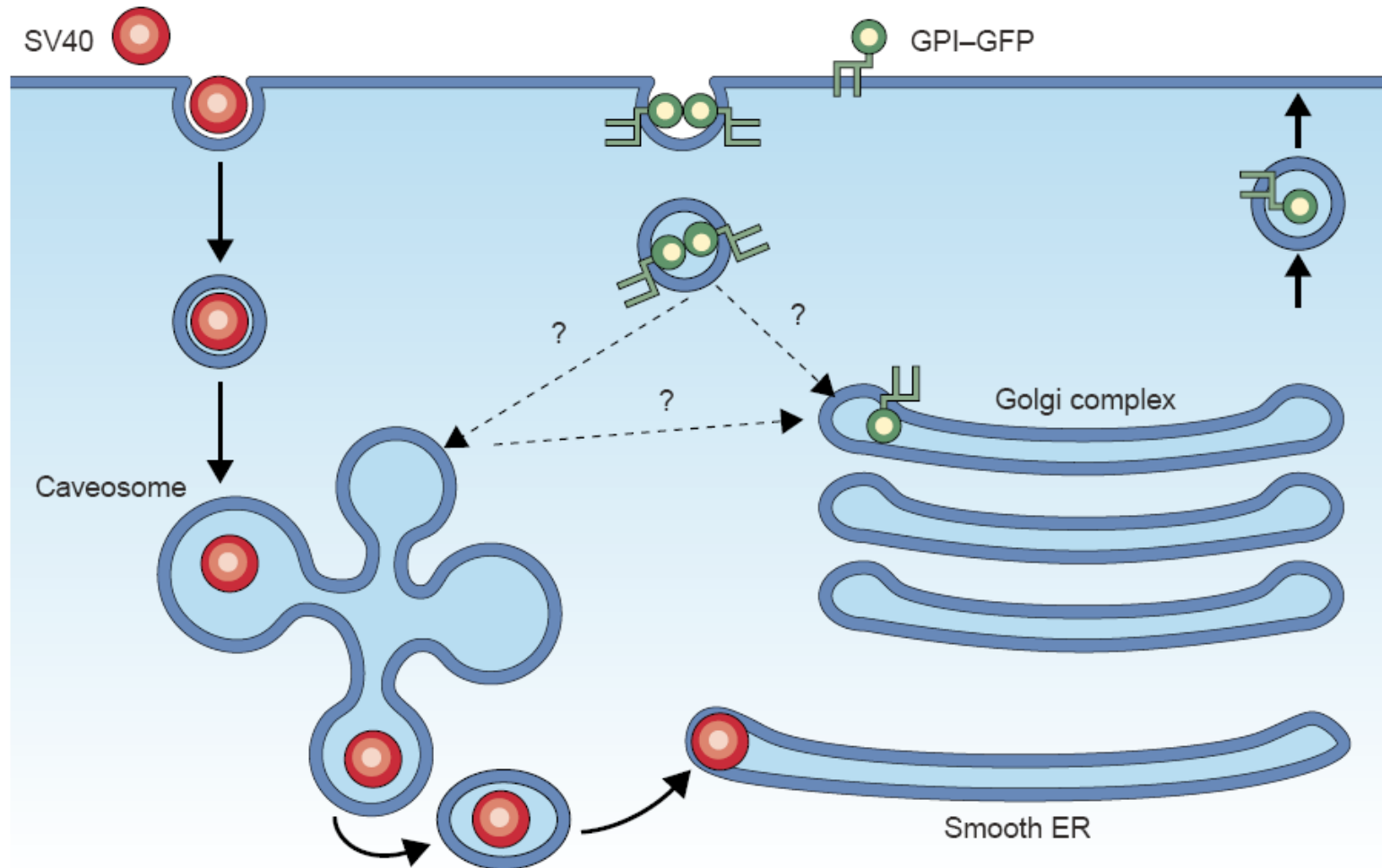
gladki ER
80% prekrivanje

Golgijev aparat
5% prekrivanje

**Transport od kaveole na PM do ER
poteka preko vmesnega organela – kaveosoma**



Transportne poti preko kaveol vodijo s PM do ER in Golgijevega aparata preko znotrajceličnih struktur brez endosomalnih markerjev

