

KROPLE LIPIDOWE: NOWE SPOJRZENIE NA STRUKTURĘ, BIOGENEZĘ I FUNKCJE

LIPIDS DROPLETS: A NEW INSIGHT INTO STRUCTURE, BIOGENESIS AND FUNCTIONS

Izabela JĘDRZEJOWSKA

Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt, Instytut Zoologiczny
Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

Streszczenie: Krople lipidowe są zazwyczaj sferycznymi organellami. W rdzeniu kropli zawarte są tłuszcze obojętne, a jej powierzchnię stanowi pojedyncza warstwa fosfolipidowa. Z kroplami lipidowymi związane są liczne białka. Część z nich należy do rodziny PAT i bierze udział w metabolizmie tłuszczów. Pozostałe białka występują i funkcjonują również w innych przedziałach komórkowych, gdzie pełnią role niezwiązane z gospodarką lipidową. Mechanizm biogenezy i wzrostu kropli lipidowych nie jest ostatecznie wyjaśniony. Zaproponowano kilka alternatywnych modeli powstawania kropli lipidowych w komórkach eukariotycznych, z których każdy zakłada, że organellą uczestniczącą w biogenezie kropli lipidowych jest siateczka śródplazmatyczna. Zasadnicze różnice hipotetycznych modeli odnoszą się do inicjalnego miejsca formowania kropli (pomiędzy dwiema warstwami fosfolipidowymi błony siateczki lub w bliskim sąsiedztwie błon siateczki) oraz sposobu odłączania formującej się kropli od błon siateczki śródplazmatycznej. Wzrost kropli może wynikać z ich homotypowej fuzji lub dostarczania do istniejącej kropli tłuszczów obojętnych oraz składników powierzchniowych (fosfolipidów i białek). Krople lipidowe wchodzi w interakcje z innymi organellami (siateczką śródplazmatyczną, mitochondriami, peroksisomami, endosomami i fagosomami) oraz elementami cytoszkieletu. Są także organellami mobilnymi, a główną rolę w ich transporcie odgrywają mikrotubule i związane z nimi białka motoryczne. Podstawową funkcją kropli lipidowych jest udział w magazynowaniu i uwalnianiu zgromadzonych tłuszczów. Ponadto krople lipidowe uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie tłuszczów i fosfolipidów. Nowo poznana rola kropli lipidowych jest zdolność do wiązania białek. Związane z kroplami lipidowymi białka są inaktywowane i/lub przeznaczone do degradacji. Obecność rybosomów oraz białek wiążących RNA w kroplach lipidowych wskazuje na możliwość wiązania RNA. Szczególnie interesującą z punktu widzenia klinicznego rolę kropli lipidowych jest wpływ na zmianę metabolizmu komórki w stanach patologicznych wywołanych procesami zapalnymi lub neoplazją. Zróżnicowany skład białkowy kropli lipidowych, ich mobilność oraz oddziaływanie z wieloma organellami sprawia, że krople lipidowe są obecnie traktowane jako organelle dynamiczne i wielofunkcyjne.

Słowa kluczowe: biogeneza kropli lipidowych, wzrost kropli lipidowych, białka kropli lipidowych.

Summary: Lipid droplets are usually spherical organelles. A core of lipid consists of neutral lipids surrounded by a phospholipid monolayer. Many proteins bind to lipid droplets. Some of them are involved in lipid metabolism and belong to PAT family. Others are well known from different cell compartments,

where they play roles not associated with lipid metabolism. Mechanisms of lipid biogenesis and growth are not clear. Several alternative models of lipid droplet formation in eukaryotic cells have been proposed and all of them agree that endoplasmic reticulum plays a key role in lipid droplet biogenesis. Essential differences among the models pertain to the sites of lipid droplet formation (between two leaflets of endoplasmic reticulum membrane or in close neighborhood with endoplasmic reticulum) as well as the mechanisms of lipid droplet detachment from the endoplasmic reticulum membrane. Growth of lipid droplets may result from homotypic fusion or supply of lipid esters and phospholipids to the existing lipid droplet. Lipid droplets interact with organelles (endoplasmic reticulum, mitochondria, peroxisomes, endosomes and phagosomes) and cytoskeleton elements. They are mobile organelles. Intracellular transport of lipid droplets is based mainly on microtubules and their motor proteins. The major roles of lipid droplets are lipid storage and release. Moreover, they mediate intracellular lipid and phospholipid traffic. The ability to bind proteins is a newly discovered function of lipid droplets. The proteins associated with lipid droplets are inactivated and/or destined for degradation. The presence of ribosomes and RNA binding proteins in lipid droplets indicates that they might be capable of RNA binding. Much interest focuses on the role of lipid droplets in pathological states of the cell caused by inflammatory processes or neoplasia. The diverse contents of lipid droplets, their mobility and interactions with many organelles, suggest that they are dynamic and multifunctional organelles.

Key words: lipid droplet biogenesis, growth of lipid droplets, lipid droplet proteins.

