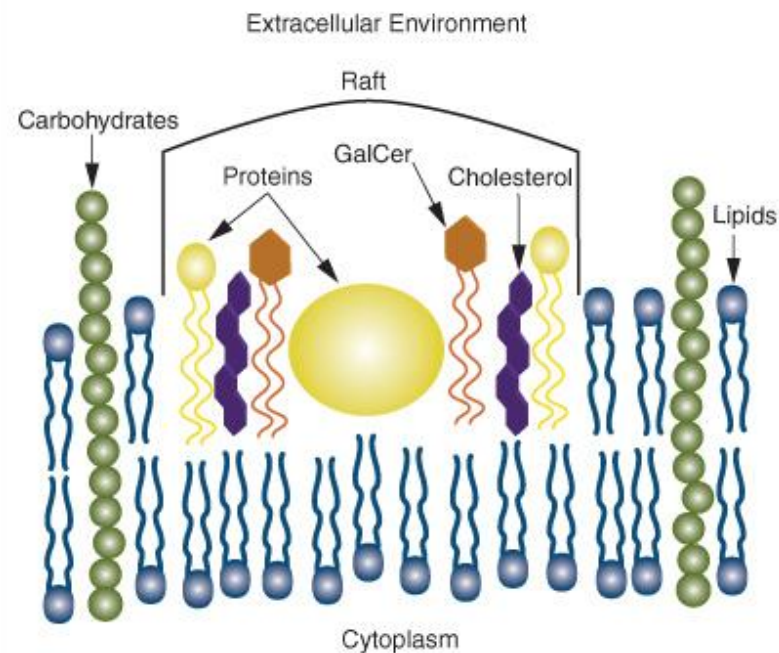




# ΕΙΔΙΚΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## Λιπιδιακές Σχεδίες και Μικροσπήλαια

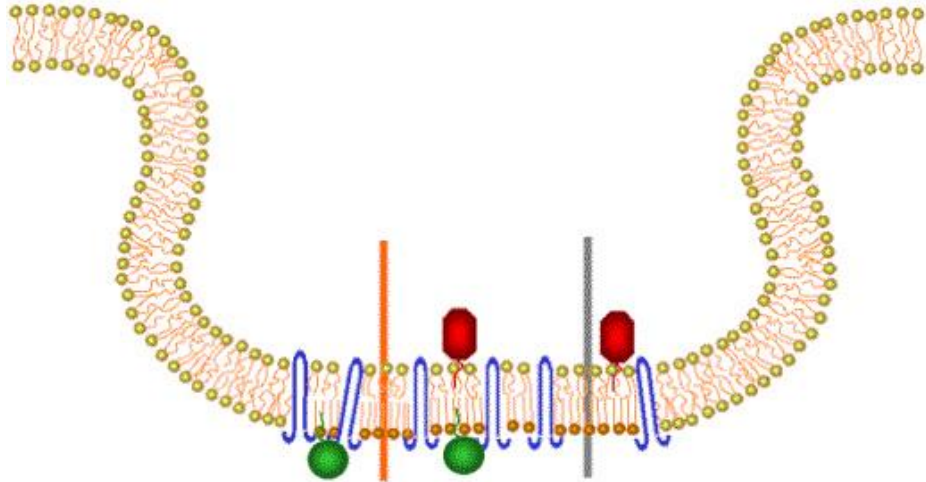


Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, *Ph.D.*

Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας,  
Πανεπιστημίου Αθηνών

2014

- **ΛΙΠΙΔΙΑΚΑ ΜΙΚΡΟΣΠΗΛΑΙΑ  
(CAVEOLAE)**



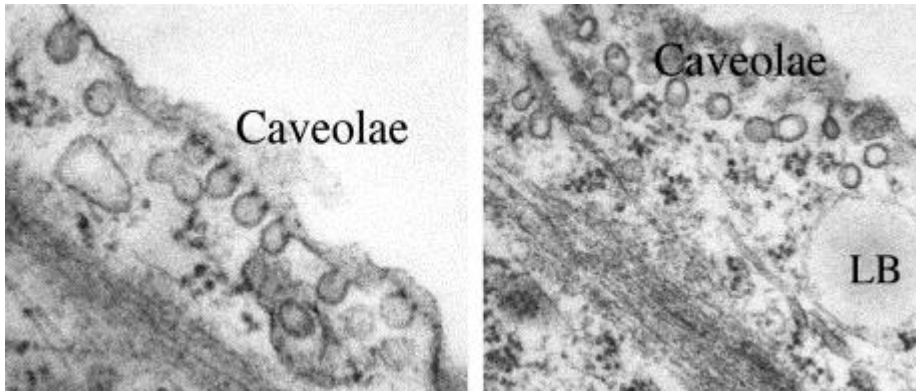
**50-100nm non-clathrin invaginations** of the plasma membrane in **most cell types**

function as specialized **membrane microdomains**

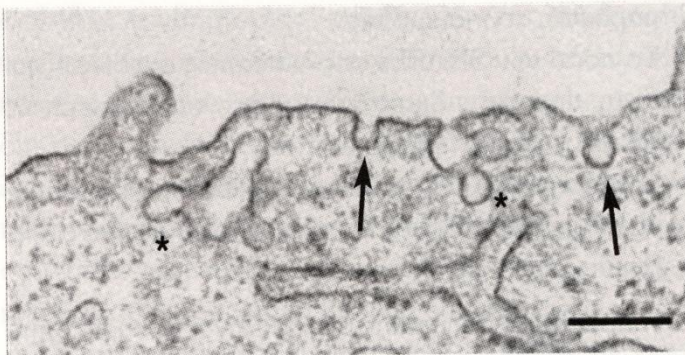
Regulate **signal transduction** and **molecule trafficking**, thus modulating several **biological functions**, including **cell growth**, **apoptosis** and **angiogenesis**

# Ορισμός και Μορφολογία

Caveolae first seen in the **electron microscope** as distinct **invaginations (infoldings)** of the cell membrane are a **special type of lipid raft** that have **small caveolin protein molecules** localized on their cytoplasmic side (*Review: Razani & Lisanti, 2001. Exp. Cell Research 271: 36-44*).



ultrastructural appearance of caveolae with the dark areas representing the caveolin protein.



- ❑ Εγκολπώσεις της ΠΜ (**1% κυτταρικής επιφάνειας**)
- ❑ **50-100nm**
- ❑ **απλά** (σχήμα φλάσκας) ή **αλυσίδες** ή long tubular structures thought to evolve from the fusion of individual caveolae
- ❑ Με **άνοιγμα** στην κυτταρική επιφάνεια
- ❑ Βρίσκονται σε αρκετούς **κυτταρικούς τύπους**
- ❑ Πιο **σταθερές δομές** σε σχέση με επίπεδες ΛΣχ
- ❑ rich in **protein receptors** involved in **signal transduction** pathways-areas in which the ligands can concentrate, thus regulating the signal transmitted by the pathway.