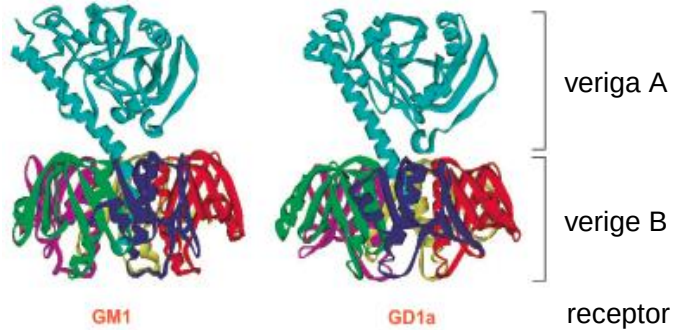


Kaveosom

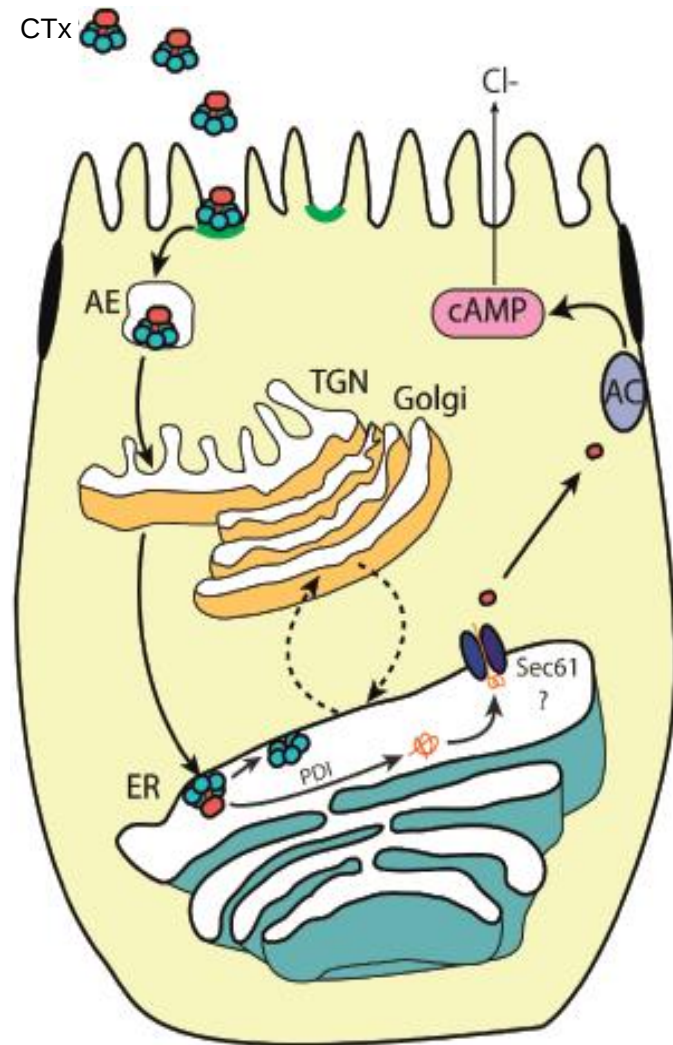
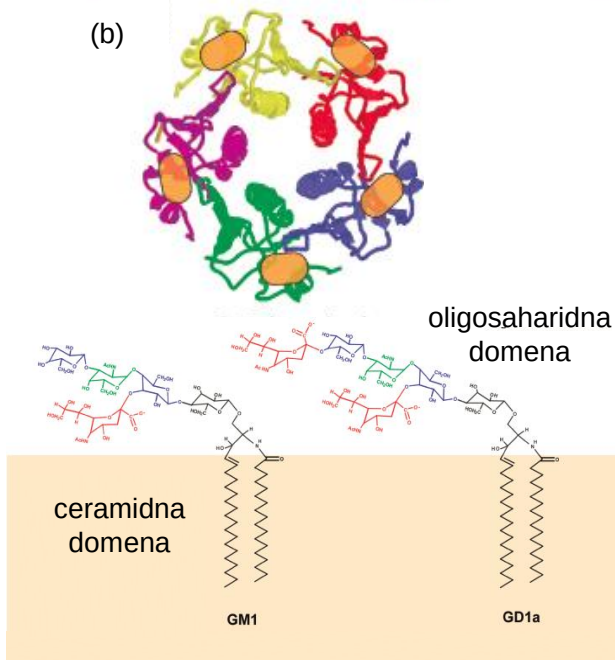
- se ne nakisa (nevtralen pH)
 - vsebuje kaveolin
- ne vsebuje markerjev za endosome, lizosome, ER ali Golgijev aparat
- ligandi klatrin-posredovane endocitoze ne zaidejo vanj

