

MIKRODOMENY (RAFTY) LIPIDOWE W BŁONACH KOMÓRKOWYCH: STRUKTURA, FIZJOLOGIA I ZNACZENIE W PROCESACH PATOLOGICZNYCH

LIPID MICRODOMAIN (LIPID RAFTS) IN CELL MEMBRANE: STRUCTURE, PHYSIOLOGY AND ITS ROLE IN PATHOLOGICAL PROCESSES

Urszula WOJEWÓDZKA¹, Barbara GAJKOWSKA¹, Jerzy JURKIEWICZ², Robert GNIADDECKI³

¹ Zakład Ultrastruktury Komórki, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN oraz ² Klinika Neurochirurgii II Wydziału Lekarskiego AM i Zespół Badawczo-Lecznicy Neurochirurgii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie;

³ Klinika Dermatologii, Bispebjerg Hospital, Uniwersytet w Kopenhadze, Dania

Streszczenie: Klasyczny model struktury błony komórkowej zaproponowany przez Singera i Nicolsona w 1972 roku został ostatnio zmodyfikowany. Badania wykazały, że cząsteczki lipidów w błonie komórkowej nie mają przypadkowego rozmieszczenia, lecz tworzą mikrodomeny wzbogacone w cholesterol, sfingolipidy i gangliozydy. Te mikrodomeny lipidowe (zwane też raftami lipidowymi) zostały uwidocznione w żywych komórkach za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej, mikroskopii wykorzystującej skanowanie powierzchni komórek sondą (*scanning probe microscopy*) oraz mikroskopii elektro nowej mroźniowej. Rafty mogą być oczyszczane za pomocą ultrawirowania lub flotacji. Rafty lipidowe pełnią kluczową rolę w metabolizmie komórki poprzez ich związek z różnymi ważnymi molekułami błonowymi, takimi jak: cytokiny, receptory czynników wzrostowych, receptory śmierci lub niereceptorowe kinazy białkowe. W tej pracy przedstawiamy przegląd zebranych informacji dotyczących roli raftów lipidowych w homeostazie komórki oraz w patogenezie chorób zakaźnych, nowotworowych, przewlekłego zapalenia, cukrzycy i chorób degeneracyjnych centralnego układu nerwowego.

Słowa kluczowe: mikrodomeny lipidowe (=rafty lipidowe), cholesterol, gangliozydy, receptory czynników wzrostowych.

Summary: The classical bilayer model of cell membrane structure proposed by Singer and Nicholson in 1972 has recently been modified. Research has shown that lipid molecules in the membrane do not have a random horizontal distribution but form submicroscopic domain enriched in cholesterol, sphingolipids and gangliosides. These lipid microdomain (also named lipid rafts) have been visualised in living cells by a variety of methods including fluorescence microscopy with lipid-specific probes, scan-

ning probe microscopy and cryoelectron microscopy. Rafts can be purified by ultracentrifugation and flotation techniques. Lipid rafts play a key functional role in cell metabolism by means of their association with a variety of important membrane molecules, including cytokine and growth factor receptors, death receptors or non-receptor protein kinases. In this paper we briefly review the role of lipid rafts in cell homeostasis and their pathogenic significance in infection diseases, cancer, chronic inflammation, diabetes and degenerative disorders of the central nervous system.

Key words: lipid rafts, cholesterol, gangliosides, plasma membrane, growth factor receptors.

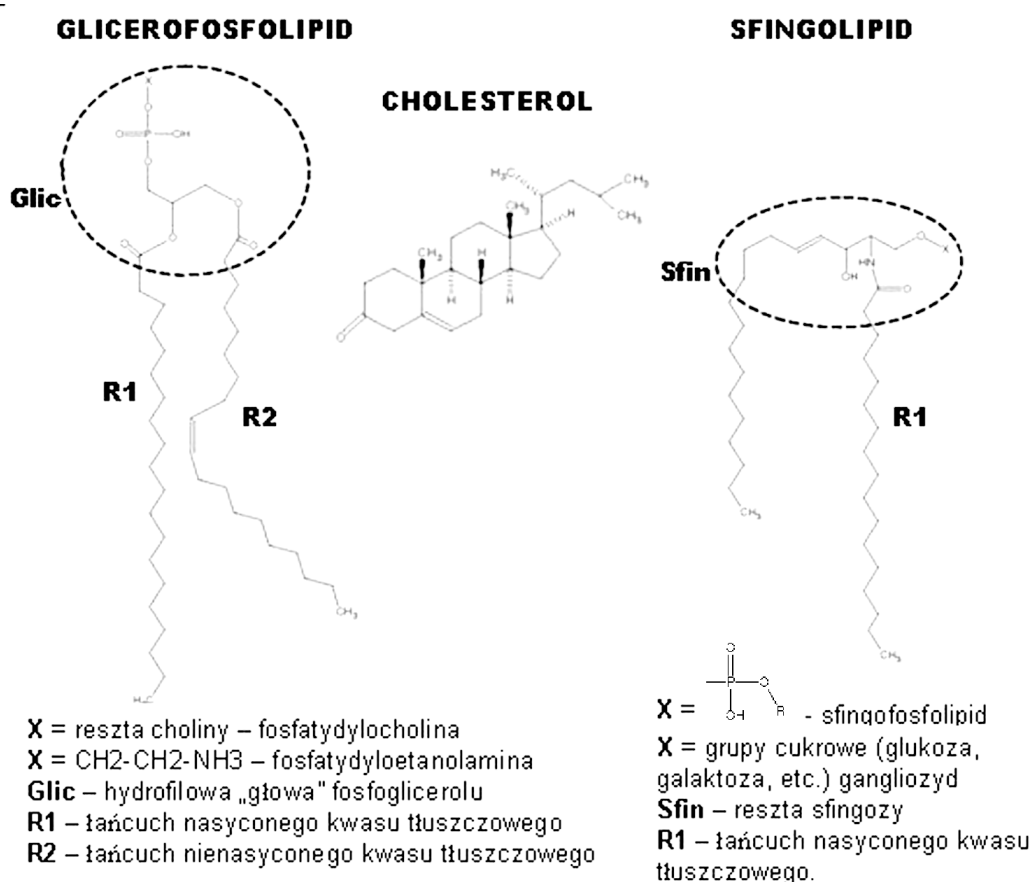
Mozaikowa struktura błon biologicznych zaproponowana w 1972 roku przez Singera i Nicholsona była przez wiele dziesięcioleci traktowana jako ostateczna. Według tego modelu błony biologiczne składają się z homogennej, podwójnej warstwy glicerofosfolipidów zbudowanej głównie z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny z domieszką sfingolipidów. Polarne grupy fosfolipidów zwrócone są na zewnątrz i kontaktują się ze środowiskiem wodnym, natomiast hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych zwrócone są do środka błony. Glicerofosfolipidy w błonach komórkowych zawierają zwykle nienasycony łańcuch w pozycji sn-2, co wzmacnia „płynność” i termodynamiczną niestabilność błon. Dlatego też w błonach komórkowych znajduje się cholesterol, którego funkcją jest stabilizacja błon poprzez „wypełnianie” przestrzeni pomiędzy nienasyconymi łańcuchami acylowymi a co za tym idzie zwiększenie uporządkowania i stabilności fosfolipidów (ryc. 1A, 1B) [36]. W błonach komórkowych znajdują się również białka pełniące funkcje receptorowe i sygnalizacyjne w komórkach oraz inne komponenty lipidowe, głównie sfingofosfolipidy i glikolipidy.