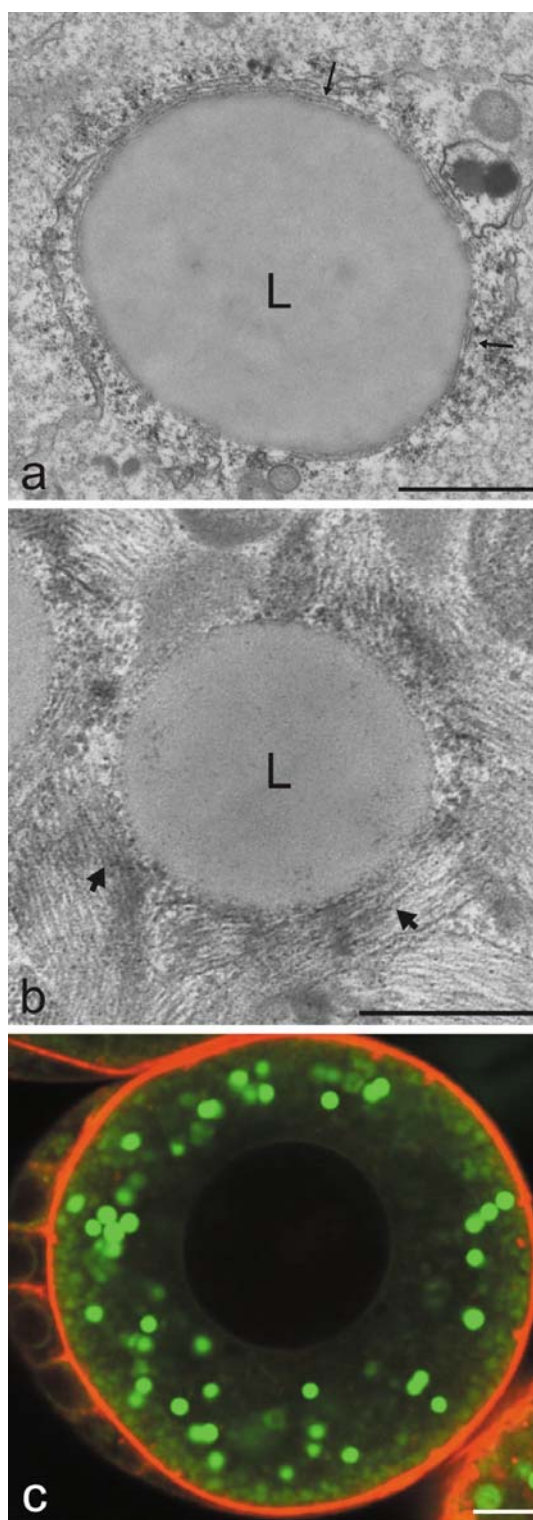
Wykaz skrótów: **HSL** (ang. *hormone sensitive lipase*) – lipaza wrażliwa na hormony; **ADRP** (ang. *Adipose Differentiation Related Protein*) – białko związane z różnicowaniem adipocytów; **TIP47** (ang. *Tail Interacting Protein 47 kDa*); **ApoB** – apolipoproteina B; **HCV** – wirus zapalenia wątroby typu C.

1. WSTĘP

Do niedawna krople lipidowe traktowane były jako bierne organelle komórkowe magazynujące tłuszcze, wykorzystywane następnie do tworzenia błon biologicznych, syntezy hormonów steroidowych oraz jako źródło energii. Dzięki badaniom kropli lipidowych w komórkach tłuszczowych (adipocytach) odkryto białka zaangażowane w gromadzenie, stabilizację i uwalnianie tłuszczów z kropli lipidowych. Wykazano, że aktywnie uczestniczą one w utrzymaniu homeostazy lipidowej. Wiele prac poświęcono mechanizmom biogenezy i wzrostu kropli lipidowych, nie tylko w adipocytach, lecz także w innych komórkach. Zaobserwowano, że krople lipidowe wchodzą w interakcje z innymi organelami oraz są zdolne do przemieszczania się w komórce przy udziale elementów cytoszkieletu. Wnikliwa analiza ultrastrukturalna oraz proteomowa pozwoliła zweryfikować w istotny sposób poglądy na budowę i związane z nią funkcje kropli lipidowych. Identyfikacja licznych białek związanych z kroplami lipidowymi wskazuje, że poza zaangażowaniem w magazynowanie i metabolizm tłuszczów, uczestniczą także w wielu innych procesach komórkowych. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat struktury, biogenezy i funkcji kropli lipidowych jako organeli dynamicznych i wielofunkcyjnych.

2. MORFOLOGIA KROPLI LIPIDOWYCH

Krople lipidowe są zwykle sferycznymi organelami o homogennej zawartości (ryc. 1 a-c). Powierzchnię kropli lipidowej tworzy, nie zawsze widoczna, pojedyncza



RYCINA 1. Morfologia kropli lipidowych: a – kropla lipidowa (L) w kontakcie z siateczką śródplazmatyczną (↓) w oocyte skorupiaka *Godzilliognomus frondosus* (*Remipedia*) (udostępnione przez prof. Janusza Kubrakiewicza, Uniwersytet Wrocławski). TEM; skala – 1 μm; b – kropla lipidowa (L) otoczona wiązkami filamentów pośrednich (↗) w oocyte pająka *Clubiona* sp. TEM; skala – 0,5 μm; c – krople lipidowe (zielone) barwione BODIPY 493/503 (*Molecular Probes*) w oocyte zaleszczotka *Chelifer cancroides*; mikroskop konfokalny; skala – 20 μm

FIGURE 1. Lipid droplet morphology: a – lipid droplet (L) in contact with endoplasmic reticulum (↓) in the oocyte of crustacean *Godzilliognomus frondosus* (*Remipedia*) (courtesy of Prof. Janusz Kubrakiewicz, University of Wrocław) TEM; scale bar – 1 μm; b – lipid droplet (L) surrounded by bundles of intermediate filaments (↗) in the oocyte of spider *Clubiona* sp. TEM; scale bar – 0.5 μm; c – lipid droplets (green) distribution in the oocyte of pseudoscorpion *Chelifer cancroides* as revealed by BODIPY 493/503 (*Molecular Probes*). Confocal microscope; scale bar – 20 μm

warstwa fosfolipidowa będąca połową „klasycznej” błony elementarnej [30]. Komórki zawierają różną liczbę kropli lipidowych, które mogą osiągać różne rozmiary. Na przykład, w dojrzałych komórkach tkanki tłuszczowej żółtej występuje pojedyncza kropla lipidowa, która wypełnia prawie całą objętość komórki, natomiast w komórkach tkanek steroidotwórczych czy w tkance tłuszczowej brunatnej krople lipidowe są niewielkie i liczne.

3. BIOCHEMIA KROPLI LIPIDOWYCH

Dojrzałe krople lipidowe składają się z hydrofobowego rdzenia otoczonego przez pojedynczą warstwę fosfolipidową. Rdzeń kropli zawiera tłuszcze obojętne, głównie triacyloglicerole i estry cholesterolu oraz diacyloglicerole, a także inne estry w różnych proporcjach, w zależności od rodzaju komórki. W kroplach lipidowych komórek tkanki tłuszczowej żółtej dominują triacyloglicerole, podczas gdy w komórkach tkanek steroidotwórczych (np. w rdzeniu nadnerczy, w jajnikach i jądrach) przeważają estry cholesterolu przeznaczone do syntezy hormonów. Z kolei estry retinolu występują licznie w kroplach lipidowych komórek zaangażowanych w magazynowanie witaminy A (np. komórki gwiaździste wątroby). Podobnie jak zawartość rdzenia również skład warstwy fosfolipidowej kropli lipidowych może wykazywać pewne różnice w zależności od rodzaju komórki. Na przykład warstwa fosfolipidowa kropli lipidowych w komórkach tkanki tłuszczowej żółtej zawiera więcej wolnego cholesterolu niż w innych typach komórek [13].