Retrogradni celični transport preko kaveol

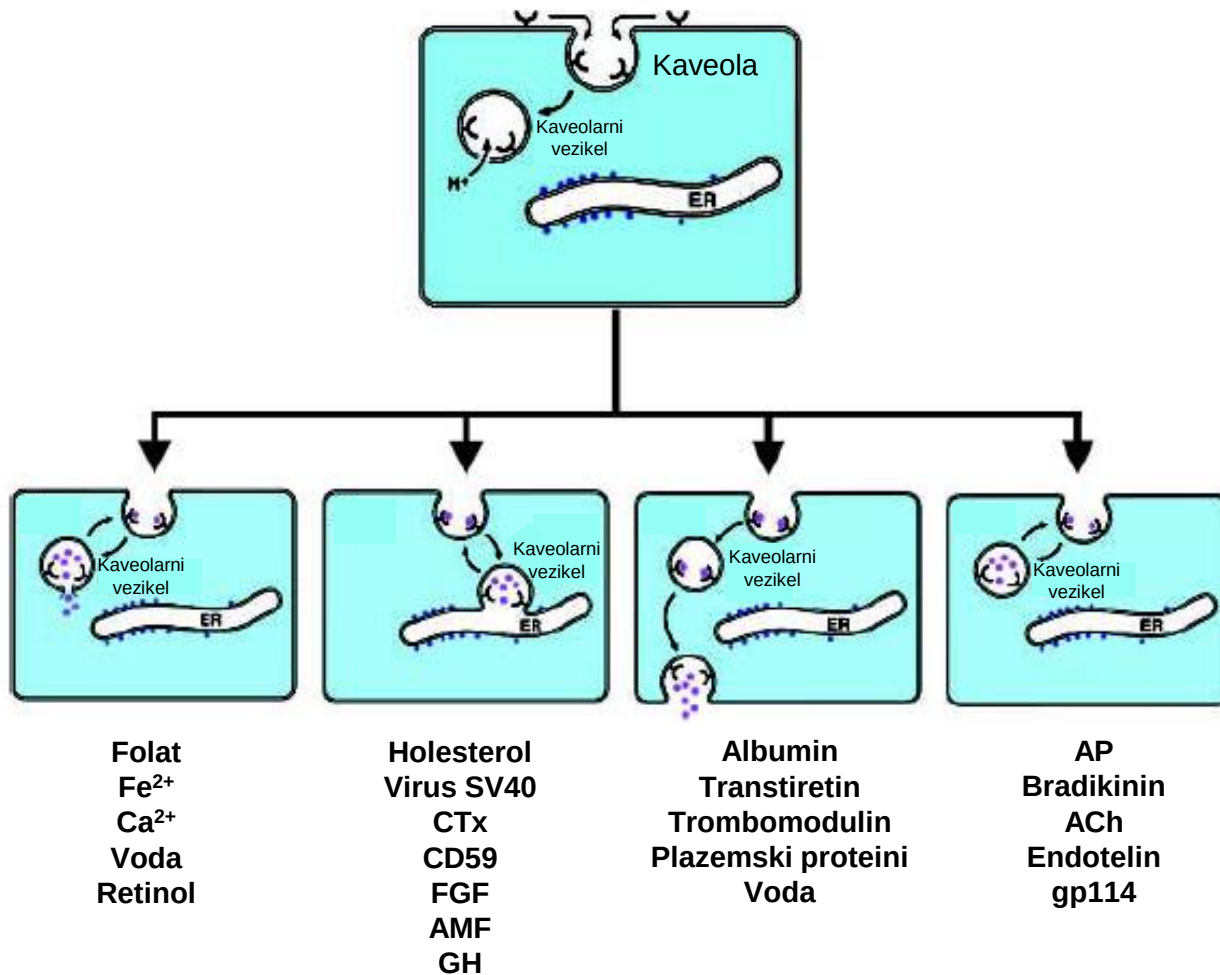
(a) CTx (*Vibrio cholerae*) LTIIb enterotoxin (*E. coli*)



(b)