Mozaikowy model błon biologicznych tłumaczy wiele zjawisk w zakresie fizjologii komórkowej. Nie jest jednak w stanie utrzymać się w konfrontacji z nowszymi wynikami badań nad strukturą błon plazmatycznych. W przeciwieństwie do tradycyjnego modelu, gdzie cholesterol i glicerofosfolipidy są równomiernie rozproszone w błonie komórkowej, wydaje się obecnie, iż cholesterol, sfingo- i glikolipidy zagęszczone są w małych obszarach błon, tworząc swoiste mikrodomeny lipidowe. Są one również nazywane raftami lipidowymi. Nazwa rafty lipidowe (ang. *lipid rafts*) utworzona została na podstawie pewnego podobieństwa zgrubiałych mikrodomen do tratw (ang. *rafts*) pływających po gładkiej tafli wodnej, która w przypadku błon odpowiada warstwie fosfolipidów (ryc. 1B).

W niniejszej pracy streścimy dane doświadczalne sugerujące istnienie raftów. Opiszemy także centralne znaczenie tych struktur w regulacji aktywności receptorów błonowych, sygnalizacji komórkowej oraz w niektórych procesach patologicznych.

WIELKOŚĆ RAFTÓW LIPIDOWYCH I ICH ROZMIESZCZENIE W KOMÓRCIE

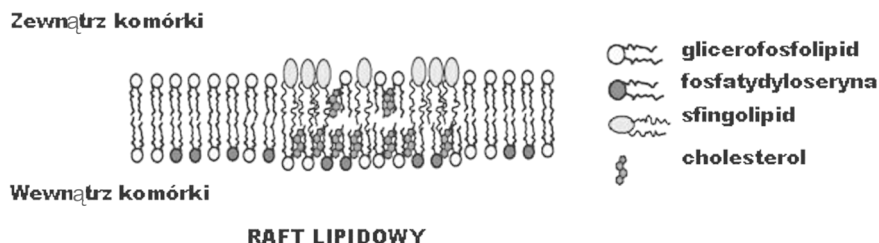
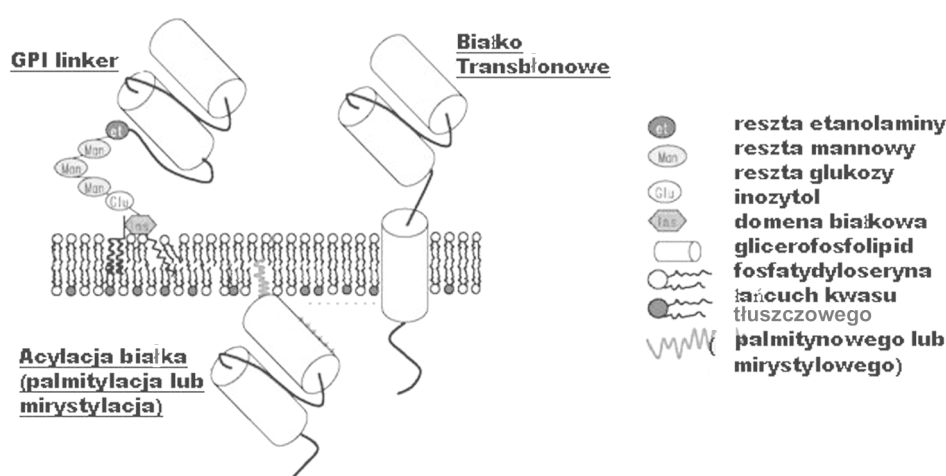
Rafty lipidowe można zdefiniować jako odgraniczone mikroobszary (domeny) w błonach komórkowych, które charakteryzują się większą grubością i gęstością frakcji lipidowej oraz zwiększoną zawartością cholesterolu i glikolipidów niż otoczenie. Struktura mikrodomenowa obserwowana jest nie tylko w żywych komórkach, ale także w sztucznie utworzonych membranach składających się z mieszaniny fosfolipidów,



RYCINA 1. Główne lipidy obecne w błonach komórkowych i ich udział w powstawaniu raftów lipidowych: **A**: Błony komórkowe tworzone są przez mieszaninę glicerofosfolipidów (takich jak fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna), sfingolipidów (ceramidy i sfingofosfolipidy), glikolipidów (cerebrozydy, gangliozydy) i cholesterolu. Glicerofosfolipidy zawierają często nienasycony łańcuch kwasu tłuszczowego (np. kwas oleinowy), natomiast sfingolipidy zawierają głównie reszty nasycone. Neutralne glicerofosfolipidy, takie jak fosfatydylocholina, znajduje się w obu listkach błony komórkowej, tłuszcze o ładunku ujemnym (fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina) oraz prawdopodobnie cholesterol znajdują się głównie w listku wewnętrznym

cholesterolu i sfingolipidów na powierzchni buforu. Metoda ta, od nazwisk odkrywców nazywana techniką Langmuira-Blodgetta, jest szeroko stosowana w badaniach biofizycznych i termodynamicznych właściwości raftów lipidowych (dokładny opis metody znaleźć można w następujących publikacjach: [10, 75, 55]).

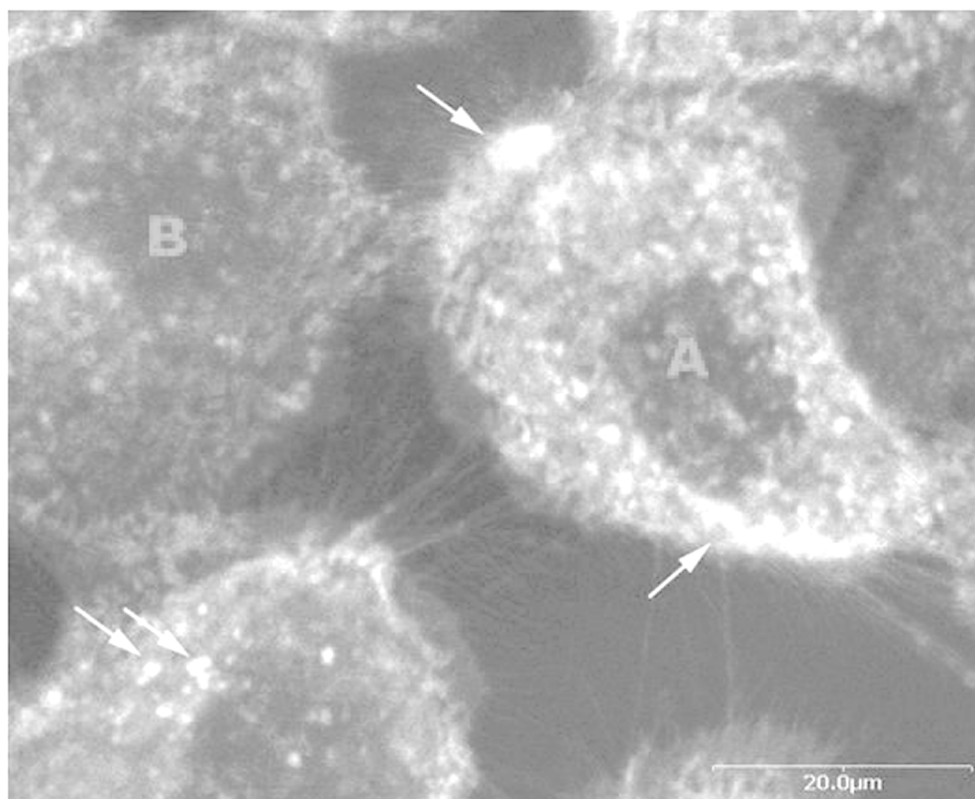
Na podstawie eksperymentów techniką Langmuira-Blodgetta przewidziano, iż rafty lipidowe powinny być obecne w błonach komórkowych w warunkach fizjologicznych. Jednakże wizualizacja raftów napotyka poważne problemy metodologiczne. Najprostszą metodą jest wizualizacja ogniskowych zagęszczeń cholesterolu i glikolipidów w błonach komórkowych przy pomocy swoistych barwników fluorescencyjnych, takich jak np. filipina III czy podjednostka B toksyny cholery – CTXB (ang. *cholera toxin B-subunit*). Polienowy antybiotyk, filipina III, wiąże się swoiście z cholesterolem wykazując absorpcję w ultrafiolecie i emisję fluorescencji w zakresie światła niebieskiego. CTXB

B**C**

RYCINA 1. Główne lipidy obecne w błonach komórkowych i ich udział w powstawaniu raftów lipidowych: **B:** Rafty lipidowe to obszary, gdzie dochodzi do agregacji tłuszczów posiadających reszty nasyconych kwasów tłuszczowych (gangliozydy i sfingolipidy). Cholesterol spełnia funkcję „wypełniacza” obszarów pomiędzy nienasyconymi łańcuchami kwasów tłuszczowych, dodatkowo zwiększając upakowanie reszt hydrofobowych cząsteczek tłuszczu, a co za tym idzie, stabilizację raftów.