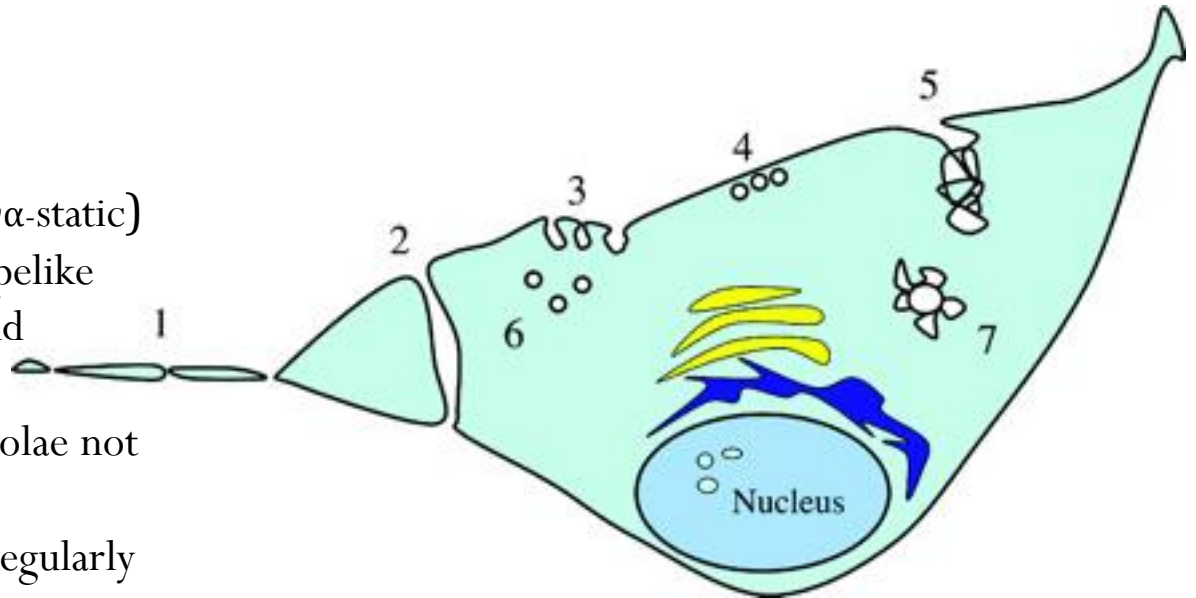
# Ορισμός και Μορφολογία

Originally regarded as **fixation artifacts** of electron microscopy

Identified in the **1950s** by electron microscopists (Eichi **Yamada** and George **Palade**) investigating cellular ultrastructure, caveolae appear as “**smooth**” **uncoated pits or vesicles** at the PM, typically observed using conventional resin-embedded techniques

## Morphological variants of caveolae

2. **Tracellular channel**
  3. **Traditional caveolae**
  4. **PM vesicles** (πλήρως εγκολλημένα-static)
  5. vesiculo-vacuolar organelle (a grapelike cluster of interconnected caveolae and vacuoles)
  - 6) cavicles (mobile, internalized caveolae not associated with the PM)
  - 7) a **caveosome** (a slow moving, irregularly shaped, cytoplasmic organelle)
- Golgi, dark blue; endoplasmic reticulum, yellow



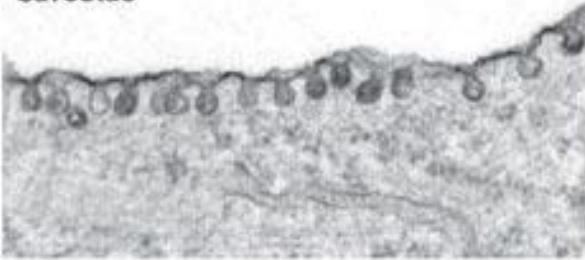
(*Cohen et al., Physiological Reviews 84:1341, 2004*)



# Ορισμός και Μορφολογία

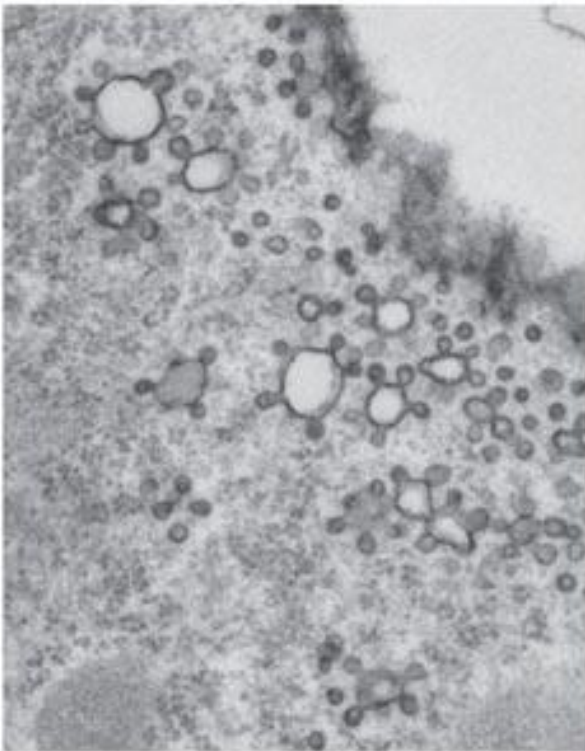
a

Caveolae



Caveolae are found in the surface of **many** mammalian **cell types**

b



electron micrographs show **caveolae** in **adipocytes** that have been surface-labelled with an electron-dense marker

# Σύσταση

**Λιπίδια:** εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη (10% της ΠΜ), SM, γλυκοσφιγγολιπίδια PE, PS, PI, P2I, ceramide, DAG

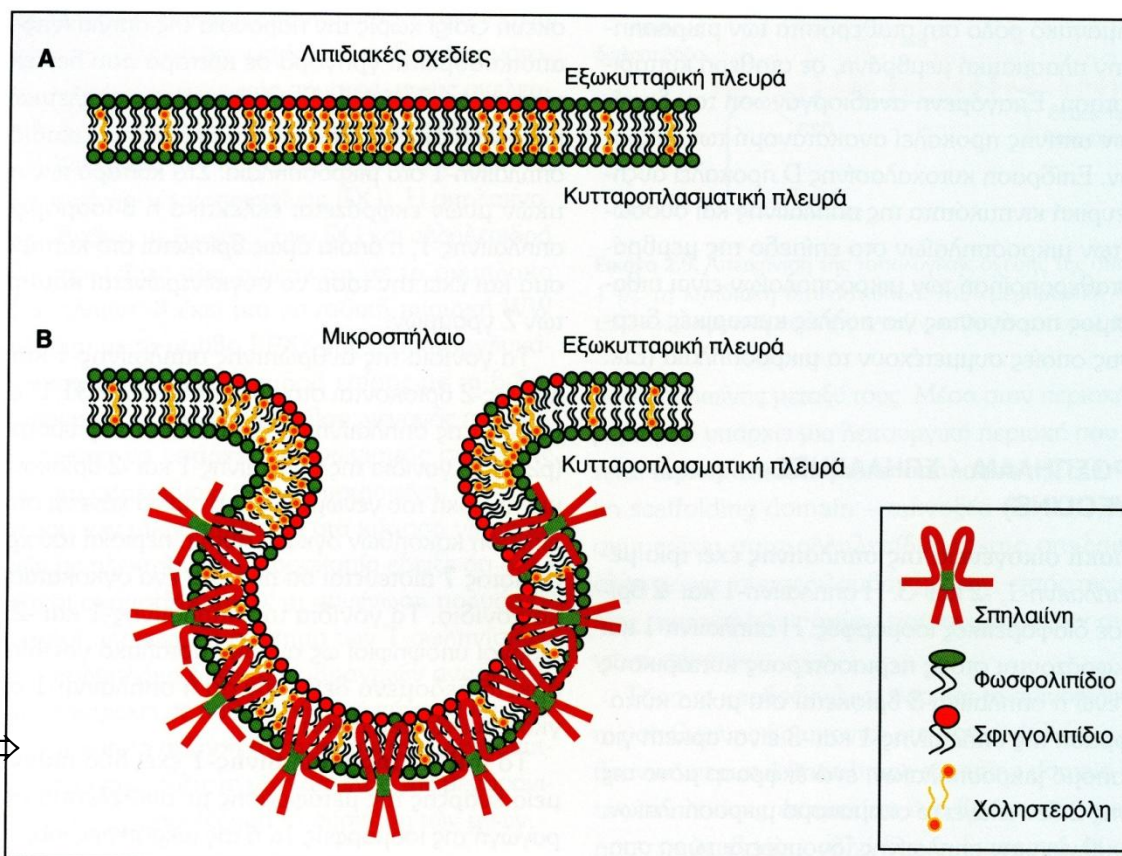
Υπάρχουν και άλλα σε μικρότερες ποσότητες πχ. PC