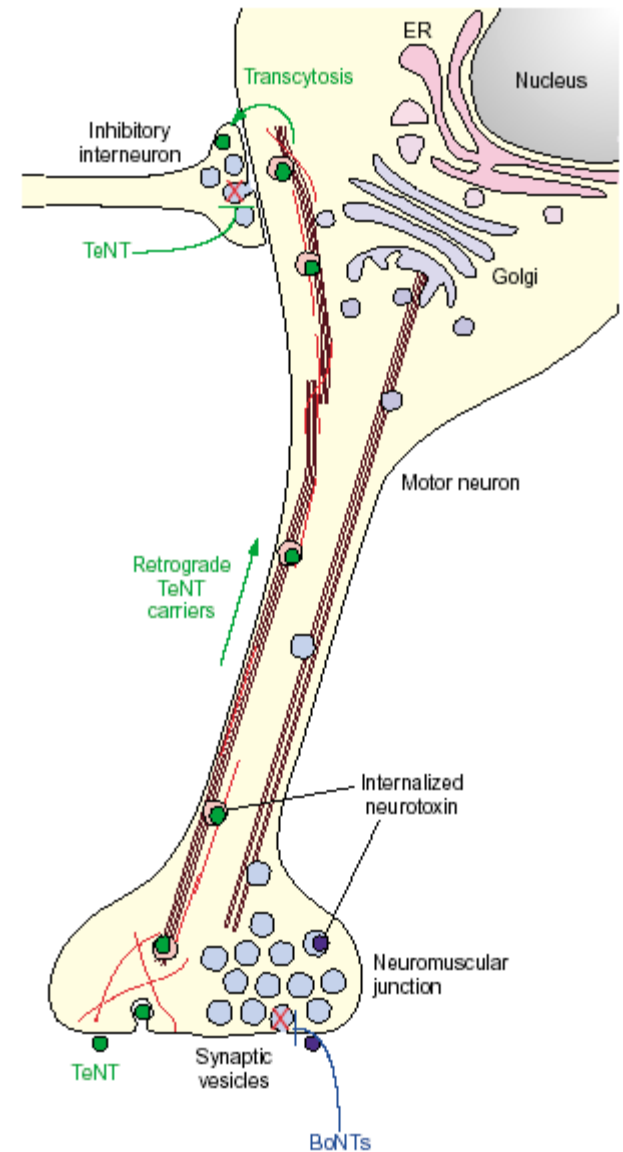
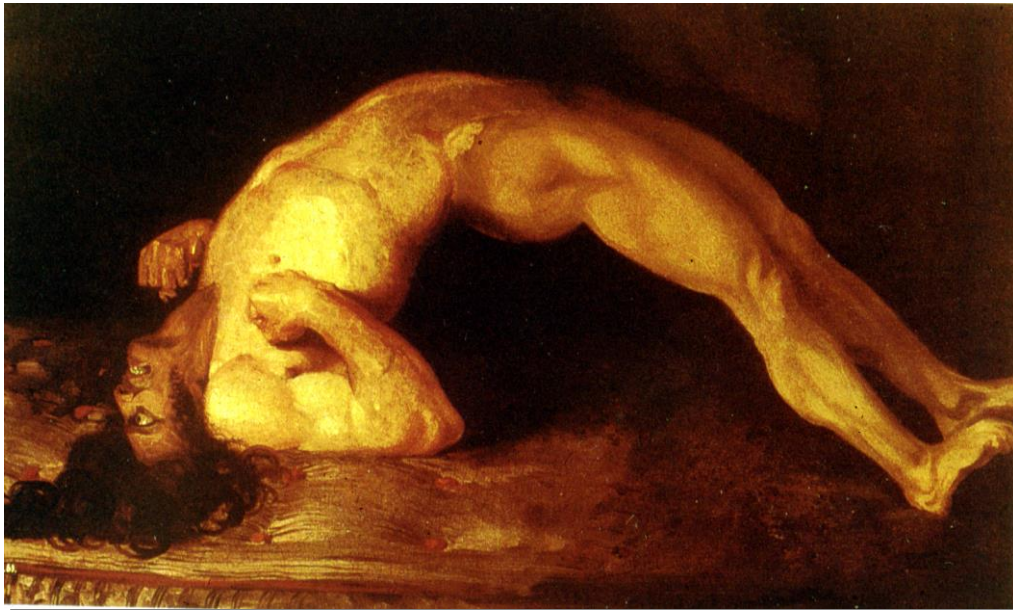
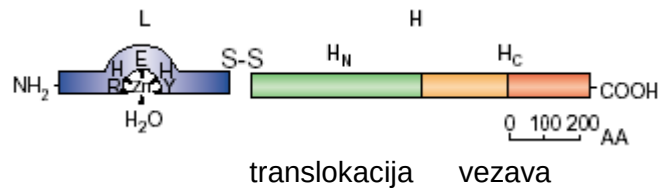
Štiri možne dostave molekul v celico s potocitozo