C: Interakcje białek z raftami lipidowymi – Hydrofobowe odcinki białek transmembranowych (np. receptor EGF) oddziałują bezpośrednio z hydrofobowymi resztami glicerofosfolipidów, sfingolipidów i cholesterolu. Białka niebędące białkami transmembranowymi ulegają kowalencyjnym modyfikacjom pozwalającym na stabilne łączenie się z raftami. Do najważniejszych modyfikacji zaliczamy grupy glikozylofosfatydyloinozytolowe (GPI) oraz dołączenie reszt kwasów tłuszczowych: mirystylacja (łańcuch nasycony 14-węglowy) i palmitylacja (łańcuch nasycony 16-węglowy). Białka połączone za pomocą GPI znajdują się głównie w listku zewnętrznym błony, natomiast białka acylowane – po stronie wewnętrznej (cytoplazmatycznej). Pojedyncza mirystylacja jest z reguły niewystarczająca dla stabilnego osadzenia białka w błonie. Trwałą interakcję białka z błoną osiąga się wskutek podwójnej acylacji (mirystylacja + palmitylacja) lub wskutek interakcji dodatnio naładowanej domeny białka z negatywnie naładowanymi cząsteczkami fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy

wiąże się swoiście z gangliozydem GM1, obecnym w raftach lipidowych. Barwienie komórek przyżyciowo filipiną III i koniugatem CTXB z fluorochromami (np. z fluoresceiną, CTX-FITC) wykazuje w niektórych komórkach plamiste barwienie błon. Obszary o zwiększonej fluorescencji odpowiadają przypuszczalnie raftom lipidowym (ryc. 2). Obszary barwliwe przy pomocy filipiny lub CTXB są stosunkowo duże (mikrometry), co jest wartością o kilka rzędów większą niż średnica raftów w błonach Langmuira-Blodgetta. Świadczy to o tym, że w warunkach fizjologicznych rafty nie



RYCINA 2: Rafty lipidowe w keratynocytach ludzkich w hodowli. Komórki barwiono przyżyciowo koniugatem podjednostki B toksyny cholery z fluorosceiną (zielona fluorescencja) i obserwowano w konfokalnym mikroskopie fluorescencyjnym. Strzałki wskazują na konglomeraty raftów lipidowych. Zawartość raftów lipidowych w komórkach zależy od stopnia zróżnicowania; w komórce A) zawartość raftów jest wysoka, natomiast błona komórki B) barwi się słabo

występują pojedynczo, ale w konglomeratach. Dlatego też zaproponowany został termin określający je jako „flotylle” raftów [47].

Technika barwienia w mikroskopii fluorescencyjnej może być jednak krytykowana z kilku względów. Po pierwsze, barwniki fluorescencyjne mogą poprzez wiązanie się z raftami wpływać na ich strukturę. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do filipiny III, która wiążąc się z cholesterolem powoduje jego sekwestrację z błony, co przy długotrwałej inkubacji ma wpływ destrukcyjny na funkcje raftów. Po drugie, w niektórych komórkach, takich jak limfocyty, barwienie CTXB uwiadcza strukturę domenową tylko po wiązaniu krzyżowym z przeciwciałem. Można więc przypuszczać, iż naturalnie występujące rafty mają wielkość mniejszą niż rozdzielczość mikroskopu fluorescencyjnego i dopiero agregaty raftów mogą być uwidocznione. Mimo to dzięki swej łatwości barwienie filipiną i CTXB to w dalszym ciągu najbardziej rozpowszechnione metody wizualizacji raftów w komórkach. Dzięki nim możliwe jest uwidocznienie domen lipidowych w takich komórkach, jak: limfocyty, makrofagi, komórki tłuszczne, neurony, keratynocyty i w wielu typach komórek nowotworowych.

Do bardziej wyrafinowanych, lecz mniej rozpowszechnionych technik obrazowania raftów należy metoda mikroskopii wykorzystującej skanowanie sondą (*scanning probe microscopy*) [75], fluorescencyjna mikroskopia polaryzacyjna [68], mikroskopia krioelektronowa [21] oraz mikroskopia fluorescencyjna komórek transfekowanych konstrukcjami kodującymi specyficzne białka wiążące się z raftami połączonymi z GFP lub YFP (ang. *green fluorescent protein, yellow fluorescent protein*).

Wielkość raftów i ich ruchomość w błonie została oceniana technikami czynnościowymi FRAP (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*) czy FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*). Metoda FRAP polega na przyżyciowym barwieniu komórek fluorochromem (np. CTXB-FITC lub transfekcją plazmidem kodującym pewne białko błonowe połączonym z GFP), a następnie dezaktywacji fluorescencji (ang. *bleaching*) w małym regionie komórki. Czas potrzebny do odzyskania fluorescencji (ang. *fluorescence recovery*) jest proporcjonalny do stopnia ruchomości pozostałych cząsteczek fluorochromu w błonie. Metoda FRET pozwala na pomiar odległości i ruchomości cząsteczek. Wynika to ze zdolności znajdujących się bardzo blisko siebie cząsteczek dwu różnych fluoro-chromów do rezonansowego przekazywania energii. Zastosowanie obu metod doprowadziło jednak do sprzecznych wniosków odnośnie struktury raftów lipidowych. Wykazano, że w niektórych komórkach domeny lipidowe są bardzo niestabilne i bardzo małej wielkości (rzędu 20–100 nm) [68, 51], natomiast w innych obecne są większe i bardziej stabilne struktury lipidowe [57]. Nasuwa to wniosek, że wielkość i ruchomość raftów lipidowych jest różna w różnych typach komórek.

Interesujące są także dane pokazujące rozmieszczenie raftów w różnych typach komórek. W spolaryzowanych komórkach nabłonkowych i neuronach rafty skoncentrowane są w apikalnej i aksonalnej błonie plazmatycznej. W izolowanych limfocytach i fibroblastach rafty rozmieszczone są bez wyraźnej polaryzacji [20].

Fibroblasty pobudzone do migracji wykazują wyraźną koncentrację raftów na wypustkach [20]. Keratynocyty w hodowli wykazują koncentrację raftów na obrzeżach komórki, co zaakcentowane jest w starszych jednowarstwowych hodowlach [18]. Przykładem tkanki charakteryzującej się nierównomiernym rozmieszczeniem raftów w komórkach jest naskórek. Rafty spotykane są jedynie w keratynocytach w warstwie podstawnej i to głównie w komórkach o zwiększonej aktywności mitotycznej (tzw. *transit amplifying cells*) [1]. Tak, więc rozmieszczenie raftów w komórkach jest zależne od typu komórki oraz od jej stanu czynnościowego.

IZOLACJA RAFTÓW I ICH SKŁAD BIOCHEMICZNY

Jak wspomniano powyżej, struktura molekularna raftów charakteryzuje się zwiększonym stopniem uporządkowania cząsteczek lipidowych wynikającym bezpośrednio z bocznego ruchu cząsteczek [5]. Bardziej ściśle upakowanie lipidów w raftach prowadzi do zwiększonej oporności raftów na detergenty. Ta właśnie właściwość jest powszechnie wykorzystywana do izolacji raftów. Komórki (lub tkanki) poddaje się działaniu detergentu w takich warunkach, aby rozpuszczona została błona komórkowa bez naruszenia struktury raftów. Najczęściej używany jest 1% Triton X-100 w

temperaturze 4°C lub Brij 98 w temperaturze 37°C. Następnie rafty izolowane są na gradiencie sacharozy lub Opti-Prep poprzez długotrwałe ultrawierowanie (flotację) [45]. Tak oczyszczone rafty nazywa się frakcją DRMs (ang. *detergent resistant membranes*).