▪ **Ενδιάμεσα προϊόντα μονοπατιών μεταγωγής σήματος** που ξεκινούν από την ΠΜ

▪ **Χοληστερόλη:** ουσιώδης για τη διατήρηση της μορφολογίας

▪ **Λιπιδιακή σύσταση:** καθορίζει μοναδικότητα αυτών των δομών

**Διαταραχή επιπέδων χοληστερόλης** ⇒ απώλεια σχήματος μικροσπηλαίων (ακεραιότητα ΛΣχ

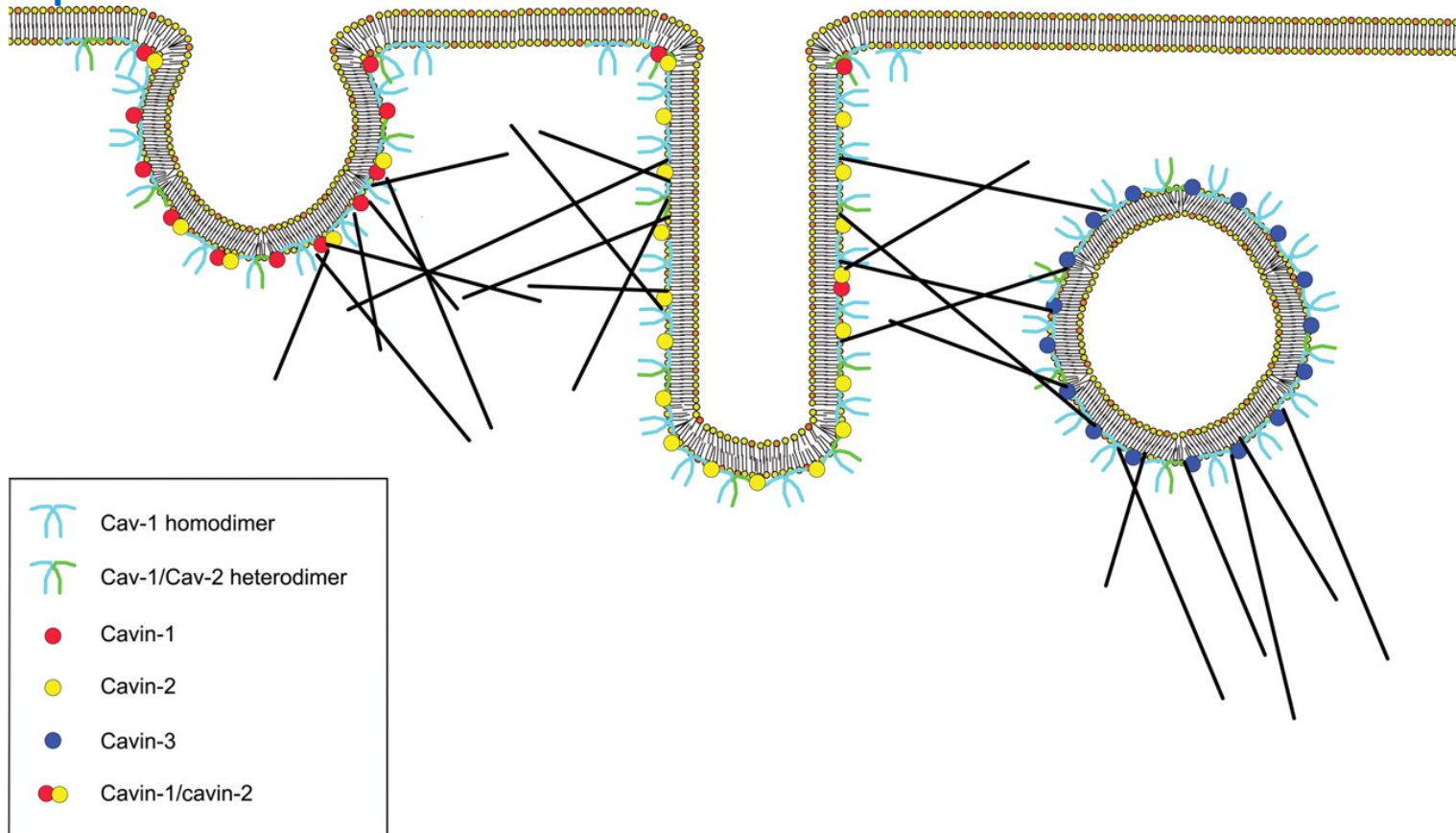


Εικόνα 2.6. Απεικόνιση της οργάνωσης των λιπιδικών σχεδιών (A) και των μικροσπηλαίων (B). (Από Razani και συν., 2004)

# Σύσταση

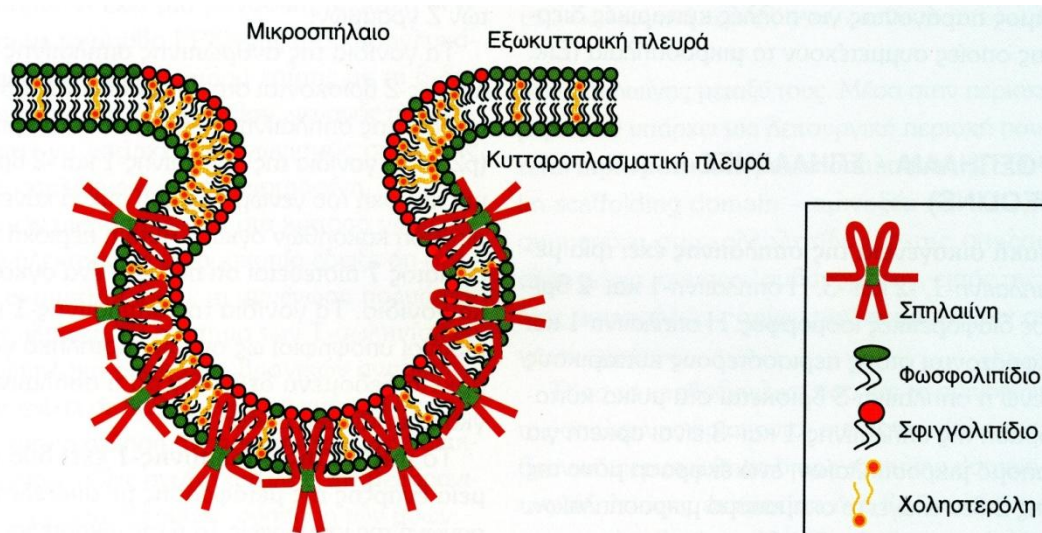
The caveolar coat is composed of two major layers of protein:

1. **Σπηλαιίνες (caveolins): coat proteins:** κύρια και απαραίτητη δομική πρωτεΐνη μικροσπηλαίων-Inner layer-CAV1, CAV2 (in non-muscle cells)
2. **Cavins: adapter proteins**