Celični procesi, ki vključujejo lipidne rafte

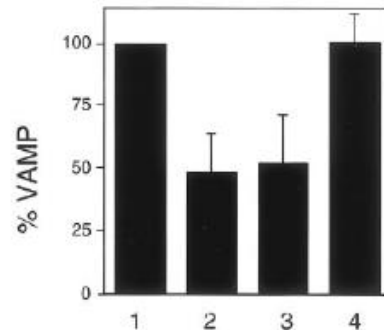
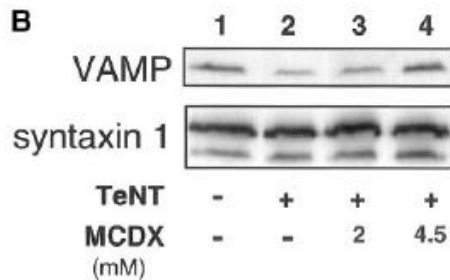
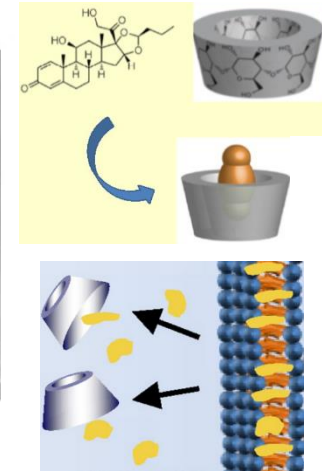
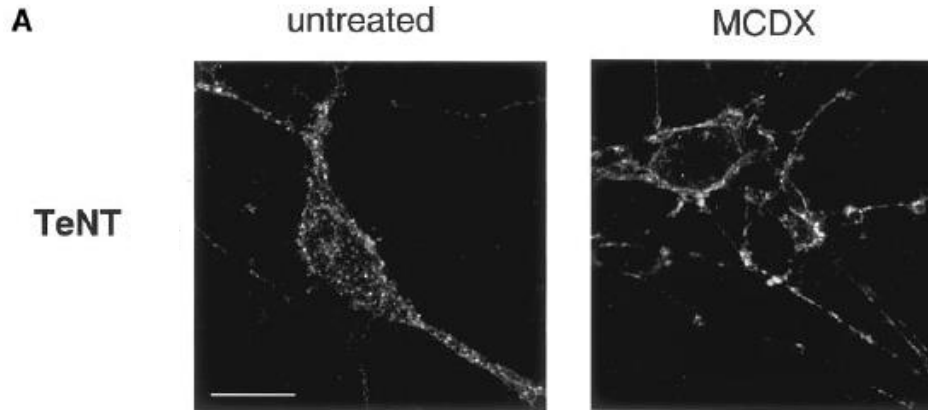
- Prenos signalov
- Transport in razvrščanje proteinov in lipidov
- **Od klatrina neodvisna endocitoza:**
 - keveolin-odvisna (potocitoza)
 - **keveolin-neodvisna endocitoza**
- Homeostaza Ca^{2+}

Od klatrina neodvisna receptor-posredovana endocitoza TeNT



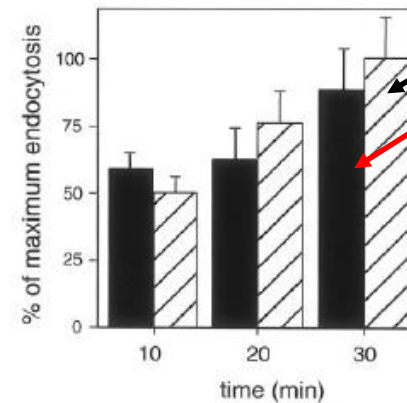
Ekstrakcija holesterola povzroči razbitje raftov in s tem prepreči vnos in znotrajcelično aktivnost TeNT