DRMs wzbogacone są w cholesterol i sfingolipidy, kosztem glicerofosfolipidów. Na przykład w komórkach nerki (MDCK) DRMs zawierają 32 mol% cholesterolu i 14 mol% sfingomielin. Dla porównania, niefrakcjonowana błona komórkowa zawiera ok. 12 mol% cholesterolu i 1% sfingomielin [6]. Ocena raftów lipidowych z komórek ludzkiej linii nowotworowej KB (wywodzącej się z komórek nabłonka wyściełającego jamę ustną) wykazała dwukrotnie większą ilość cholesterolu i około 30% więcej sfingomielin niż we frakcji błony plazmatycznej [49].

Inną metodą preparatyki raftów jest poddawanie lizie całych komórek buforem węglanu sodowego o pH 11. Podwyższone pH wspomaga usuwanie białek błony plazmatycznej. Następnie stosuje się sonikację lizatu oraz wirowanie na gradiencie cukrowym [63]. Metoda jest stosunkowo prosta. Jednak flotacja w 35% cukrozie jest dosyć agresywna dla fragmentów błon o niskiej gęstości. Problem może również stanowić obecność wszystkich błon wewnątrzkomórkowych, co może dawać zawyżoną ilość raftów w otrzymanej frakcji. Bardziej selektywna metoda oczyszczania raftów lipidowych polega na lizowaniu komórek w izotonicznym roztworze cukrozy i oczyszczaniu wyizolowanego supernatantu przez sedymentację w gradiencie Percollu [62]. Takie traktowanie zapewnia oddzielenie błon plazmatycznych od błon aparatu Golgiego, siateczki endoplazmatycznej i mitochondriów. Możliwe jest też modyfikowanie otrzymanej frakcji za pomocą zamiany pH i jonowego składu Percollu w celu otrzymania optymalnej separacji [45]. Sonikacja uwalnia rafty lipidowe z błon plazmatycznych, które są następnie rozdzielane na gradiencie Opti-Prep w roztworze izotonicznym. Metoda ta pozwala na izolację raftów wysokiej czystości, które prawdopodobnie najwierniej oddają skład tych mikrodomen rezydujących w komórce.

Tak, więc metody biochemiczne potwierdziły przypuszczenie, iż rafty wzbogacone są w cholesterol i sfingolipidy. Jednakże najbardziej interesujące dane z badań biochemicznych dotyczą identyfikacji białek wiążących się z raftami. Białka te stanowią klucz do zrozumienia funkcji raftów w homeostazie komórek.

SKŁAD BIAŁKOWY RAFTÓW LIPIDOWYCH

Białka izolowane we frakcji raftów lipidowych można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa to białka strukturalne zwiększające stabilność raftów, natomiast do drugiej grupy należą białka spełniające funkcje sygnalizacyjne i receptorowe w komórkach. Do białek strukturalnych zalicza się głównie kaweoliny i flotyliny. Kaweolina jest zdolna do wiązania cholesterolu, przez co zwiększa uporządkowanie lipidów w raftach. Pełni także istotną rolę w procesach pinocytozy poprzez kaweole (patrz poniżej).

Niezwykle istotny jest fakt, że część receptorów błonowych ma zdolność do dynamicznego wiązania się z raftami lipidowymi. Spośród znanych receptorów mających powinowactwo do raftów należy wymienić EGFR (*epidermal growth factor receptor*),

PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), Fas, TCR (*T-cell receptor*), Fc ϵ RI (receptor typu I dla fragmentu Fc immunoglobuliny ϵ). Wiązanie się z raftami jest dla tych receptorów etapem umożliwiającym regulację aktywności receptora. Ponadto, wiele enzymów błonowych związanych z sygnalizacją komórkową wiąże się z raftami, np. kinaza białkowa src, niektóre izoformy kinazy białkowej C (PKC), syntaza tlenku azotu (NOS), czy podjednostka p85 kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K). Białka transmembranowe, takie jak EGFR, wiążą się z raftami poprzez powinowactwo ich hydrofobowej części transmembranowej do lipidowych struktur raftów (ryc. 1C) [70]. Białka nieposiadające części transbłonowej (np. src) łączą się kowalencyjnie z raftami poprzez grupy GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) lub grupy acetylowe (ryc. 1C). Przedstawione dane świadczą o zróżnicowaniu mechanizmów, które są zaangażowane w łączenie białek z raftami lipidowymi.

UDZIAŁ RAFTÓW LIPIDOWYCH W PROCESACH TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Wiele receptorów błonowych tworzy wielocząsteczkowe agregaty błonowe w trakcie procesu aktywacji. Składają się one z licznych cząsteczek receptora oraz niereceptorowych kinaz białkowych, co pozwala na zapoczątkowanie kaskady sygnalizacji.

Rafty mogą być uważane za miejsca ułatwiające agregację indywidualnych receptorów aktywowanych przez liganda. Jeśli aktywacja receptorów ma miejsce w raftach, to kompleks sygnalizacyjny jest zabezpieczony przed enzymami nieposiadającymi powinowactwa do raftów. Przykładem mogą być niektóre fosfatazy błonowe, które zaangażowane są w hamowanie niektórych procesów sygnalizacyjnych. Rafty tworzą przypuszczalnie mikrośrodowisko, gdzie aktywność kinaz i fosfataz regulowana jest niezależnie od innych części błon komórkowych.

Szczególnie dobrze poznany jest udział raftów w aktywacji receptora Fc ϵ RI [2, 13, 23, 59]. Fc ϵ RI jest tetramerem składającym się z jednego łańcucha α , jednego β i dwu γ . Łańcuch α wiąże fragment Fc cząsteczki IgE. Oligomeryzacja receptorów przez IgE rekrutuje acylowaną kinazę Lyn do raftów zawierających Fc ϵ RI, a następnie przyłączenie kinazy Syk/ZAP-70 do łańcuchów β i γ [13, 59]. Ponieważ zarówno receptor Fc ϵ RI oraz kinaza Lyn są izolowane we frakcji DRMs, co wskazuje na zaangażowanie raftów lipidowych w sygnalizację z tego receptora. Prawdopodobnie rafty stanowią platformę, na której możliwa jest oligomeryzacja Fc ϵ RI oraz jego interakcja z Lyn. Dodatkowym dowodem są dane wskazujące, że zniszczenie struktury raftów za pomocą metyl- β -cyklodekstryny (M β CD) powoduje blokadę aktywacji receptora Fc ϵ RI przez IgE [71].

Użycie związków powodujących sekwestrację cholesterolu i niszczących strukturę raftów, takich jak filipina III czy M β CD, pozwoliło na identyfikację innych receptorów związanych z mikrodomenami lipidowymi. M β CD jest polisacharydem o budowie cyklicznej zdolnym do selektywnego wiązania cholesterolu i usuwania go z zewnętrznego

listka błon komórkowych. Traktowanie komórek M β CD hamuje aktywację nie tylko Fc ϵ RI, ale także innych istotnych receptorów, takich jak TCR czy receptora typu 1 dla czynnika nekrozy nowotworów (TNFR1) [70, 32].