3.1 Białka kropli lipidowych

Bardzo ważnym składnikiem kropli lipidowych są białka. Wiele z nich pełni role związane z metabolizmem tłuszczów. Białka te należą do rodziny białek PAT, której nazwa pochodzi od trzech najlepiej poznanych białek związanych z kroplami lipidowymi: perylipiny, adipofiliny (ADRP) oraz białka TIP47. Uważa się, że rolą białek PAT jest udział w biogenezie kropli lipidowych, ich stabilizacji oraz lipolizie [5]. Białka PAT wykazują różnice w ekspresji w zależności od typów komórek oraz dojrzałości kropli lipidowych. Adipofilina wiąże się z kroplami lipidowymi we wczesnych stadiach różnicowania komórek tłuszczowych. Przypisuje się jej rolę „zarządzania magazynem” tłuszczów obojętnych. W kolejnych stadiach różnicowania komórek tłuszczowych adipofilina zastępowana jest przez perylipinę. Poznano trzy izoformy perylipiny, które powstają w drodze alternatywnego składania mRNA (splicingu). W komórkach tłuszczowych ekspresji ulegają perylipina A i B, a w komórkach steroidotwórczych perylipina C. W warunkach spoczynku perylipiny funkcjonują jak „tarcza” osłaniająca krople lipidowe przed działaniem lipaz cytozolowych. Z drugiej strony perylipiny odgrywają kluczową rolę w organizacji i regulacji procesu lipolizy. Podczas stymulacji lipolitycznej perylipina ulega fosforylacji przy udziale kinazy białkowej A zależnej od cAMP. Ufosforylowana perylipina odpowiedzialna jest za rozmieszczenie i fragmentację kropli lipidowych oraz rekrutację lipaz do kropli lipidowych.

Z badań proteomów kropli lipidowych izolowanych z różnych rodzajów komórek wynika, że w kroplach lipidowych zawartych jest wiele białek nienależących do rodziny PAT [4, 10, 18]. Obecność niektórych białek została potwierdzona także w badaniach nieizolowanych kropli lipidowych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wśród białek kropli lipidowych zidentyfikowano białka charakterystyczne dla innych przedziałów komórkowych. Znamienne jest, że przynajmniej część z nich nie jest związana z metabolizmem tłuszczów. Na przykład w kroplach lipidowych potwierdzono obecność jądrowego aktywatora spliceosomu [11], enzymów cytozolowych oraz białek siateczki wewnątrzplazmatycznej [18].

4. BIOGENEZA KROPLI LIPIDOWYCH

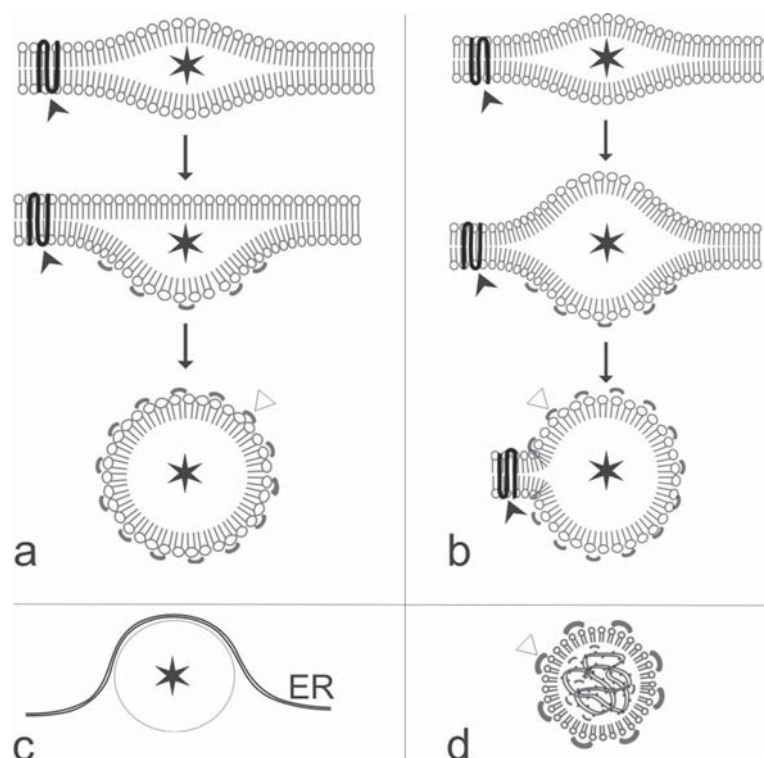
4.1. Tworzenie kropli lipidowych w błonach siateczki śródplazmatycznej

Istnieje kilka modeli opisujących biogenezę kropli lipidowych. Według jednego z najbardziej rozpowszechnionych i uznawanych przyjmuje się, że tworzenie kropli lipidowych w komórkach zwierzęcych zachodzi w błonach siateczki śródplazmatycznej [23]. Nowo zsintetyzowane estry lipidów gromadzone są w błonie siateczki śródplazmatycznej tworząc soczewkowate skupisko pomiędzy dwiema warstwami fosfolipidowymi. Powiększanie się akumulacji estrów lipidowych prowadzi do uwypuklenia siateczki na stronę cytoplazmatyczną. Kropla lipidowa powstaje w wyniku „odpączkowania” od siateczki nagromadzonych w niej estrów lipidowych wraz z pojedynczą warstwą fosfolipidową pochodzącą z cytoplazmatycznej powierzchni błony (ryc. 2a).

Odmienny model powstawania kropli lipidowych zakłada, że estry lipidowe zgromadzone pomiędzy dwuwarstwą fosfolipidową siateczki odłączają się wraz z cytoplazmatyczną, jak i niecytoplazmatyczną powierzchnią błony przez tworzenie w błonie siateczki przejściowego pora [27]. Z kroplą lipidową połączony zostaje fragment błony siateczki śródplazmatycznej, w którym obecne są integralne białka błonowe (ryc. 2b). Taki sposób formowania kropli lipidowych umożliwia ucieczkę wirusów ze światła siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy przez przejściowo pojawiający się por. Ponadto, wraz z fragmentem błony mogą opuszczać siateczkę nieprawidłowo sfałdowane białka.