# Σύσταση

## Caveolins



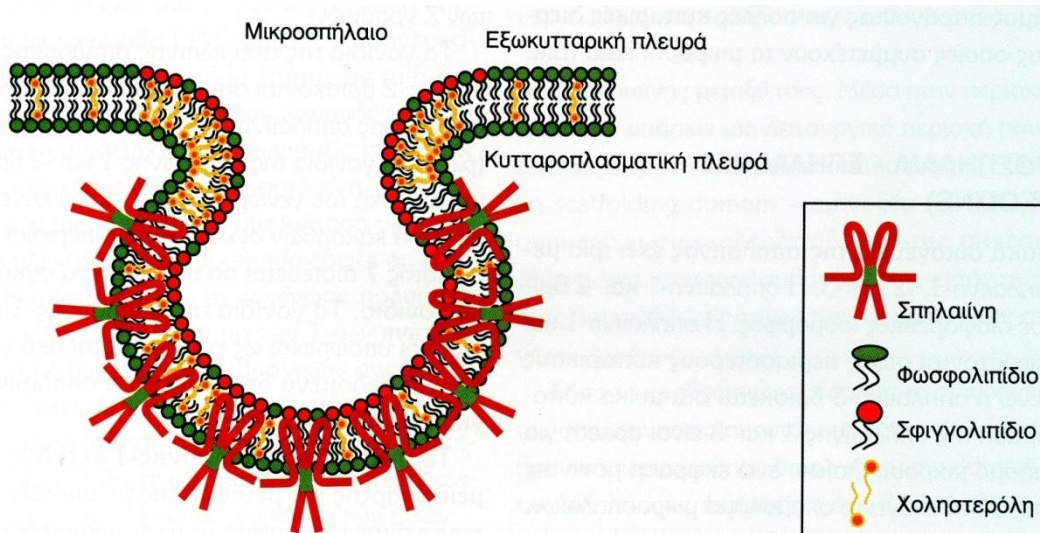
- ❑ 18-24kDa
- ❑ Εσωτερική μεμβρανική
- ❑ Στην cyt πλευρά
- ❑ Εισέρχεται χωρίς να διασχίζει
- ❑ **central hydrophobic domain inserted as a loop inside the membrane**
- ❑ Caveolin-1 is found at the **PM** but also in other **sub-cellular** compartments

✓ Στην ΠΜ (90% στα μικροσπήλαια) και ενδοκυτταρικά



# Σύσταση

## Caveolins



**tumour suppressor**: key regulator in cancer onset and progression

Caveolin-1 can also promote cell proliferation, survival and **metastasis** as well as **chemo- and radioresistance**

cancer development and its **distant spreading**

tumour **therapy** and **diagnosis**



# Σύσταση

## Cavins

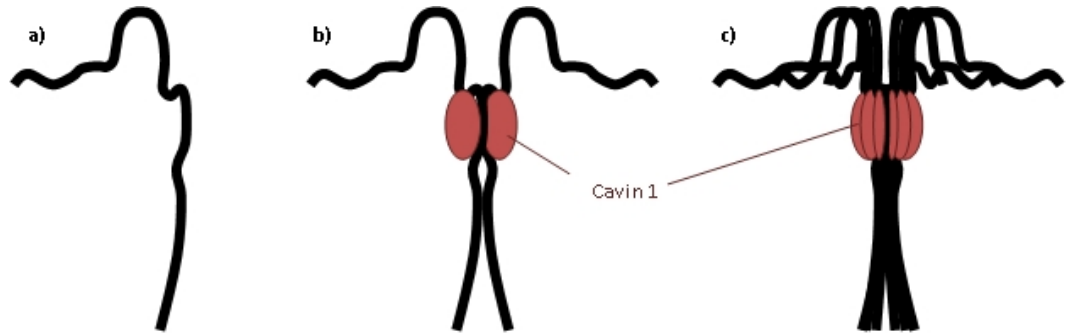
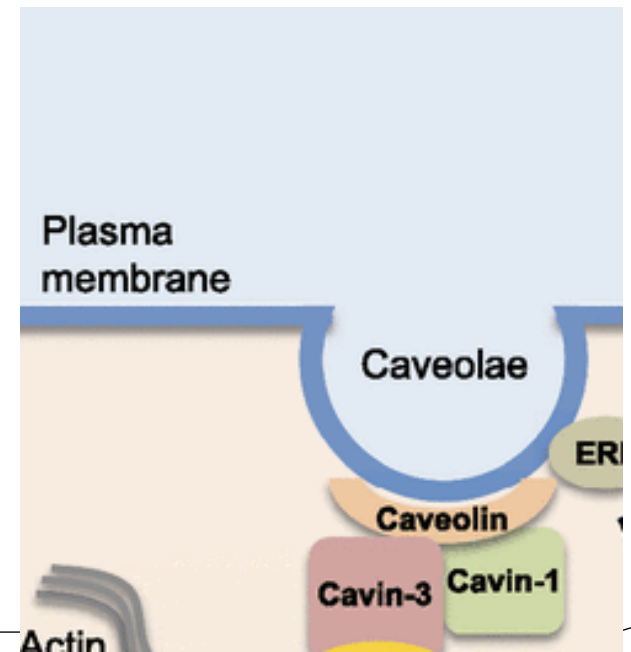


Figure 1 – Structure of Caveolin-1 showing (a) single molecule, (b) dimer with Cavin-1 and (c) oligomer

- **recently** discovered
- provide an **outer** peripheral cytosolic **protein layer**.
- They constitute **large, heterologomeric complexes** that cover the highly curved membrane of PM caveolae
- They are thought to **stabilize the caveolin scaffold**, promote membrane **curvature**, and regulate **budding of caveolae**