Jednakże w stosunku do niektórych receptorów, takich jak receptor dla czynnika wzrostu naskórka – EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) czy receptora Fas odpowiedzialnego za programowaną śmierć komórki (apoptozę) zaobserwowano odwrotne zjawisko, tzn. paradoksalną aktywację receptora wskutek jego dysocjacji z raftami [48]. Interesujące, iż traktowanie komórek przez M β CD powoduje aktywację EGFR i Fas niezależnie od obecności liganda. Tak, więc receptor aktywowany jest jedynie poprzez zmianę powinowactwa do raftów. Mechanizm tego zjawiska jest bardzo złożony i nie do końca zrozumiany. Wydaje się, iż mechanizm przekazywania sygnału z EGFR jest inny w przypadku aktywacji przez M β CD niż za pośrednictwem EGF. Podczas gdy swoisty ligand powoduje końcową aktywację kinaz z grupy MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*), aktywacja poprzez uszkodzenie raftów prowadzi głównie do aktywacji SAPK (ang. *stress activated protein kinase*) [25]. Poza tym dojadrowy transport EGFR, uważany za istotny komponent w procesie przekazywania sygnału, jest zniesiony w komórkach traktowanych M β CD (własne, niepublikowane dane). Podobną dewiację w sygnalizacji pod wpływem M β CD zaobserwowano w stosunku do receptora TNFR1. W kontrolnych limfocytach aktywacja TNFR1 prowadzi do powstania kompleksu tego receptora z TRAF2, aktywacji NF κ B i zwiększenia tempa proliferacji. Natomiast w komórkach traktowanych M β CD dochodzi do inhibicji tworzenia kompleksu TNF-TRAF2, zahamowania syntezy aktywnego NF κ B i w rezultacie do śmierci komórki pod wpływem TNF [29].

Wpływ raftów na proces sygnalizacji dodatkowo komplikuje fakt, iż drogi przekazywania sygnału przez receptory zależne są od typu komórki. Na przykład traktowanie limfocytów przez M β CD powoduje aktywację receptora Fas w keratynocytach, podczas gdy w limfocytach obserwuje się wyraźną blokadę tego receptora [19, 16]. Nie ulega wątpliwości, że rafty regulują w znacznej mierze transdukcję sygnału, jednakże ich wpływ zależy od typu receptora oraz od typu komórki.

UDZIAŁ RAFTÓW W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH W KOMÓRCIE

Kaweole i endocytoza. Kaweole są strukturami komórkowymi powstałymi na wskutek inwaginacji błony plazmatycznej na odcinku 50–70 nm. Kaweole zostały po raz pierwszy opisane 50 lat temu w śródbłonkach przez Palade’a [39]. Są one obecne w większości komórek z wyjątkiem limfocytów i neuronów [42]. Kaweole spotykane są najczęściej w postaci pęcherzyków. W niektórych komórkach jednakże kaweole organizują się w bardziej skomplikowane struktury, na przykład w kanaliki T w mięśniach szkieletowych.

Uważa się, że kaweole stanowią szczególną postać raftów lipidowych. Kaweole są nierozpuszczalne w detergentach wskutek zwiększonej zawartości cholesterolu i gliko-

lipidów i można je izolować poprzez flotację na gradientach sacharozy. Najbardziej charakterystyczną cechą kaweoli jest obecność strukturalnego białka, kaweoliny. Kaweolina występuje w 3 izoformach. Kaweolina 1 i 2 obecna jest w wielu typach komórek, podczas gdy kaweolina 3 jest swoista dla komórek mięśniowych [43]. Badania na myszach transgenicznym pozbawionych genów dla kaweolin wykazały, iż kaweolina 1 jest niezbędna do tworzenia kaweoli, natomiast kaweolina 2 ma jedynie rolę wspomagającą [28, 64, 53, 54].

Kaweoliny mają zdolność wiązania cholesterolu w błonach komórkowych, co powoduje ogniskowy wzrost stężenia cholesterolu i tworzenie kaweoli. Przypuszczalnie kaweoliny są również zaangażowane w transport cholesterolu do- i na zewnątrz komórki [61, 14]. Ponadto, podobnie jak inne rafty lipidowe, kaweole zaangażowane są w procesach sygnalizacji oraz w regulacji sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia.

Kaweole mają również udział w procesach endocytozy, głównie substancji występujących w raftach, takich jak: glikofosfolipidy, białka połączone za pomocą GPI oraz ligandy, takie jak: kwas foliowy, albumina czy hormon wzrostu. Endocytoza poprzez kaweole jest zależna od polimeryzacji aktyny i aktywności dynaminy-2, natomiast niezależna od klatryny, czym różni się od innych typów endocytozy [44, 46, 35].

W przeciwieństwie do endocytozy za pośrednictwem pęcherzyków pinocytarnych czy pęcherzyków opłaszczonych klatryną, które prowadzą do tworzenia endosomów, endocytoza za pośrednictwem kaweoli prowadzi do powstania swoistych struktur: kaweosomów, charakteryzujących się obecnością kaweolin [34]. Sytuację komplikuje jednak niedawne odkrycie endocytozy kaweolarniej, która podobnie jak pinocytoza jest niezależna od dynaminy i klatryny [56, 33]. Droga ta jest prawdopodobnie swoista dla endocytozy białek błonowych zawierających łącznik GPI. Wydaje się jednak, że tylko niewielki odsetek kaweoli zaangażowany jest w aktywną endocytozę [66].

Migracja i adhezja komórek. Integryny są jednymi z najważniejszych białek odpowiedzialnymi za adhezję komórek. Integryny są białkami transbłonowymi, które aktywowane są poprzez łączenie się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, laminina, fibronektyna). Stymulacja integryn doprowadza do aktywacji szlaku sygnalizacyjnego, na który składają się rekrutacja białka FAK (ang. *focal adhesion kinase*), PAK (ang. *p21-activated kinase*), mDia (ang. *molecule Diaphanous*) i GTPaz Rho, Rac i Cdc42. Obecność raftów lipidowych jest konieczna do aktywacji sygnalizacji poprzez integryny. Uszkodzenie raftów poprzez sekwestrację cholesterolu blokuje przemieszczanie się białka Rac do błony komórkowej i uniemożliwia aktywację białka PAK. Okazuje się bowiem, iż tworzenie się aktywnego kompleksu enzymatycznego zawierającego białka Rac, Rho, PAK i mDia ma miejsce wyłącznie w raftach lipidowych [22, 8, 41]. Proces ten zależny jest od białka FAK [41].

Aktywacja integryn ma również znaczenie w procesach migracji komórek. Stabilizacja mikrotubul wymagana podczas migracji zależna jest od aktywacji Rho i mDia, a co za tym idzie, od obecności nienaruszonych raftów lipidowych [40]. Badania nad migrującymi fibroblastami uwiaryściły flotylle raftów w zrębie prowadzącym błonę plazmatyczną, zawierających gangliozyd GM1, Rho i mDia. Interesującym zjawiskiem jest polaryzacja raftów w migrujących limfocytach. Skład lipidowy (w szczególności gangliozydów) jest inny w raftach obecnych w zrębie od raftów w tylnej części komórki [20].

Polimeryzacja aktyny jest procesem, od którego zależy prawidłowa migracja komórek. Istnieje ścisła zależność pomiędzy raftami lipidowymi a cytoszkieletem aktynowym. Reorganizacja raftów lub ich uszkodzenie, np. za pomocą M β CD powoduje uwolnienie 4,5-fosfatydyloinozytolu(4,5)bisfosforanu (PIP₂) z błony komórkowej do cytoplazmy [50]. PIP₂ jest włączony w regulację polimeryzacji aktyny poprzez wpływ na białka gelsolinę i profilinę, α -aktyninę i winkulinę. W efekcie dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w komórce [27]. Na podstawie powyższych danych można wysnuć wniosek, że rafty lipidowe odgrywają rolę w regulacji cytoszkieletu, a co za tym idzie polaryzacji i migracji komórek.