4.2. Tworzenie kropli lipidowych w asocjacji z błonami siateczki śródplazmatycznej

Robenek i wsp. [28] na podstawie badań z wykorzystaniem techniki *freeze fracturing* w transmisyjnym mikroskopie elektronowym nie stwierdzili, aby krople lipidowe formowały się w błonie siateczki śródplazmatycznej. Wykazali natomiast ich obecność w bliskim jej sąsiedztwie. Zaobserwowali ponadto, że w miejscach kontaktu obu organelli siateczka ściśle przylega do powierzchni kropli tworząc częściową osłonkę w kształcie kieliszka do jajek (ang. *egg cup*), a w pojedynczej warstwie fosfolipidowej błony siateczki sąsiadującej z kroplą lipidową gromadzi się



RYCINA 2. Modele biogenezy kropli lipidowych: a, b – Biogeneza kropli lipidowych w siateczce śródplazmatycznej (a – zmodyfikowane wg [26], b – zmodyfikowane wg [27]). Estry lipidowe gromadzą się między dwiema warstwami fosfolipidowymi błony siateczki śródplazmatycznej. (a) Kropla lipidowa powstaje w wyniku „odpączkowania” od siateczki nagromadzonych w niej estrów wraz z cytoplazmatyczną warstwą fosfolipidową i związanymi z jej powierzchnią białkami. (b) Kropla lipidowa powstaje wskutek odłączenia się estrów lipidowych wraz z cytoplazmatyczną i niecytoplazmatyczną warstwą fosfolipidową oraz fragmentem błony siateczki zawierającym białko integralne. c – Biogeneza kropli lipidowych w asocjacji z błonami siateczki śródplazmatycznej (zmodyfikowane wg [28]). Krople lipidowe powstają w wyspecjalizowanych miejscach siateczki, które przyjmują kształt kieliszka do jajek. W miejscach tych tworzące się krople lipidowe ściśle przylegają do błon siateczki śródplazmatycznej. d – Biogeneza kropli lipidowych wokół pętli siateczki śródplazmatycznej (zmodyfikowane wg [32]). Krople lipidowe powstają wokół połączonych cystern siateczki śródplazmatycznej związanych z rybosomami. Białka zlokalizowane są we wnętrzu oraz na powierzchni kropli. ★ – estry lipidowe; ▷ – białka; ▲ – białka integralne, • – rybosomy; ER – siateczka śródplazmatyczna

FIGURE 2 Models of lipid droplets biogenesis : a, b – Biogenesis of lipid droplets in endoplasmic reticulum (a – modified from [26], b – modified from [27]). Lipid esters accumulate between two leaflets of endoplasmic reticulum membrane. (a) Lipid droplet forms as a result of budding of lipid esters covered by the cytoplasmic leaflet of endoplasmic reticulum and its associated proteins. (b) Lipid esters hatch with cytoplasmic and luminal leaflets of endoplasmic reticulum membrane forming the lipid droplet. To the latter a small fragment of endoplasmic reticulum membrane with an integral protein is attached. c – Biogenesis of lipid droplets in association with endoplasmic reticulum (modified from [28]). Lipid droplet forms in close apposition to endoplasmic reticulum membranes in the specialized cup-shaped area. d – Biogenesis of lipid droplets around enfolded membranes of endoplasmic reticulum (modified from [32]). Lipid droplet forms around loops of endoplasmic reticulum cisterns associated with ribosomes. Proteins are located inside the lipid droplet core and on its surface. ★ – lipid esters; ▷ – proteins; ▲ – integral proteins; • – ribosomes; ER – endoplasmic reticulum

adipofilina. Korzystając z tych informacji autorzy zaproponowali odmienny od powszechnie przyjętego model biogenezy kropli lipidowych. Przyjęli, że krople lipidowe nie są tworzone w obrębie błon siateczki śródplazmatycznej, tylko w apozycji do nich, a białkiem odpowiedzialnym za transport tłuszczów z siateczki do tworzącej się kropli jest adipofilina [28] (ryc. 2c).

Przedstawiony powyżej mechanizm tworzenia kropli lipidowych w asocjacji z siateczką wykazuje podobieństwo do biogenezy kropli lipidowych u organizmów prokariotycznych, u których krople lipidowe powstają w sąsiedztwie błony plazmatycznej [26].

4.3. Tworzenie kropli lipidowych wokół pętli siateczki śródplazmatycznej

W niektórych przypadkach we wnętrzu kropli lipidowych obserwowano błony związane z rybosomami [32]. Sugeruje się, że w leukocytach krople lipidowe powstają w wyniku włączania do ich wnętrza licznych pofałdowanych cystern siateczki śródplazmatycznej oraz związanych z nią rybosomów (ryc. 2d). Cysterny siateczki oraz rybosomy pozostają również na powierzchni kropli lipidowych. Model ten wyjaśnia obecność rybosomów oraz błon i białek siateczki śródplazmatycznej w kroplach lipidowych. Wskazuje także na potencjalny udział kropli lipidowych w syntezie białek.

Biorąc pod uwagę bezpośredni lub pośredni udział siateczki śródplazmatycznej w biogenezie kropli lipidowych, przyjmuje się, że ma ona wyspecjalizowane regiony przystosowane do pełnienia tej szczególnej funkcji [26].

5. WZROST KROPLI LIPIDOWYCH

Mechanizm wzrostu kropli lipidowych nie został ostatecznie wyjaśniony. Wydaje się, że zwiększenie ich objętości może przebiegać na kilka sposobów [13]. Jednym z nich jest ich homotypowa fuzja. Przed fuzją krople lipidowe ulegają asocjacji, w której przypuszczalnie biorą udział mikrotubule [15]. U drożdży połączone krople lipidowe mogą tworzyć liniowe lub rozgałęzione łańcuchy [6]. Uważa się, że podobnie jak w przypadku pęcherzyków, w fuzję kropli lipidowych zaangażowane są białka SNARE. Objętość kropli lipidowej powstałej w wyniku fuzji zwiększa się proporcjonalnie do objętości kropli, z których powstała. Ponieważ jednak nowo powstała kropla lipidowa przyjmuje kształt sferyczny, to w konsekwencji zmniejsza się stosunek powierzchni do objętości, a to z kolei przyczynia się do powstania nadmiaru fosfolipidów i białek związanych z powierzchnią kropli. Nadmiar składników powierzchni może być eliminowany na dwa sposoby. Jednym z nich jest odłączanie fosfolipidów i białek od kropli, a drugim włączanie ich wnętrza kropli.