*Hill et al Cell 132: 113-124; 2007*

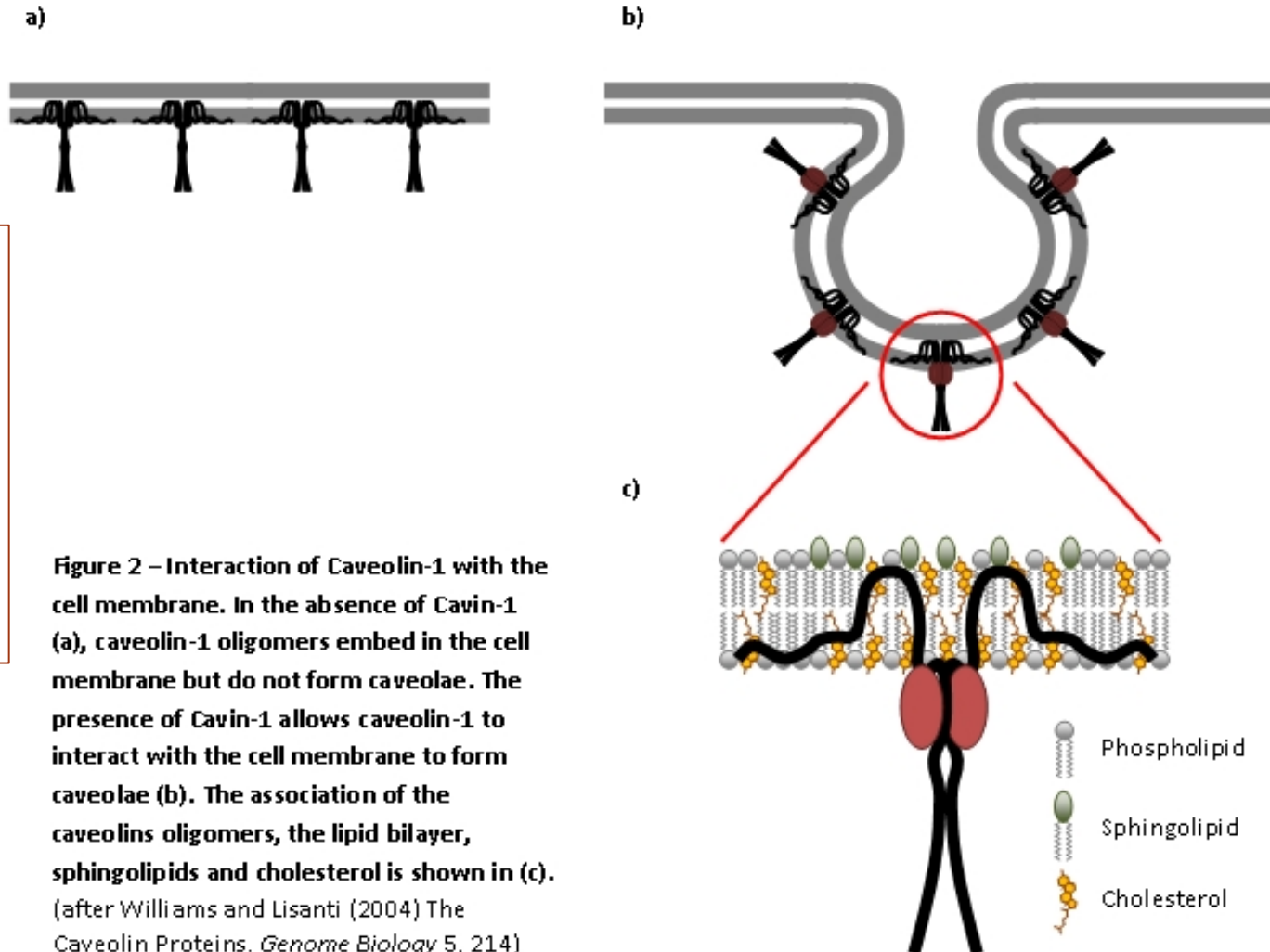
*(Bastiani et al., 2009; McMahon et al., 2009; Hayer et al., 2010; Hill et al., 2008; Liu and Pilch, 2008; Bastiani et al., 2009; Hansen et al., 2009; McMahon et al., 2009)*



# Σύσταση

## Cavins

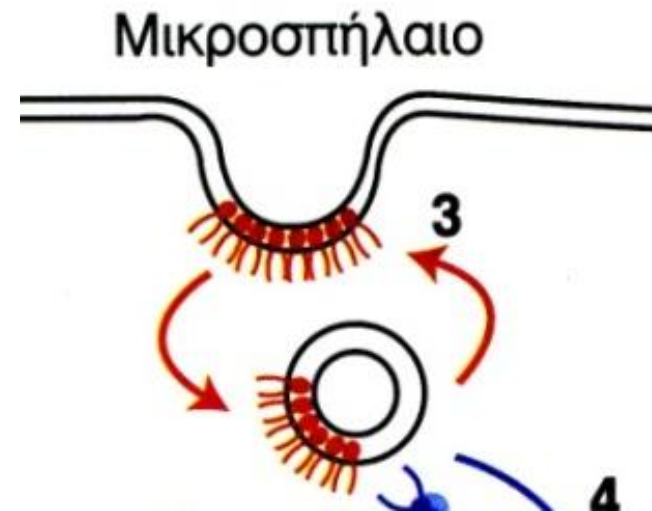
□ In the absence of cavins, caveolins associate with microdomains of the PM and persist there as planar caveolae (Lajoie et al., *J Cell Biol* 185(3):381, 2009)



# Σύσταση-Σύνδεση στη μεμβράνη

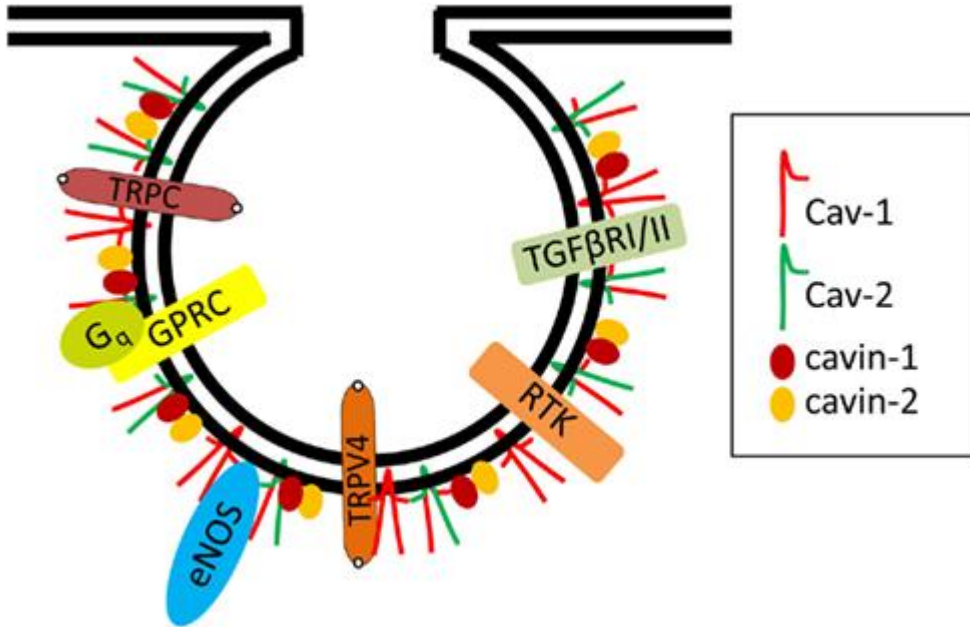
□ **Caveolae** can bud into the cell in the form of **endocytic vesicles** that dock onto endosomal organelles for cargo delivery (*Pelkmans et al., 2004; Parton and Simons, 2007*).

□ In the plasma membrane and **during the vesicular transport cycle**, the **caveolar coat** remains tightly associated with the membrane, in striking contrast to other vesicle coats such as clathrin (*Tagawa et al., 2005*).



# Σύσταση

(Sowa G. *Frontiers in Physiology* 2012)



Caveolae contain several **signalling molecules** (G-proteins, non-receptor tyrosine kinases and endothelial nitric oxide synthase, eNOS) and function as **organizing centres** that concentrate key signalling transducers

## Examples of signaling proteins localized in **endothelial** cell caveolae

Signaling molecules localized in endothelial caveolae, interacting with Cav-1: *eNOS*, RTK (e.g., *VEGF Receptor 2*), GPCR (e.g., *Bradykinin Receptor 2*, *Endothelin Receptor*, *Muscarinic Receptor*), heterotrimeric G protein subunits (e.g., Gq), *TGF-beta Receptors I and II*, *calcium channels* (e.g., TRPC1 and 4, TRPV4).