Nevroni hrbtenjače
(v nevronih ni kaveol)



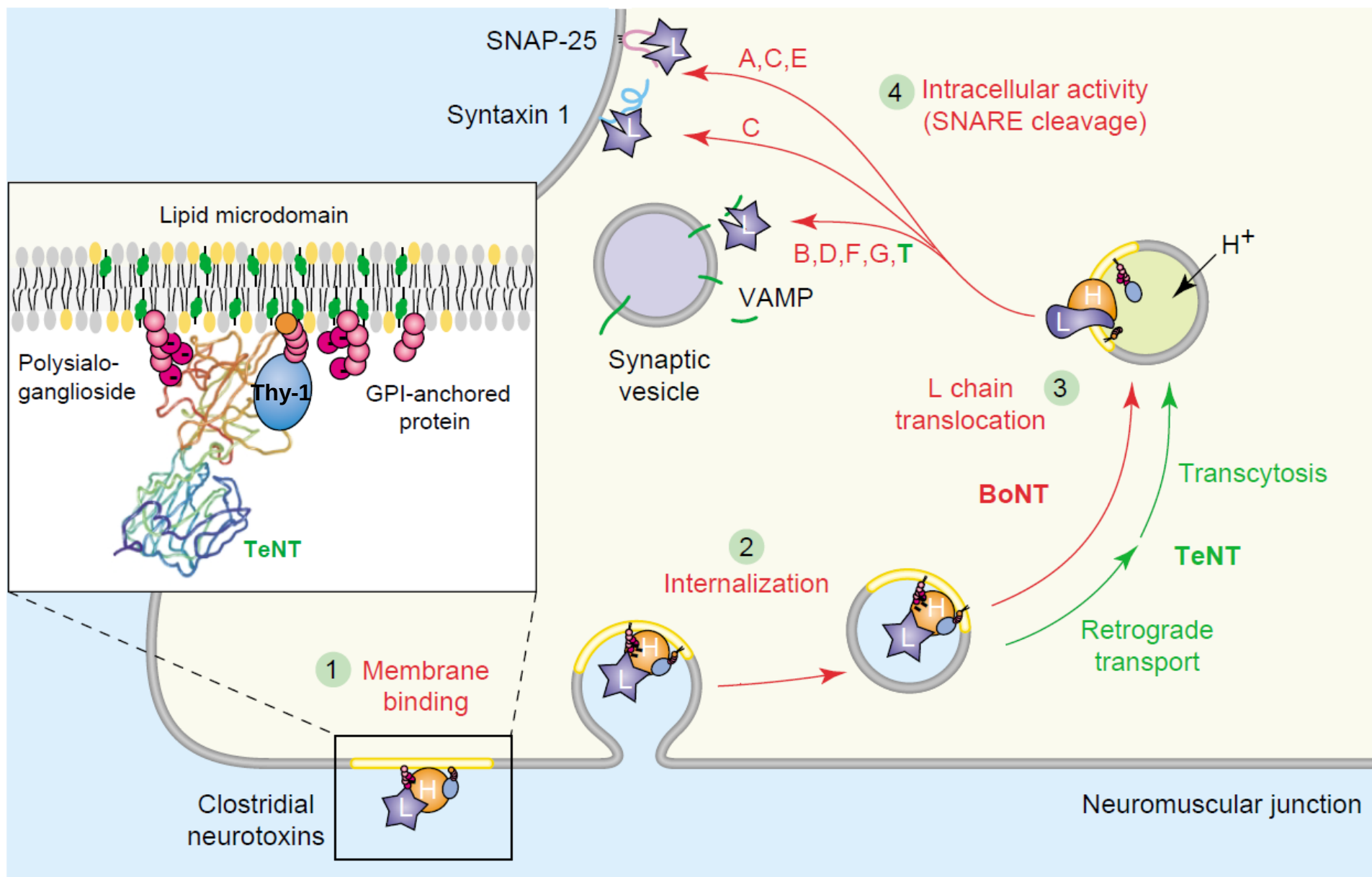
C

Endocitoza ^{125}I -transferina
(od klatrina odvisen proces)