Inny niż fuzja mechanizm wzrostu kropli lipidowych może polegać na dodawaniu do istniejącej kropli estrów lipidowych syntetyzowanych w siateczce śródplazmatycznej. Sposób, w jaki estry lipidowe dostarczane są do kropli lipidowej, nie jest jasny. Z jednej strony przyjmuje się, że krople lipidowe utrzymują ciągły lub tymczasowy kontakt z siateczką śródplazmatyczną, podczas którego dochodzi do

przekazywania estrów lipidowych. Jest także możliwe, że estry lipidowe transportowane są z siateczki do kropli w formie rozpuszczalnych kompleksów. Wzrost kropli lipidowych przez dołączanie estrów lipidowych prowadzi do zwiększenia objętości kropli i wymaga dostarczania do niej składników powierzchniowych [13]. W kroplach lipidowych drożdży wykazano obecność enzymów zaangażowanych w biosyntezę tłuszczów, co przemawia za zdolnością tych organelli do wzrostu wynikającego z własnych syntez [15].

6. INTERAKCJE KROPLI LIPIDOWYCH Z ORGANELAMI

6.1. Połączenie kropli lipidowych z siateczką śródplazmatyczną

W niektórych typach komórek krople lipidowe jako odrębne organelle pozostają w stałym kontakcie z siateczką śródplazmatyczną, a za ich połączenie odpowiada białko Rab 18 [36]. Istnieje także odmienny pogląd, według którego krople lipidowe nigdy nie opuszczają siateczki śródplazmatycznej i w związku z tym traktowane są jako jej specyficzny region [15]. Utrzymanie stałego kontaktu kropli lipidowych z siateczką może być jednym z mechanizmów ułatwiających wymianę białek i lipidów pomiędzy tymi organellami.

6.2. Połączenie kropli lipidowych z mitochondriami i peroksysomami

Mitochondria oraz peroksysomy są często obserwowane w bliskim sąsiedztwie kropli lipidowych. W obu przypadkach kontakt z kroplami lipidowymi wynika z udziału tych organelli w procesach lipolizy i oksydacji kwasów tłuszczowych. Zarówno mitochondria, jak i peroksysomy są zdolne do syntezy ATP w drodze β-oksydacji kwasów tłuszczowych, których źródłem są triacyloglicerole znajdujące się w kroplach lipidowych [15, 24]. W interakcji pomiędzy kroplami lipidowymi a mitochondriami uczestniczy białko SNAP23 [19]. Pomiedzy kroplami lipidowymi i peroksysomami obserwowano ścisły kontakt. W pewnych przypadkach stwierdzono, że peroksysomy tworzą wypustki, które zagłębiają się w krople lipidowe [6]. Wymiana substancji pomiędzy peroksysomami a kroplami lipidowymi może być dwukierunkowa, gdyż niektóre krople lipidowe zawierają lipidy eterowe syntetyzowane w peroksysomach [1].

6.3. Połączenie kropli lipidowych z endosomami

Krople lipidowe obserwowano w bliskim kontakcie z endosomami. Analiza proteomu kropli lipidowych w komórkach ssaków wykazała obecność różnych rodzajów białek Rab odpowiedzialnych za kontakt z wczesnymi endosomami [24]. Znaczenie białek Rab w łączeniu kropli lipidowych z wczesnymi endosomami stwierdzono także w badaniach *in vitro* [21]. Uważa się, że endosomy za pośrednictwem kaweoliny uczestniczą w transporcie egzogennych kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu do kropli lipidowych. Przy pomocy endosomów do kropli lipidowych transportowane są również białka SNARE uczestniczące w homotypowej fuzji kropli [15].

6.4. Interakcje kropli lipidowych z fagosomami

Interakcje kropli lipidowych z fagosomami zaobserwowano w granulocytach obojętnochłonnych. Kontakt ten jest krótkotrwały i przypomina łączenie się endosomów na zasadzie *kiss and run*. Łączenie się tych organelli służy przypuszczalnie dojrzewaniu fagosomów [33].

6.5. Interakcje z elementami cytoszkieletu

Krople lipidowe mogą wchodzić w interakcje ze wszystkimi elementami cytoszkieletu. Wykazano, że za oddziaływanie cytoszkieletu z kroplami lipidowymi odpowiedzialne jest białko G [2]. Ukierunkowany transport wzdłuż mikrotubul z udziałem białek motorycznych zapewnia dystrybucję kropli lipidowych do odpowiednich przedziałów komórki [13, 33, 34]. Białkiem motorycznym odpowiedzialnym za ruch i fuzję kropli lipidowych w fibroblastach jest dyneina. Natomiast w zarodkach *Drosophila* w ruch kropli lipidowych do części peryferycznych zaangażowana jest kinezyna [34].

Filamenty wimentynowe, reprezentujące jeden z typów filamentów pośrednich, obserwowano na powierzchni dojrzewających kropli lipidowych w adipocytach [9]. Prawdopodobnie tworzone wokół poszczególnych kropli klatki wimentynowe zapobiegają łączeniu się kropli lipidowych z innymi organellami błonowymi, w tym również fuzji niedojrzałych kropli lipidowych, stabilizując krople lipidowe podczas ich tworzenia [14].

Łączenie się filamentów aktynowych z kroplami lipidowymi nie jest tak bezpośrednie jak w przypadku pozostałych elementów cytoszkieletu. Badania dotyczące syntezy hormonów steroidowych w komórkach kory nadnerczy wykazały, że filamente aktynowe tworzące połączenia z filamentami pośrednimi w tych komórkach w sposób pośredni ułatwiają kontakt kropli lipidowych z mitochondriami. Kontakt taki umożliwia transport z kropli do mitochondriów cholesterolu, który wykorzystywany jest do syntezy hormonów [16].