# Σύσταση

**Σπηλαιίνη:** κύρια και απαραίτητη δομική πρωτεΐνη μικροσπηλαίων-Συνδέεται in vivo και in vitro με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια

**Υπερέκφραση σπηλαιίνης-1** σε λεμφοκύτταρα\*\*\* (δεν έχουν ενδογενή σπηλαιίνη/μικροσπήλαια) ⇒ de novo σχηματισμός 50-100nm μικροσπηλαίων σε κυτταρική επιφάνεια

**Down-regulation** σε κύτταρα με ενδογενή μικροσπήλαια ⇒ απώλεια

Caveolin proteins (caveolin-1, -2, and -3):

1. **structural components of caveolae**
2. **scaffolding proteins: interactions with/recruitment of numerous signaling molecules to caveolae, as well as regulating their activity**



# Σύσταση

recently identified players in caveolar biogenesis:

[Pacsin-2](#)

[EHD2](#)

[Pacsin-2/syndapin-2](#): F-BAR domain-containing protein

tubulates membranes

Binds to EHD2

[EHD2](#): member of the EHD (Eps15 homology domain) protein family  
involved in **membrane trafficking**

Co-purified with Caveolin 1 in adipocytes

associates with caveolae through pacsin-2

EHD2 and pacsin-2 partially localize with caveolae, underlying the existence of  
**molecularly distinct sets of caveolae**

*Aboulaich, N. et al. (2004) Biochem. J. 383, 237–248*

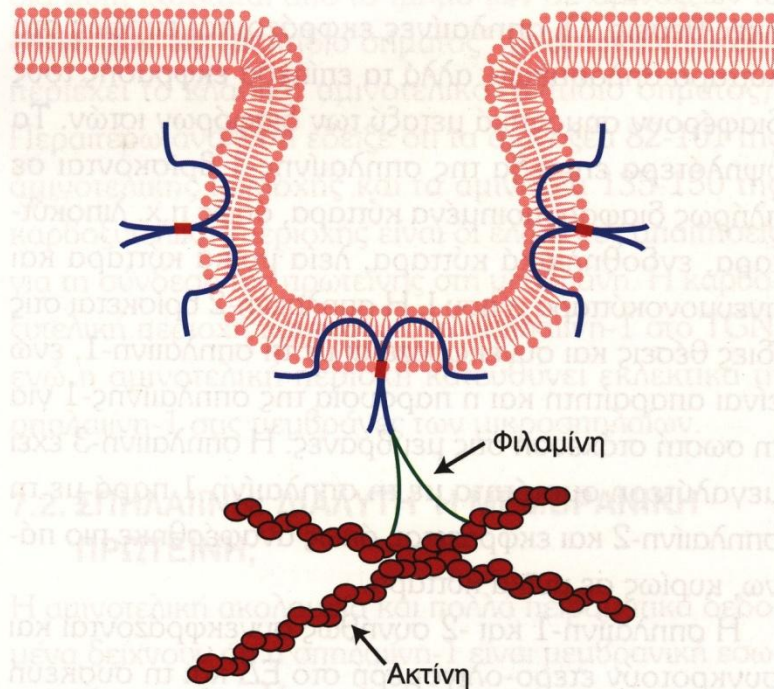
*Hansen, C.G. et al. (2011) J. Cell Sci. 124, 2777–2785*

*Moren, B. et al. (2012) Mol. Biol. Cell 23, 1316–1329*

# Σύνδεση στη μεμβράνη

Τα μικροσπήλαια (**σπηλαιίνη-NH<sub>2</sub>**) **αγκυροβολούν** στην ΠΜ με τη βοήθεια του δικτύου ινιδίων **ακτίνης** μέσω **φιλαμίνης** (COOH) (λειτουργικότητα\*\*)

⇒ Η **φιλαμίνη** διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη **σταθερότητα** των μικροσπηλαίων στην ΠΜ



**Εικόνα 2.7.** Απεικόνιση της σχέσης μικροσπηλαίων-δικτύου ινιδίων ακτίνης, η σύνδεση των οποίων επιτυγχάνεται μέσω της φιλαμίνης. (Από van Deurs και συν., 2003).

Αναδιοργάνωση δικτύου **ακτίνης** ⇒ ανακατανομή **μικροσπηλαίων**

**Κυτοχλασίνη D** ⇒

- αυξημένη πλευρική κινητικότητα σπηλαιίνης
- συσσωμάτωση μικροσπηλαίων

# Ορισμός και Μορφολογία

Caveolae represent a morphologically identifiable subset of lipid rafts.

They contain the coat proteins **caveolin/cavins**, which is **essential for the invagination** of the plasma membrane giving them their characteristic **flasklike appearance**.

While the overall biochemical composition of **lipid rafts** and **caveolae** is thought to overlap, these microdomains are not completely equivalent.

In addition to the **caveolins**, **several proteins** have been shown to preferentially localize to either caveolae or lipid rafts, respectively

# Κυτταρική κατανομή

adipocytes  
and lung: the  
major  
sources of  
vacuolae

Κύτταρα	Κατανομή
Λιποκύτταρα (20% of PM) type I pneumocytes of the lung ενδοθηλιακά επιθηλιακά ινοβλάστες Μυικά	Άφθονα μικροσπήλαια
νευρώνες ΚΝΣ λεμφοκύτταρα	Δεν έχουν μικροσπήλαια
καρκινικά κύτταρα μετασχηματισμένες (με ιούς ή ογκογονίδια) κυτταρικές σειρές	Μειωμένος αριθμός

Κατανομή αντίστοιχη λειτουργικότητας μικροσπηλαίων σε διάφορα κύτταρα

caveolae can greatly **increase the surface area** of numerous cell types (caveolae are involved in macromolecular transport)

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

Discovery of the **caveolin** protein: **1992** by the **Richard G.W. Anderson**

**3** molecules (caveolin-1, -2, and -3 genes)

**PubMed** search for "**caveolae**" reveals **~280** publications from their discovery in the **1950s** to the early **1990s**, whereas a search for "**caveolae or caveolin**" after **1990**, identifies **~7000 entries**.

Most work since 1990 focused on:

- caveolae as **PM microdomains**
- function of caveolin proteins at the **PM**
- localization of caveolins in multiple **cellular membrane compartments** (mitochondria, nuclei, ER)
- regulation of **intracellular signaling**

Intracellular localization allows for a **complexity of responses to extracellular stimuli by caveolin**



# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV gene family

## CAV-1:

**3 exons** (highly **conserved** in sequence and structure among species)

**2 isoforms** ( $\alpha/\beta$ - protein 3kDa smaller, from alternate translation initiation site, Met32)

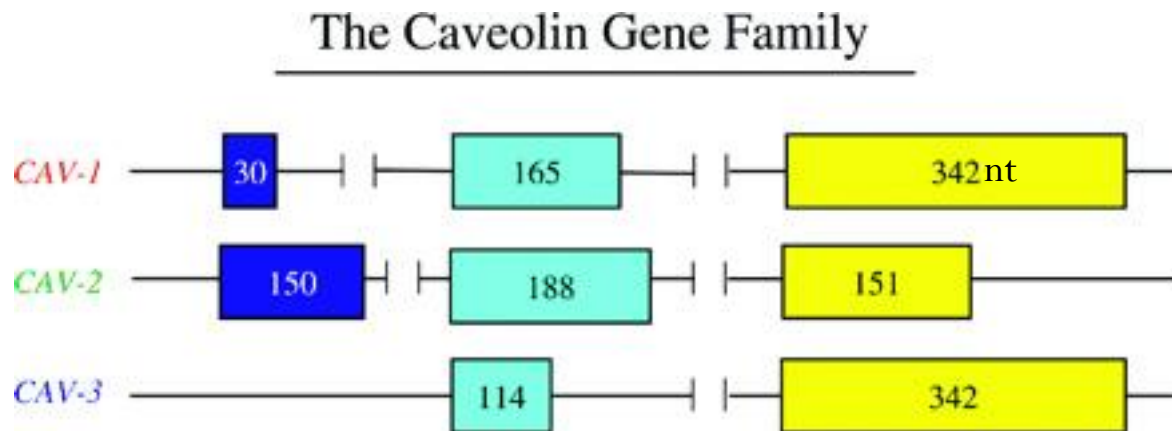
Both can drive **vacuolae formation** (**cav-1 $\alpha$  isoform** is localized predominantly to **deeply invaginated caveolae** and can more efficiently **drive the formation of caveolae** than the  $\beta$ -isoform)