Proliferacja i śmierć komórki. Opisany powyżej związek pomiędzy receptorami apoptotycznymi z rodziny TNF (Fas, TNFR1) a raftami lipidowymi sugeruje udział raftów w regulacji apoptozy. Badania przy użyciu limfocytów i makrofagów sugerują, iż receptor Fas jest aktywny jedynie w powiązaniu z raftami. Uszkodzenie struktury raftów przy pomocy M β CD powoduje deaktywację Fas i zahamowanie apoptozy zależnej od tego receptora. Jednakże, w przeciwieństwie do limfocytów, M β CD stymuluje apoptozę. Zniszczenie raftów lipidowych w linii stransformowanych keratynocytów HaCaT przez M β CD, filipinę III lub poprzez oksydację cholesterolu prowadzi do szybkiej apoptozy [3]. Inkubacja tych komórek w roztworze M β CD prowadzi również do aktywacji receptora Fas niezależnie od liganda oraz aktywacji kaspaz 8 i 3 [19]. Jednakże, blokada aktywnych kaspaz nie hamuje śmierci komórki, wydaje się więc, że receptor Fas nie jest niezbędny do apoptozy wywołanej uszkodzeniem raftów (własne, niepublikowane dane). Podobnie do wyników otrzymanych przez nas na linii HaCaT, inni autorzy opisali śmierć komórek białaczki szpikowej i czerniaka złośliwego wskutek inkubacji ze statynami i M β CD [11, 38]. Wydaje się więc, że w niektórych typach komórek zaburzenia w strukturze raftów są sygnałem inicjującym proces apoptozy.

Aktywność wielu receptorów dla czynników wzrostu regulowana jest przez rafty lipidowe. Pozwala to na wysunięcie hipotezy, iż rafty odgrywają rolę w regulacji cyklu komórkowego. Zaburzenie struktury raftów w keratynocytach za pomocą M β CD powoduje zablokowanie syntezy DNA i różnicowanie komórki [18, 25]. W naskórku ludzkim agregaty raftów są obecne w aktywnie proliferujących keratynocytach warstwy podstawnej, tzw. komórkach amplifikujących (ang. *transit amplifying cells*) [18]. Niedawno opisano jeden z możliwych mechanizmów, wskutek którego proliferacja keratynocytów jest regulowana przez rafty [15]. Czynniki wzrostu naskórka (EGF) jest ważną cytokiną stymulującą wzrost i migrację komórek. Pobudza on mitogenezę poprzez aktywację kinazy Src za pośrednictwem EGFR, co następnie prowadzi do fosforylacji integryny β 4 oraz aktywacji białka Ras i kinazy fosfo-3-inozytolu (PI-3K). Okazało się, iż jedynie palmitylowane łańcuchy integryny β 4 wchodzi w reakcję z Src i są w stanie aktywować Ras. Mutacja cystein w części transbłonowej integryny β 4 prowadzi do zahamowania palmitylizacji, a co za tym idzie braku asocjacji z raftami. W komórkach takich EGF nie jest w stanie stymulować mitogenezy [15].

ZMIANY W SKŁADZIE RAFTÓW LIPIDOWYCH PROWADZĄCE DO PROCESÓW PATOLOGICZNYCH

Zakażenia wirusowe. Niektóre wirusy, takie jak wirus grypy czy HIV, wykorzystują rafty w infekcji komórek gospodarza [76]. Udział raftów w infekcji wirusowej został szczególnie dobrze poznany dla wirusa HIV. Wirus ten łączy się z galaktosylceramidami zlokalizowanymi w apikalnej części komórek nabłonkowych błony śluzowej. Zniszczenie struktury raftów, np. poprzez traktowanie przez M β CD blokuje wirusową transcytozę [1].

W czasie wnikania do komórek docelowych dochodzi do wiązania się komponentów otoczki wirusowej (np. białko Gag) z raftami. Ponadto w raftach znajdują się receptory białkowe dla HIV: białko CD4 i receptory dla chemokin CCR5 i CXCR4. Łączenie białek wirusa HIV z CD4 i receptorami chemokinowymi prowadzi do łączenia się raftów w większe konglomeraty (flotyle) [37, 24]. Ponadto, wczesne białko wirusowe Nef może łączyć się ze związaną z raftami niereceptorową kinazą tyrozynową z rodziny Src, co wydaje się wzmacniać efektywność infekcji limfocytów T przez wirus HIV.

Opuszczanie przez HIV komórki jest również etapem zależnym od raftów [37]. Mirystylowane białko wirusowe Gag podlega multimeryzacji w cytozolowej warstwie błony, pobudzając pączkowanie komórek i uwalnianie wirusa. Przypuszcza się, że białko Gag specyficznie przyłącza się do raftów powodując ich agregację, zwiększenie aktywności cholesterolu i w rezultacie tworzenie pęcherzyka egzocytotycznego zawierającego cząstki wirusa [7].

Choroba Alzheimera. Głównym etapem w patogenezie choroby Alzheimera jest zaburzona proteoliza prekursorowego transmembranowego białka amyloidu APP typu I, przez enzymy nazywane α -, β - i γ -sekreazami [57] do nierozpuszczalnego A β . Cholesterol odgrywa kluczową rolę w regulacji proteolizy APP [60]. Poziom cholesterolu i LDL w surowicy koreluje z ilością A β w mózgu chorych na chorobę Alzheimera. Ponadto zwiększony poziom cholesterolu w diecie powoduje wzrost formowania nierozpuszczalnego amyloidu w mózgach transgenicznych zwierząt doświadczalnych. Statyny, leki blokujące syntezę cholesterolu poprzez hamowanie enzymu reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutaryl-CoA (HMG-CoA), zmniejszają akumulację A β w neuronach [60].

W komórkach część APP jest związana z raftami lipidowymi, a usunięcie cholesterolu może powodować przemieszczenie się APP z raftów do otaczającej błony komórkowej. Jest wysoce prawdopodobne, iż proteoliza APP znajdującego się poza raftami zachodzi w drodze tzw. rozpadu α , gdzie nie wytwarzany jest patogenny A β .

Choroby prionowe. Choroby prionowe powodowane są przez PrP^{Sc}, stanowiące nieprawidłową strukturalną formę zakodowanego przez gospodarza białka PrP^C. PrP^{Sc} tworzy w mózgu agregaty białkowe odpowiedzialne za patogenezę chorób prionowych (choroba Creutzfeldta-Jakoba, choroba kuru, zespół Gertsmana-Strausslera-Scheinkera). Mechanizm, w którym PrP^C jest przekształcany w PrP^{Sc}, nie został dokładnie poznany. Badania dowodzą, że biorą w nim udział rafty lipidowe [65, 4]. Wiadomo, że PrP^C jest połączony z raftami poprzez sfingolipidową domenę [30]. Usunięcie cholesterolu z błony komórkowej prowadzi do zmniejszonego powstawania PrP^{Sc} z PrP^C. [26]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób rafty promują nieprawidłowy metabolizm PrP^C.

Choroby nowotworowe. Jak opisano powyżej, rafty lipidowe mają duże znaczenie w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy poprzez ich wpływ na aktywację receptorów błonowych, takich jak: EGFR, TNFR1 czy Fas. Sugeruje to udział raftów w procesach onkogenezy. Hipoteza ta znajduje poparcie doświadczalne. Po pierwsze, ryzyko zachorowania na niektóre rodzaje nowotworów jest zwiększone u ludzi z podwyższonym poziomem cholesterolu. Statyny, leki obniżające stężenie cholesterolu we krwi i w komórkach, wydają się wykazywać pewną aktywność antynowotworową [9]. Wiele onkogenów, jak np. białka z rodziny Hedgehog oraz niereceptorowe kinazy białkowe (Src, Lyn) aktywne są jedynie w powiązaniu z raftami lipidowymi. Ponadto, istnieją dane sugerujące, iż destrukcja raftów poprzez usunięcie cholesterolu przez MbCD zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki wskutek obniżenia progu indukcji apoptozy [17].

Edelfozyna, syntetyczna pochodna alkilofosflipidów łączy się selektywnie z raftami prowadząc do śmierci komórki [25]. Interesującym aspektem wskazującym na udział raftów w rozwoju nowotworów jest rola kaweolin w procesach onkogenezy. W zależności od typu nowotworu kaweolina wykazuje właściwości supresyjne lub promujące podczas onkogenezy.