7. FUNKCJE KROPLI LIPIDOWYCH

Do niedawna krople lipidowe ze względu na zdolność do magazynowania tłuszczów identyfikowano jako jeden z rodzajów materiałów zapasowych i jednocześnie traktowano jako bierne organelle komórkowe. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że krople lipidowe spełniają w komórce różne funkcje. Część procesów, w których aktywnie uczestniczą, jest związana z metabolizmem tłuszczów. Przy udziale białek PAT zachodzi wzrost oraz stabilizacja kropli lipidowych, a także uwalnianie tłuszczów z kropli lipidowych [5]. Estry lipidowe gromadzone w kroplach lipidowych mogą ulegać hydrolizie, a następnie zostać wykorzystane w takich procesach, jak: β -oksydacja kwasów tłuszczowych, biogeneza błon, synteza lipoprotein, przyłączanie tłuszczów do białek oraz tworzenie cząsteczek sygnałowych [13]. Estry cholesterolu

magazynowane w kroplach lipidowych komórek steroidotwórczych wykorzystywane są do produkcji hormonów steroidowych. Estry kwasu arachidonowego służą do syntezy eikozanoidów (prostaglandyn, leukotrienów, tromboksanów i prostacyklin) syntetyzowanych między innymi przez komórki biorące udział w procesach zapalnych [8]. Natomiast estry retinolu, jako źródło witaminy A, magazynowane są w kroplach lipidowych komórek gwiaździstych wątroby oraz komórek pigmentowych nabłonka siatkówki [7]. Zdolność magazynowania i uwalniania zmagazynowanych tłuszczów sprawia, że krople lipidowe są zaangażowane w utrzymanie homeostazy lipidowej w komórce. Magazynowanie wolnych kwasów tłuszczowych w postaci triacylogliceroli w kroplach lipidowych komórek niebędących adipocytami stanowi mechanizm przeciwdziałający ich lipotoksycznemu działaniu.

7.1. Wewnątrzkomórkowy transport tłuszczów

Ponieważ krople lipidowe wchodzą w interakcje z siateczką śródplazmatyczną, peroksysomami, mitochondriami i endosomami oraz mają białka zaangażowane w transport błon, uważa się, że jedną z wielu funkcji kropli lipidowych jest udział w dostarczaniu tłuszczów i fosfolipidów do różnych organelli otoczonych błoną. Jak już wspomniano, za interakcje organelli błonowych z kroplami lipidowymi odpowiedzialne są specyficzne białka Rab [21]. Zaproponowano przypuszczalny mechanizm transportu tłuszczów, substancji niskocząsteczkowych i jonów pomiędzy organellami i kroplami lipidowymi [36]. W transporcie tym biorą udział chwilowe międzyprzedziałowe miejsca kontaktu (ang. *transient intercompartmental contact sites*), które służą do transferu substancji bez konieczności fuzji błon. Prawdopodobnie w tworzeniu chwilowych miejsc kontaktu biorą udział także białka SNARE, które mogą być odpowiedzialne za dokowanie organelli.

7.2. Funkcje kropli lipidowych niezwiązane z metabolizmem tłuszczów

Krople lipidowe pełnią także funkcje niezwiązane bezpośrednio z metabolizmem tłuszczów. Wskazują na to między innymi wyniki badań proteomów kropli lipidowych różnych rodzajów komórek. Dzięki analizie składu białkowego kropli lipidowych wykazano obecność białek znanych dotychczas z występowania i funkcjonowania w innych przedziałach komórkowych, takich jak: jądro komórkowe, siateczka śródplazmatyczna, peroksysomy, mitochondria czy endosomy. Na tej podstawie zaczęto wnioskować o roli kropli lipidowych w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, transporcie pęcherzykowym, a także magazynowaniu białek [13, 33]. Wykazano na przykład, że z kroplami lipidowymi łączy się stomatyna (integralne białko błonowe) [31] oraz inne białka zaangażowane w regulację transportu błon, czyli odpowiedzialnych za tworzenie, odpączkowanie oraz transport pęcherzyków, a także ich dostarczanie do docelowych przedziałów błonowych [36].

7.3. Wiązanie białek w celu ich inaktywacji

Szczególną uwagę poświęca się badaniom służącym wyjaśnieniu przyczyn, sposobu wiązania i retencji białek w kroplach lipidowych. Sugeruje się, że zdolność kropli lipidowych do wiązania białek stanowi istotny element mechanizmu ich inaktywacji. Podwyższona zawartość białek w komórce wywołana takimi procesami, jak: nadekspresja, infekcja lub zahamowany rozkład, może być dla komórki niekorzystna ze względu na skłonność niektórych białek do tworzenia agregatów, które mają toksyczne działanie na komórkę. Wiązanie białek z kroplami lipidowymi prowadzi do ich czasowej inaktywacji zabezpieczając komórkę przed uszkodzeniem. Inaktywacja białek może odbywać się przez blokowanie katalitycznych miejsc enzymów lub przestrzenną separację białek od ich substratów lub białek wiążących. Przykładem białek czasowo inaktywowanych w kroplach lipidowych są histony. Ich obecność w kroplach lipidowych wykazano w oocytach i wczesnych zarodkach *Drosophila*, komórkach drożdży i leukocytach człowieka [33]. Odkryto, że wczesne zarodki *Drosophila* zawierają matczyne, czyli wyprodukowane podczas oogenezy, bardzo liczne białka histonowe, z których większość związana jest z kroplami lipidowymi [10]. Wykazano również, że ilość histonów związanych z kroplami lipidowymi maleje podczas pierwszych godzin embriogenezy, co jest związane z uwalnianiem histonów wykorzystywanych do tworzenia chromatyny podczas intensywnych podziałów jąder w rozwijającym się zarodku. Tak więc uważa się, że u *Drosophila* wiązanie histonów z kroplami lipidowymi stanowi mechanizm prowadzący do ich inaktywacji podczas oogenezy w celu zabezpieczenia oocytu przed potencjalnie toksycznym działaniem ich nadmiaru.

7.4. Wiązanie białek wywołane czynnikami zewnętrznymi

Wiele z białek ulega warunkowej translokacji do kropli lipidowych prowadząc do zmiany ich składu białkowego. Na przykład w komórkach ssaków, w wyniku stymulacji hormonalnej insuliną lub pod wpływem działania kwasu oleinowego, z powierzchnią kropli lipidowej wiąże się dehydrogenaza monofosforanu inozy (enzym zaangażowany w syntezę puryn) [35]. Natomiast w adipocytach pod wpływem szoku cieplnego, z kroplami lipidowymi wiąże się białko szoku cieplnego – Hsp70 [20].