## CAV-2:

**3 isoforms** (full-length 2 $\alpha$  and 2 truncated 2 $\beta$  and 2 $\gamma$ )

**truncated 2 $\beta$** : splicing variant, **dinstinct subcellular distribution** from full-length 2 $\alpha$

## CAV-3:



(Cohen et al., *Physiological Reviews* 84:1341, 2004)

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV gene family

## CAV-1, CAV-2 genes:

- ❑ Χρωμόσωμα **7**
- ❑ Relatively **ubiquitous distribution** pattern-coexpressed in most differentiated cell types (EXCEPTION: skeletal muscle fibers and cardiac myocytes)
- ❑ Πιθανοί υποψήφιοι ως **ογκοκατασταλτικά γονίδια** (βρίσκονται σε περιοχή γενώματος που συχνά χάνεται σε κακοήθειες, πιθανά περιέχει ογκοκατασταλτικό γονίδιο)

## Cav-3 expression:

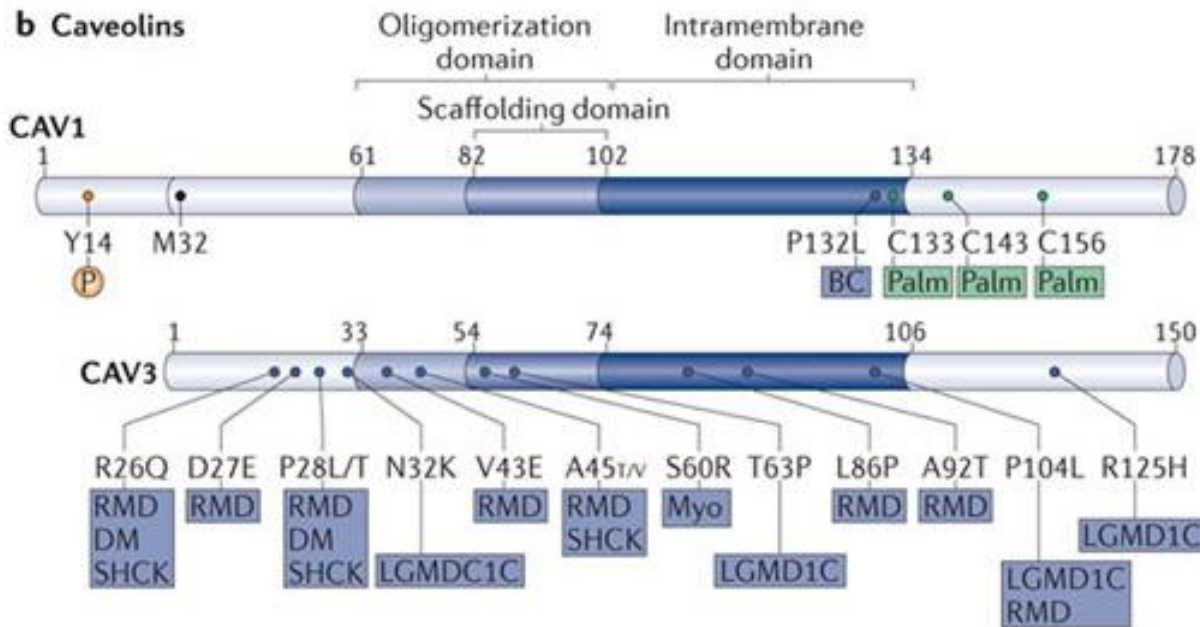
- ❑ Χρωμόσωμα **3**
- ❑ Limited to **skeletal muscle, diaphragm, and heart**
- ❑ dependent on the degree of **muscle cell differentiation**: Cav-3 mRNA is only detectable in **differentiated**, nonproliferating C2C12 **myoblasts** versus the proliferating precursor myoblast cell type in which both Cav-1 and Cav-2 are highly expressed

caveolin **genes** and **proteins** share **significant homology**

Human caveolin-2 is ~38% identical and ~58% similar to human caveolin-1, while caveolin-3 is ~65% identical and ~85% similar to caveolin-1

Παρόμοιες λειτουργίες με caveolin-1 (πχ. σε σύσταση μικροσπηλαίων σε μεταγωγείς σήματος (eNOS, PKCα, PKCδ, PKCε, κινάσες οικογένειας Src κλπ)

the **caveolin proteins** are **highly conserved throughout evolution**



# CAV -1 protein

Human 1 MSGGKYVDS--EGHLYTVPIREQNIIYKPNNAKAMA-DELSEKQVYDAHTKEIDLVNDRDPK  
 Bovine 1 E MN  
 Mouse 1 VT  
 Chick 1 T F AA V A H VD  
 Fugu 1 T LRDGEKE EF HSPFI K Y D DY I N SME V T

(Cohen et al., *Physiological Reviews* 84:1341, 2004)

Human 58 HLNDDVVKIDFEDVIAEPEGTHSE DGIWKASFTTFTVTKYWFRLLSALFGIPMALIWG  
 Bovine 58  
 Mouse 58 TI  
 Chick 58 I  
 Fugu 61 V A Y V C T V L

Human 118 YFAILSFLHIWAVVPC KSFLEIEIQCI SRVYSIYVHTVCDPLFEAVGKIFSNVRINLQKE  
 Bovine 118 F I I T  
 Mouse 118 F I I ST  
 Chick 118 R Y CI F M V SI ATVR  
 Fugu 121 F I V Y H C F M LGG RTS

σπονδυλωτά  
 Xenopus laevis  
 C. elegans

Human 178 I  
 Bovine 178  
 Mouse 178  
 Chick 178  
 Fugu 181 V

**Protein sequence alignment of caveolin-1 across several species.** Sequences are presented in decreasing order of similarity to human caveolin-1. **Identical residues are not shown** in the bovine, mouse, chick, and fugu sequences, while **changed amino acids are indicated**. A – indicates a space inserted to maximize homology among species. Colors indicate proline (purple, P); aspartic or glutamic acid (red, D and E); arginine or lysine (blue, R and K); phenylalanine, isoleucine, methionine, valine, tryptophan, or tyrosine (green, F, I, L, M, V, W, and Y); and all other amino acids alanine, cysteine, glycine, histidine, asparagine, serine, and threonine (black, A, C, G, H, N, Q, S, and T). The single red box outlines the **oligomerization domain**, the double red box outlines the **scaffolding domain**, and the blue box outlines the **membrane spanning domain**

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV proteins

- ❑ **Caveolin-1**: 22-kDa protein, 178 aa
- ❑ highest levels of expression in: adipocytes, endothelial cells, fibroblasts, and type I pneumocytes
- ❑ caveolin-1 expression is **sufficient and necessary** to drive the formation of morphologically identifiable **caveolae** (“ΙΚΑΝΗ” ΚΑΙ ΑΝΑΓΚΑΙΑ: CAVINS!!!!!!)
- ❑ caveolin-1 expression is **necessary** for the stable expression and membrane localization of **caveolin-2**
- ❑ **Ομο-ολιγομερές ή ετερο-** (με cav-2) σε μεμβράνες
  
- ❑ **caveolin-2** alone is **insufficient** to induce caveolae biogenesis
- ❑ highest levels of expression in the same cell types as cav-1 (co-expression)
- ❑ the role of Cav-2 can vary depending on a cell and tissue type

With CAV1 as the major organizing subunit, **the two caveolins** (CAV1, CAV2) form an interconnected scaffold that defines the **size** and many of the overall **properties** of the microdomain.