Kaweolina jest jednym z dwudziestu białek mających właściwości supresorowe nowotworu sutka [73]. Redukcję poziomu kaweoliny-1 na poziomie transkrypcji obserwowano w liniach komórek nowotworowych pochodzących z płuc, z szyi i tkanki piersiowej [52]. Na przykładzie fibroblastów transformowanych niektórymi onkogenami wykazano odwrotną zależność między wielkością kolonii komórek nowotworowych rosnących na agarze a komórkowym poziomem kaweoliny [69]. Badania na materiale archiwalnym z biopsji dowiodły, że istnieje związek pomiędzy ekspresją kaweoliny-1 i przerzutami nowotworowymi, szczególnie w rozwoju nowotworów prostaty [74]. W przypadku tego nowotworu zaobserwowano brak kaweoliny-1 w nabłonku gruczołu normalnej prostaty oraz jej zwiększoną ekspresję w słabo zróżnicowanych komórkach nowotworu prostaty. Inne badania udowodniły, że kaweolina-1 jest jednym z biomarkerów raka prostaty u rasy czarnej [72]. Na poziomie molekularnym obniżenie poziomu kaweoliny-1 w niewrażliwych na androgeny komórkach raka prostaty łączy się z powtarzaniem bardziej łagodnego fenotypu. Nadekspresja kaweoliny-1 w linii komórkowej raka prostaty powoduje ich niewrażliwość na apoptozę powodowaną brakiem androgenów [67].

Mechanizm prowadzący do zmian w ekspresji kaweolin w nowotworach nie jest do końca poznany. Pewną rolę spełniają mechanizmy epigenetyczne wskutek hipermetylacji wysp CpG w regionach promotorowych genu kaweoliny. Hipermetylacja wysp CpG jest dobrze znanym mechanizmem supresji ekspresji genów w komórkach nowotworowych.

Cukrzyca. Insulinozależny transport glukozy ma miejsce głównie w mięśniach, a w mniejszym stopniu w tkance tłuszczowej i zależy od transportera glukozy GLUT4. Transporter glukozy jest zlokalizowany głównie w małych pęcherzykach i strukturach tubularno-pęcherzykowatych w cytoplazmie komórki, ale jest translokowany do błony plazmatycznej w odpowiedzi na pobudzenie receptora insulinowego. Wykazano, że

GLUT4 w komórkach tłuszczowych zlokalizowany jest w kaweolach. Stymulacja insulinowa nie tylko powoduje transport pęcherzyków zawierających GLUT4 do błony plazmatycznej, ale również mobilizację kaweoliny z puli cytozolowej do błony plazmatycznej. Na świeżo izolowanych komórkach tłuszczowych stwierdzono, że przemieszczanie się GLUT4 do domen kaweolinowych jest konieczne dla transportu glukozy. Ponadto, u pacjentów z insulinoodporną cukrzycą typu II wykryto mutacje genu dla kaweoliny 1 [53]. Pochodne sulfonilomocznika stosowane w terapii cukrzycy typu II stymulują insulino-zależny wzrost glukozy w komórkach mięśni i komórkach tłuszczowych [31] prawdopodobnie poprzez stabilizację raftów oraz zwiększenie stężenia kaweoliny w błonach komórkowych.

Miażdżyca. Hipercholesterolemia jest głównym czynnikiem powodującym rozwój miażdżycy. Przewlekłe podwyższenie poziomu cholesterolu hamuje rozszerzanie się naczyń zależne od tlenku azotu (NO) między innymi wskutek niskiej aktywności jego syntazy NOS. Kaweolina-1 wydaje się hamować aktywność śródbłonkowego NOS (eNOS) w stanach zwiększonego poziomu cholesterolu. Ekspozycja śródbłonka aorty na surowicę uzyskaną od osobników z hipercholesterolemią prowadziło do wzrostu kaweoliny-1 w tych komórkach oraz do redukcji uwalniania NO wskutek obniżenia aktywności eNOS [12]. Statyny destabilizują kompleks kaweolina - eNOS na skutek obniżenia stężenia cholesterolu w błonie komórkowej. Podobnie blokada ekspresji kaweoliny-1 powoduje wzrost aktywności eNOS i produkcji NO [12].

Reakcje zapalne. Rola raftów w procesach immunologicznych była już wzmiankowana na przykładzie aktywacji receptora FcεRI oraz TCR. Wiele enzymów i receptorów dla cytokin włączonych w reakcje zapalne jest aktywowana poprzez interakcje z raftami. TNF jest jedną z najważniejszych cytokin odpowiedzialnych za indukcję procesu zapalnego w wielu chorobach (m.in. cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohna). Aktywność receptora TNFR1 w limfocytach i makrofagach jest zależna od jego wiązania się z raftami (patrz powyżej).

Jak opisano powyżej, aktywność syntazy NO jest również zależna od raftów lipidowych, ponieważ zwiększone stężenia NO są odpowiedzialne za uszkodzenie śródbłonnków w reakcjach zapalnych. Blokada NOS poprzez modulację raftów może stanowić nowe podejście w terapii stanów zapalnych.

PODZIĘKOWANIA

Pani Krystynie Mogilnickiej autorzy składają podziękowania za pomoc w starannym przygotowaniu manuskryptu.

LITERATURA

- [1] ALFSEN A, INIGUEZ P, BOUGUYON E, BOMSEL M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 2001; **166**: 6257–6265.
- [2] BAIRD B, SHEETS ED, HOLOWKA D. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys Chem* 1999; **82**: 109–119.
- [3] BANG B, GNIADOCKI R, GAJKOWSKA B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. In press.

- [4] BARON GS, WEHRLY K, DORWARD DW, CHESEBRO B, CAUGHEY B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J* 2002; **21**: 1031–1040.
- [5] BONDAROWICZ-PIKUŁA J. Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne. *Post Biochem* 1995; **41**(4): 247–257.
- [6] BROWN DA, ROSE JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; **68**: 533–544.
- [7] CAMPBELL SM, CROWE SM, MAK J. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* 2001; **22**: 217–227.
- [8] del POZO MA, ALDERSON NB, KIOSSES WB, CHIANG HH, ANDERSON RG, SCHWARTZ MA. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 2004; **303**: 839–842.
- [9] DELLAVALLE RP, NICHOLAS MK, SCHILLING LM. Melanoma chemoprevention: a role for statins or fibrates? *Am J Ther* 2003; **10**: 203–210.
- [10] DIETRICH C, BAGATOLLI LA, VOLOVYK ZN, THOMPSON NL, LEVI M, JACOBSON K, GRATTON E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 2001; **80**: 1417–1428.
- [11] DIMITROULAKOS J, NOHYNEK D, BACKWAY KL, HEDLEY DW, YEGER H, FREEDMAN MH, MINDEN MD, PENN LZ. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. *Blood* 1999; **93**: 1308–1318.
- [12] FERON O, DESSY C, MONIOTTE S, DESAGER JP, BALLIGAND JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; **103**: 897–905.
- [13] FIELD KA, HOLOWKA D, BAIRD B. Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9201–9205.
- [14] FIELDING CJ, BIST A, FIELDING PE. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* 1999; **38**: 2506–2513.
- [15] GAGNOUX-PALACIOS L, DANS M, VAN'T HOF W, MARIOTTI A, PEPE A, MENEGUZZI G, RESH MD, GIANCOTTI FG. Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. *J Cell Biol* 2003; **162**: 1189–1196.
- [16] GAJATE C, DEL CANTO-JANEZ E, ACUNA AU, AMAT-GUERRI F, GEIJO E, SANTOS-BENEIT AM, VELDMAN RJ, MOLLINEDO F. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Cell Biol* 2004; **200**: 353–365.
- [17] GAJATE C, MOLLINEDO F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001; **98**: 3860–3863.
- [18] GNIADOCKI R, BANG B. Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 522–528.
- [19] GNIADOCKI R. Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 165–169.
- [20] GOMEZ-MOUTON C, ABAD JL, MIRA E, LACALLE RA, GALLARDO E, JIMENEZ-BARANDA S, ILLA I, BERNAD A, MANES S, MARTINEZ AC. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9642–9647.
- [21] GRIFFITH M, EWART KV. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol Adv* 1995; **13**: 375–402.
- [22] GUAN JL. Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 2004; **303**: 773–774.
- [23] HOLOWKA D, SHEETS ED, BAIRD B. Interactions between FcεRI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1009–1019.
- [24] HUG P, LIN HM, KORTE T, XIAO X, DIMITROV DS, WANG JM, PURI A, BLUMENTHAL R. Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCRC5. *J Virol* 2000; **74**: 6377–6385.
- [25] JANS R, ATANASOVA G, JADOT M, POUMAY Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* 2004; **123**: 564–573.
- [26] KANU N, IMOKAWA Y, DRECHSEL DN, WILLIAMSON RA, BIRKETT CR, BOSTOCK CJ, BROCKES JP. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* 2002; **12**: 523–530.
- [27] KWIK J, BOYLE S, FOOKSMAN, MARGOLIS L, SHEETZ MP, EDIDIN M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13964–13969.