7.5. Wiązanie białek nieprawidłowo sfałdowanych

Z kroplami lipidowymi wiążą się białka nieprawidłowo sfałdowane. Reszty hydrofobowe takich białek wyeksponowane są na zewnątrz, co sprzyja łączeniu się białek w agregaty toksyczne dla komórki. Przypuszcza się, że podczas asocjacji białek z kroplami lipidowymi może dochodzić do uzyskania przez białka właściwej konformacji przy udziale chaperonów. Kroplom lipidowym przypisuje się zdolność do dezaktywacji uszkodzonych białek. Ponieważ obecność chaperonów w kroplach lipidowych nie została potwierdzona, sugeruje się, że to same krople lipidowe pełnią rolę analogiczną do chaperonów [33].

7.6. Wiązanie białek w celu ich degradacji

Krople lipidowe mogą być miejscem magazynowania białek przeznaczonych do degradacji. Jednym z białek wiązanych z kroplami lipidowymi przed degradacją jest ApoB, główny składnik białkowy lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL), produkowanych w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów. Gdy proces łączenia się ApoB z lipidami przebiega nieprawidłowo, wówczas cząsteczki ApoB przeznaczone zostają do degradacji w proteasomach. Przy inhibicji procesów autofagii oraz degradacji w proteasomach, ApoB gromadzi się wokół kropli lipidowej w formie półksiężyca. Zgromadzone cząsteczki ApoB są wysoce ubikwitynowane, a wokół kropli obecne są podjednostki proteasomów. Uważa się więc, że degradacja ApoB zachodzi wokół kropli lipidowych, a powierzchnia kropli lipidowych służy jako swoista „platforma” łącząca procesy degradacji białek w proteasomach oraz autofagosomach [25].

7.7. Wiązanie RNA

Analiza proteomowa kropli lipidowych leukocytów wykazała obecność białek wiążących RNA oraz białek podjednostek rybosomalnych. Na poziomie ultrastrukturalnym stwierdzono występowanie rybosomów na powierzchni oraz wewnątrz kropli lipidowych. Przypuszcza się, że krople lipidowe mają zdolność do syntezy białek, o czym świadczy obecność związanych z nimi rybosomów [32].

7.8. Udział kropli lipidowych w procesach zapalnych

W niektórych typach komórek (np. w leukocytach czy komórkach nowotworowych) liczba kropli lipidowych może gwałtownie wzrastać, pomimo iż komórki te nie są zaangażowane w magazynowanie tłuszczów. Biosynteza kropli lipidowych w tych komórkach jest odpowiedzią na czynniki wywołujące procesy zapalne, związane z infekcjami czy nowotworzeniem. Poznano już niektóre z cząsteczek sygnałowych indukujących i regulujących biosyntezę kropli lipidowych w leukocytach [8]. Jak już wspomniano, krople lipidowe leukocytów są magazynem kwasu arachidonowego wykorzystywanego do produkcji eikozanoidów. Zwiększona synteza kropli lipidowych wywołana procesem zapalnym pociąga za sobą wzrost syntezy eikozanoidów, biorących udział w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak: proliferacja, apoptoza, procesy zapalne i transformacja nowotworowa. Zdolność do zlokalizowanej syntezy eikozanoidów pozwala traktować krople lipidowe jako organelle pełniące istotną rolę w procesach zapalnych i neoplazji. Wiele uwagi poświęca się wynikom badań klinicznych i eksperymentalnych w walce z patogenami. Blokada syntezy kropli lipidowych wydaje się być skutecznym narzędziem w tej walce, gdyż zahamowanie syntezy eikozanoidów w kroplach lipidowych zredukowałoby ich wpływ na proliferację komórek i hamowanie apoptozy [8].

Udział kropli lipidowych w odpowiedzi na czynniki infekcyjne może być także realizowany w inny sposób. Mianowicie w kroplach lipidowych wykazano obecność białka antywirusowego – wiperyny, którego synteza indukowana jest przez HCV.

Wiperyna wiąże się z kroplami lipidowymi w sposób podobny do białka niestrukturalnego wirusa i hamuje jego replikację [17].

7.9. Interakcje kropli lipidowych z patogenami

Patogeny wykorzystują tłuszcze gospodarza na własne potrzeby, na przykład w celach replikacyjnych. Źródłem tłuszczów mogą być między innymi błony ciał wielopęcherzykowych [3]. Ostatnie badania wykazały, że patogenne bakterie *Chlamydia trachomatis* wykorzystują również tłuszcze zgromadzone w kroplach lipidowych [12]. Zaobserwowano, że krople lipidowe są transportowane z cytoplazmy do wakuoli, w której znajdują się bakterie. Opisano kolejne etapy interakcji kropli lipidowych z wakuolami zawierającymi bakterie. Początkowo produkowane przez bakterie białko Lda3 wiąże się z powierzchnią kropli lipidowej. Za jego pośrednictwem krople lipidowe łączą się z błoną wakuoli. Następnie błona wakuoli wraz kroplą lipidową tworzy wpuklenia, z którymi ściśle wiążą się znajdujące się we wnętrzu wakuoli ciała siateczkowate (ang. *reticulate bodies*). Autorzy sugerują, że białko Lda3 może inicjować proces lipolizy przez odłączanie od powierzchni kropli ADRP, które jak już wspomniano pełnią rolę „tarczy ochronnej” przeciwdziałającej rozkładowi tłuszczów.

Udział kropli lipidowych w replikacji patogennych wirusów poznano najlepiej na przykładzie wirusa HCV [22] oraz wirusa dengi [29]. Wykazano, że krople lipidowe biorą udział w różnych fazach cyklu życiowego wirusów i są miejscem wiązania białek kapsydu, białek niestrukturalnych oraz kompleksów replikacyjnych wirusa. Zahamowanie syntezy kropli lipidowych może przyczyniać się do obniżenia zdolności replikacyjnych wirusów [29].

8. PODSUMOWANIE

Aktualne poglądy na biogenezę kropli lipidowych, ich wzrost, interakcje z innymi organellami oraz elementami cytoszkieletu przedstawiają je jako organelle złożone i dynamiczne. Zdolność do wiązania białek z innych przedziałów komórkowych świadczy o ich zaangażowaniu w sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz wewnątrzkomórkowy transport. Wskazuje także na rolę w magazynowaniu białek, a także w regulacji ich aktywności. Udział kropli lipidowych w wielu procesach komórkowych stał się podstawą do intensywnych badań. Należy się spodziewać, że badania zarówno aktualnie prowadzone, jak i te, które będą realizowane w niedalekiej przyszłości, przyczynią się do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie kropli lipidowych oraz uzupełnią naszą wiedzę na temat ich różnorodnych funkcji.