obdelava z MCDX
ni obdelave z MCDX

ko-receptor za TeNT je
GPI-protein Thy-1



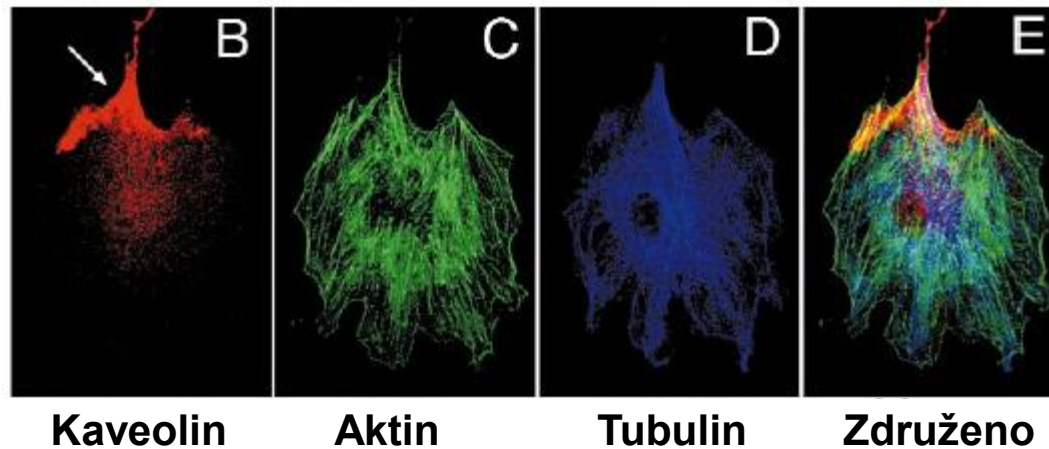
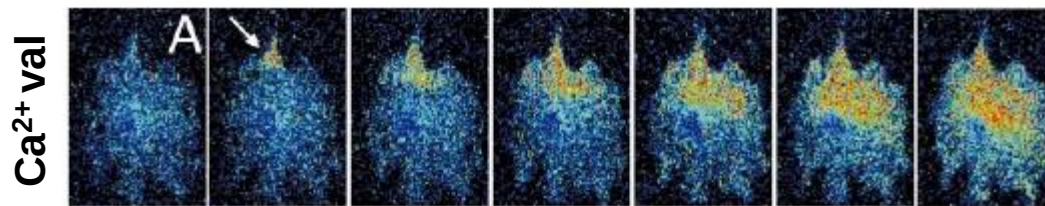
Celični procesi, ki vključujejo lipidne rafte

- Prenos signalov
- Transport in razvrščanje proteinov in lipidov
- Od klatrina neodvisna endocitoza:
 - kaveolin-odvisna (potocitoza)
 - kaveolin-neodvisna endocitoza
- Homeostaza Ca^{2+}