- [28] LAHTINEN U, HONSHO M, PARTON RG, SIMONS K, VERKADE P. Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. *FEBS Lett* 2003; **538**: 85–88.
- [29] LEGLER DF, MICHEAU O, DOUCEY MA, TSCHOPP J, BRON C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF-mediated NF κ B activation. *Immunity* 2003; **18**: 655–664.
- [30] MAHFOUD R, GARMY N, MARESCA M, YAHN N, PUIGSERVER A, FANTINI J. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11292–11296.
- [31] MULLER G. The molecular mechanism of the insulin – mimetic sensitizing activity of the antidiabetic sulfonylurea drug Amaryl. *Mol Med* 2000; **6**: 907–933.
- [32] MUPPIDI JR, SIEGEL RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004; **5**: 182–189.
- [33] NABI IR, LE PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003; **161**: 673–677.
- [34] NICHOLS BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 374–378.
- [35] OHP, McINTOSH DP, SCHNITZER JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 1998; **141**: 101–114.
- [36] OHVO-REKILA H, RAMSTEDT B, LEPPIMAKI P, SLOTT JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 2002; **41**: 66–97.
- [37] ONO A, FREED EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 13925–13930.
- [38] OSTERMEYER AG, BECKRICH BT, IVARSON KA, GROVE KE, BROWN DA. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34459–34466.
- [39] PALADE GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953; **24**: 1424.
- [40] PALAZZO AF, COOK TA, ALBERTS AS, GUNDERSEN GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 723–729.
- [41] PALAZZO AF, ENG CH, SCHLAEPFER DD, MARCANTONIO EE, GUNDERSEN GG. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 2004; **303**: 836–839.
- [42] PARTON RG, RICHARDS AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 2003; **4**: 724–738.
- [43] PARTON RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 542–548.
- [44] PARTON RG. Ultrastructural localization of gangliosides: GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 155–166.
- [45] PAYRASTRE B, PLANTAVID M, ETIEVAN C, RIBBES G, CARRATEO C, CHAP H, DOUSTE-BLAZY L. Characterization of plasma membranes from A431 cells, isolated by self-generating Percoll gradient: a rapid isolation procedure to obtain plasma membranes with functional epidermal growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1988; **939**: 355–365.
- [46] PELKMANS L, PUNTENER D, HELENIUS A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002; **296**: 535–539.
- [47] PIERINI LM, MAXFIELD FR. Flotillas of lipid rafts fore and aft. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9471–9473.
- [48] PIKE LJ, CASEY L. Cholesterol levels modulates EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* 2002; **41**: 10315–10322.
- [49] PIKE LJ, HAN X, CHUNG KN, GROSS RW. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmalogen phospholipids and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 2002; **41**: 2075–2088.
- [50] PIKE LJ, MILLER JM. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22298–22304.
- [51] PRALLE A, KELLER P, FLORIN EL, SIMONS K, HORBER JK. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 2000; **148**: 997–1007.
- [52] RACINE C, BELANGER M, HIRABAYASHI H, BOUCHER M, CHAKIR J, COUET J. Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **225**: 580–586.
- [53] RAZANI B, SCHLEGEL A, LISANTI MP. Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2103–2109.
- [54] RAZANI B, WANG XB, ENGELMAN JA, BATTISTA M, LAGAUD G, ZHANG XL, KNEITZ B, HOU HJ, CHRIST GJ, EDELMANN W, LISANTI MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2329–2344.

- [55] ROBERTS G. Langmuir-Blodgett Films. Plenum Press, New York 1990.
- [56] SABHARANJAK S, SHARMA P, PARTON RG, MAYOR S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2002; **2**: 411–423.
- [57] SCHUTZ GJ, KADA G, PASTUSHENKO VP, SCHINDLER H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* 2000; **19**: 892–901.
- [58] SELKOE DJ. Alzheimer disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 2001; **81**: 741–766.
- [59] SHEETS ED, HOLOWKA D, BAIRD B. Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεpsilonRI and their association with detergent-resistant membranes. *J Cell Biol* 1999; **145**: 877–887.
- [60] SIMONS M, KELLER P, DICHGANS J, SCHULZ JB. Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* 2001; **57**: 1089–1093.
- [61] SMART EJ, YING YS, DONZELL WC, ANDERSON RGW. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29427–29435.
- [62] SMART EJ, YING YS, MINEO C, ANDERSON RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10104–10108.
- [63] SONG KS, LI SHENGWEN, OKAMOTO T, QUILLIAM LA, SARGIACOMO M, LISANTI MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9690–9697.
- [64] SOWA G, PYPAERT M, FULTON D, SESSA WC. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; **100**: 6511–6516.
- [65] TARABOULOS A, SCOTT M, SEMENOV A, AVRAHAM D, LASZLO L, PRUSINER SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 1995; **129**: 121–132.
- [66] THOMSEN P, ROEPSTORFF K, STAHLHUT M, VAN DEURS B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytosis trafficking. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 238–250.
- [67] TIMME TL, GOLTSOV A, TAHIR S, LI L, WANG J, REN C, JOHNSTON RN, THOMPSON TC. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; **19**: 3256–3265.
- [68] VARMA R, MAYOR S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 1998; **394**: 798–801.
- [69] VOLONTE D, GALBIATI F, LISANTI MP. Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras: the subcellular distribution of caveolin-1 is modulated by cell-cell contact. *FEBS Lett* 1999; **445**: 431–439.
- [70] YAMABHAI M, ANDERSON RG. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 2002; **277**: 24843–24846.
- [71] YAMASHITA T, YAMAGUCHI T, MURAKAMI K, NAGASAWA S. Detergent-resistant membrane domains are required for mast cell activation but dispensable for tyrosine phosphorylation upon aggregation of the high affinity receptor for IgE. *J Biochem* 2001; **129**: 861–868.
- [72] YANG G, ADDAI J, ITTMANN M, WHEELER TM, THOMPSON TC. Elevated caveolin-1 levels in African-American versus white-American prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3430–3433.
- [73] YANG G, TRUONG LD, TIMME TL, REN C, WHEELER TM, PARK SH, NASU Y, BANGMA CH, KATTAN MW, SCARDINO PT, THOMPSON TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1873–1880.
- [74] YANG G, TRUONG LD, WHEELER TM, THOMPSON TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res* 1999; **59**: 5719–5723.
- [75] YUAN C, JOHNSTON LJ. Atomic force microscopy studies of ganglioside GM1 domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys J* 2001; **81**: 1059–1069.
- [76] ZHANG J, PEKOSZ A, LAMB RA. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* 2000; **74**: 4634–4644.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.12. 2004 r.

Przyjęto: 20.02.2005 r.

Ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

e-mail: urszula@cmdik.pan.pl