PODZIĘKOWANIA

Autorka pracy dziękuje prof. dr hab. Januszowi Kubrakiewiczowi z Zakładu Biologii Rozwoju Zwierząt Uniwersytetu Wrocławskiego za krytyczne uwagi dotyczące niniejszej pracy oraz za udostępnienie zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

LITERATURA

- [1] BARTZ R, LI W-H, VENABLES B, ZEHMER JK, ROTH MR, WELTI R, ANDERSON RGW, LIU P, CHAPMAN KD. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 2007; **48**: 837–847.
- [2] BARTZ R, ZEHMER JK, ZHU M, CHEN Y, SERRERO G, ZHAO Y, LIU P. Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* 2007; **6**: 3256–3265.
- [3] BEATTY WL. Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*. *J Cell Sci* 2006; **119**(2): 350–359.
- [4] BELLER M, RIEDEL D, JÄNSCH L, DIETERICH G, WEHLAND J, JÄCKLE H, KÜHNLEIN RP. Characterization of the *Drosophila* Lipid Droplet Subproteome. *Mol Cell Prot* 2006; **5**: 1082–1094.
- [5] BICKEL PE, TANSEY JT, WELTE MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**: 419–440.
- [6] BINNS D, JANUSZEWSKI T, CHEN Y, HILL J, MARKIN VS, ZHAO Y, GILPIN C, CHAPMAN KD, ANDERSON RGW, GOODMAN JM. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol* 2006; **173**: 719–731.
- [7] BLANER WS, O'BYRNE SM, WONGSIRIROJ N, KLUWE J, D'AMBROSIO DM, JIANG H, SCHWABE RF, HILLMAN EMC, PIANTEDOSIR, LIBIEN J. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**: 467–473.
- [8] BOZZA PT, VIOLA JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005.
- [9] BRASEAMLE DL, DOLIOS G, SHAPIRO L, WANG R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 46835–46842.
- [10] CERMELLI S, GUO Y, GROSS SP, WELTE MA. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol* 2006; **16**(21): R918–20.
- [11] CHO SY, SHIN ES, PARK PJ, SHIN DW, CHANG HK, KIM D, LEE HH, LEE JH, KIM SH, SONG MJ, CHANG I-S, LEE OK, LEE TR. Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2456–2465.
- [12] COCCHIARO JL, KUMAR Y, FISCHER ER, HACKSTADT T, VALDIVIA RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**(27): 9379–9384.
- [13] FUJIMOTO T, OHSAKI Y, CHENG J, SUZUKI M, SHINOHARA Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 2008; **130**: 263–279.
- [14] GOLDMAN RD, GRIN B, MENDEZ MG, KUCZMARSKI ER. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**(1): 28–34.
- [15] GOODMAN JM. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem* 2008; **283**(42): 28005–28009.
- [16] HALL PF, ALMAHBOBI G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech* 1997; **36**: 463–479.
- [17] HINSON ER, CRESSWELL P. The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic α -helix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**(48): 20452–20457.
- [18] HODGES BD, WU CC. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res* 2010; **51**(2): 262–273.
- [19] JÄGERSTRÖM S, POLESIE S, WICKSTRÖM Y, JOHANSSON BR, SCHRÖDER HD, HØJLUND K, BOSTRÖM P. Lipid droplets interact with mitochondria using SNAP23. *Cell Biol Int* 2009; **33**(9): 934–940.
- [20] JIANG H, HE J, PU S, TANG C, XU G. Heat shock protein 70 is translocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1771**: 66–74.
- [21] LIU P, BARTZ R, ZEHMER JK, YING YS, ZHU M, SERRERO G, ANDERSON RG. Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773**: 784–793.
- [22] MIYANARI Y, ATSUZAWA K, USUDAN, WATASHI K, HISHIKI T, ZAYAS M, BARTENSHLAGER R, WAKITA T, HIJIKATA M, SHIMOTOHNO K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1089–1097.
- [23] MURPHY DJ, VANCE J. Mechanism of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 109–115.

- [24] MURPHY S, MARTIN S, PARTON RG. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**: 441–447.
- [25] OHSAKI Y, CHENG J, SUZUKI M, FUJITA A, FUJIMOTO T. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2415–2422.
- [26] OHSAKI Y, CHENG J, SUZUKI M, SHINOHARA Y, FUJITA A, FUJIMOTO T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1791**: 399–407.
- [27] PLOEGH HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 2007; **448**: 435–438.
- [28] ROBENEK H, HOFNAGEL O, BUERS I, ROBENEK MJ, TROYER D, SEVERS NJ. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* 2006; **119**: 4215–4224.
- [29] SAMSA MM, MONDOTTE JA, IGLESIAS NG, ASSUNÇÃO-MIRANDA I, BARBOSA-LIMA G, DA POIAN AT, BOZZA PT, GAMARNIK AV. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathog* 2009; **5**(10): e1000632. doi:10.1371.
- [30] TAUCHI-SATO K, OZEKI S, HOUJOU T, TAGUCHI R, FUJIMOTO T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* 2002; **277**(46): 44507–44512.
- [31] UMLAUFE, CSASZAR E, MOERTELMAIER M, SCHUETZ GJ, PARTON RG, PROHASKAR. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* 2004; **279**(22): 23699–23709.
- [32] WAN H-C, MELO RCN, JIN Z, DVORAK AM, WELLER PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 2007; **21**(1): 167–178.
- [33] WELTE MA. Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol* 2007; **17**(8): 363–369.
- [34] WELTE MA. Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochem Soc Trans* 2009; **37**: 991–996.
- [35] WHITEHEAD JP, SIMPSON F, HILL MM, THOMAS EC, CONNOLLY LM, COLLART F, SIMPSON RJ, JAMES DE. Insulin and oleate promote translocation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase to lipid bodies. *Traffic* 2004; **5**: 739–749.
- [36] ZEHMER JK, HUANG Y, PENG G, PU J, ANDERSON RG, LIU P. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics* 2009; **9**(4): 914–921.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 15.04.2010 r.

Przyjęto: 11.06. 2010 r.

Izabela Jędrzejowska

Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt, Instytut Zoologiczny Uniwersytetu Wrocławskiego,

ul. Sienkiewicza 21, 50-335 Wrocław

e-mail: ijowska@biol.uni.wroc.pl