Val Ca^{2+} izvira z roba celice, ki je bogat s kaveolinom

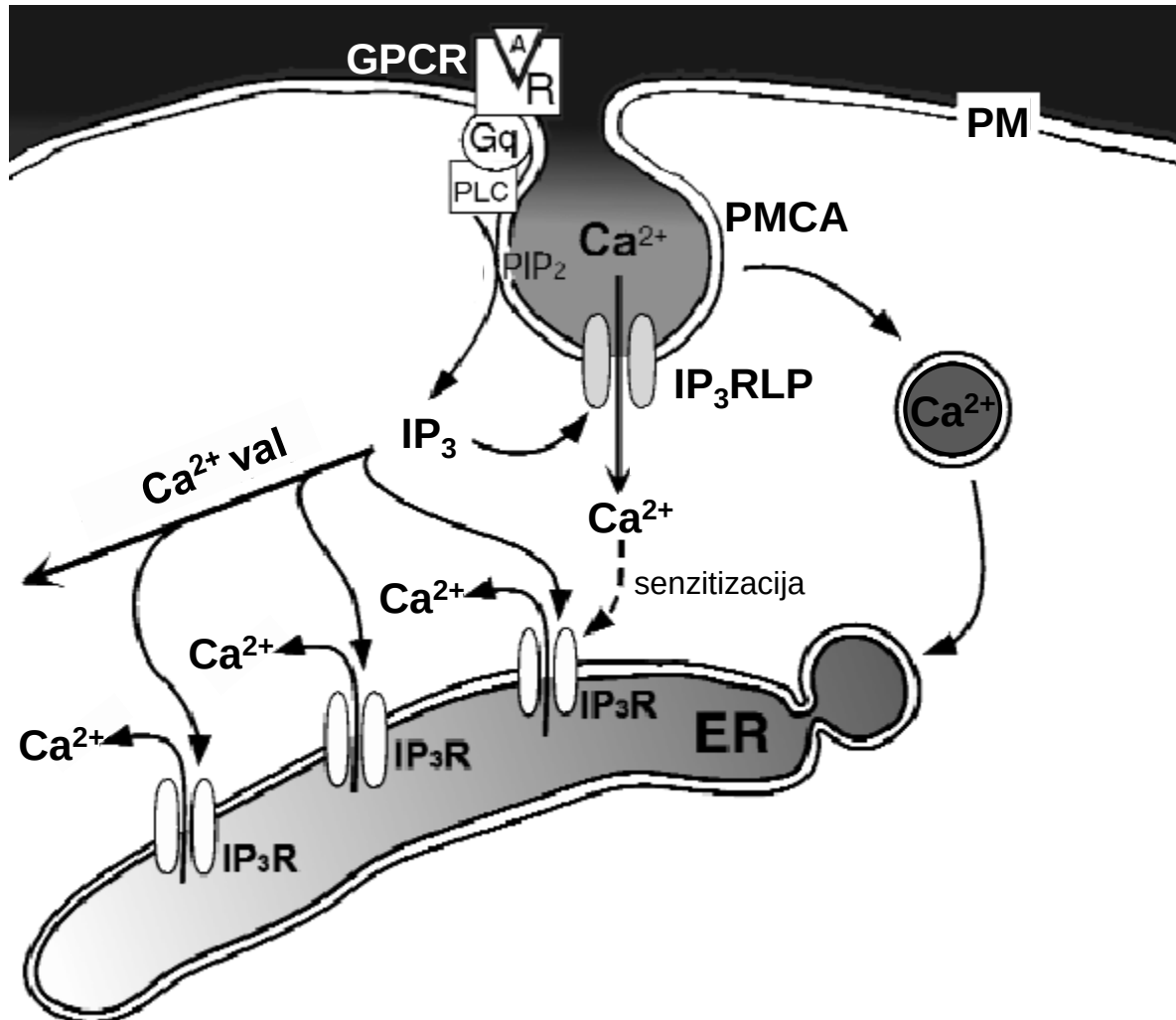
endotelijske celice
goveje aorte
napolnjene z Indo-1

stimulacija celic z ATP $\Rightarrow$ mobilizacija IP_3



Kaveole so obogatene s proteini, ki so vključeni v regulacijo znotrajcelične Ca^{2+}

Trije načini, s katerimi lahko kaveola regulira nastanek in širjenje Ca^{2+} valov



Ključne naloge kaveol v zvezi s Ca^{2+}

- Prostorska organizacija vstopanja Ca^{2+} v celico
- Nadzor količine Ca^{2+} , ki vstopa v celico
- Generiranje Ca^{2+} valov (jakost in frekvenca)
- Regulacija od Ca^{2+} -odvisnih signalnih poti (npr. eNOS:CaM- Ca^{2+} /kaveolin)

Lipidni rafti in bolezni pri ljudeh

- Mišična distrofija (mutacija Cav-3)
- Alzheimerjeva bolezen (tvorba β -amiloida)
- Encefalopatije (pretvorba $\text{Pr}^{\text{C}} \Rightarrow \text{Pr}^{\text{Sc}}$ v kaveolah)
- Rak (izguba Cav-1, s tem kaveol $\Rightarrow$ degulacija rasti celic)
- Kardiovaskularne bolezni, npr. ateroskleroza (disfunkcija raftov)
- Patogeni (rafti – vstopna točka v celice)

Dodatno branje

- Filippini A. and D'Alessio A. (2020): Caveolae and lipid rafts in endothelium: valuable organelles for multiple functions. *Biomolecules* 10: e1218.
- Levental I. et al. (2020): Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain. *Trends Cell Biol.* 30: 341-353.
- Thematic Review Series - Biology of Lipid Rafts (8 člankov). *J. Lipid Res.* (2020) 61(5): 589-695.
- Suzuki K.G.N. and Kusumi A. (2023): Refinement of Singer-Nicolson fluid-mosaic model by microscopy imaging: Lipid rafts and actin-induced membrane compartmentalization. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1865(2): 184093.