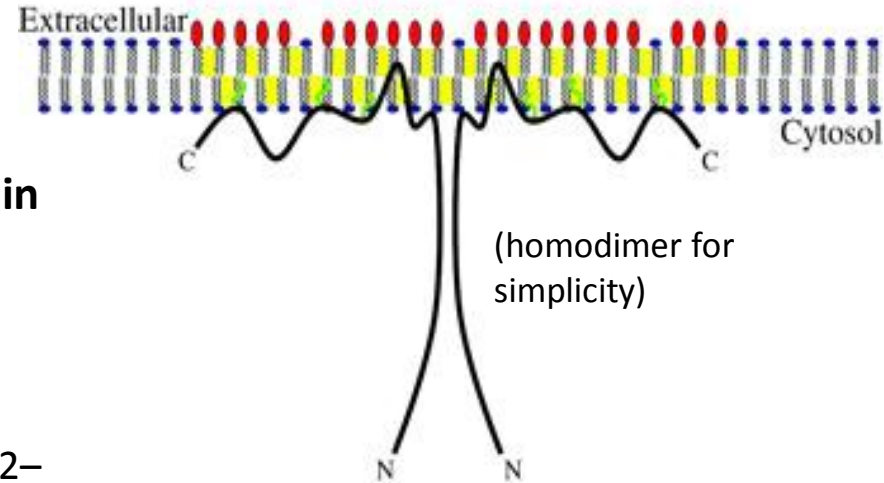
- ❑ **cav-3 protein** is **muscle specific** and, like Cav-1, is **sufficient to drive the formation of caveolae**



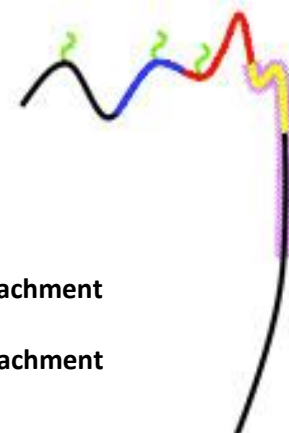
# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV-1 protein

Caveolin Membrane Topology



(homodimer for simplicity)



❑ **no portion** of the caveolin-1 protein is extracellular

❑ both the **NH<sub>2</sub>** and **COOH termini** face the **cytoplasm**, with an intervening **hydrophobic domain inserted into the membrane (hairpin topology)**

❑ The membrane insertion of caveolin-1 occurs via the **classical ER machinery (συν-ΜΦΡ)**, resulting in an **unusually short TM domain of 32 hydrophobic aa** (aa 102–134) thought to form a unique **hair-pin loop** (βρόγχος σαν φουρκέτα) configuration that prevents caveolin-1 from completely spanning the plasma membrane in a traditional double-pass fashion

❑ the **COOH terminus** of caveolin-1 is **palmitoylated** and the **NH<sub>2</sub> terminus** is **Tyr phosphorylated** (required in order for both ends of the protein remain **cytoplasmic**-αγκυροβόληση στη διπλοστιβάδα, σταθεροποίηση δομής πρωτεΐνης σε μικροσπήλαια)

	Plasma membrane	
	Caveolae membrane Cholesterol and sphingomyelin enriched	
	Cav-1 monomer	
	Transmembrane domain (residues 102-134)	
	C-MAD (residues 135-150)	membrane attachment
	N-MAD/Scaffolding Domain (residues 82-101)	membrane attachment
	Palmitoyl groups (residues 133, 143, 156)	cys
	Oligomerization domain (residues 61-101)	

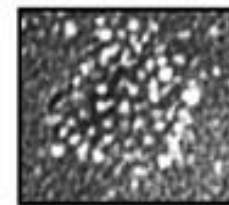
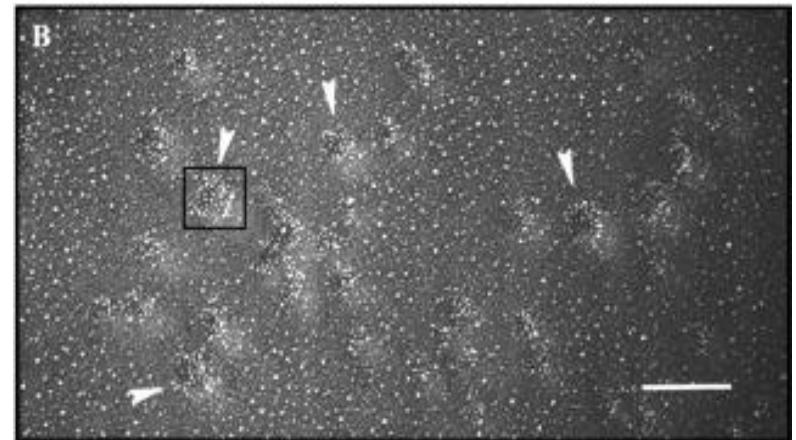
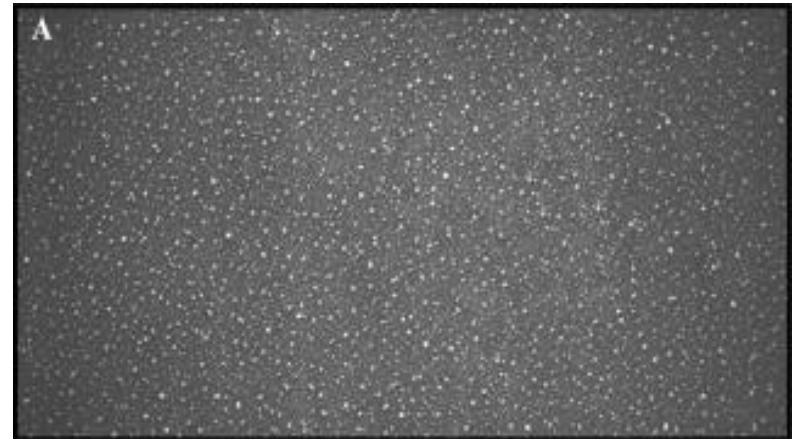
# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV-1 protein

□ Caveolin-1 isoforms form **HMW oligomers** of ~ 400kDa

□ **oligomerization domain** (aa61–101): mediates the **homo-oligomerization** of 14–16 individual caveolin-1 molecules (**ΕΔ**)

□ These cav-1 oligomers undergo a **2<sup>nd</sup> stage of oligomerization** during transport from the **trans-Golgi** to **PM caveolae**, whereby several oligomers **self-associate** via **COOH-terminal** interactions, forming a large network of caveolin (το ίδιο και με cav-3)



(Sargiacomo et al., PNAS 92:9407, 1995)

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

CAV-2 and CAV-3 proteins



□ **caveolin-2** is **incapable of forming HMW homo-oligomeric complexes** (inability to form caveolae by itself)

□ **caveolin-2** does form **hetero-oligomeric complexes with caveolin-1 in the ER**, an association that serves to both **stabilize** caveolin-2 against proteasomal degradation and allow its **transport** from the Golgi to the PM plasma membrane. Ωριμάζοντας σχηματίζουν σύμπλοκα μεγαλύτερου MB μόλις φτάσουν σε μικροσπήλαια ΠΜ.

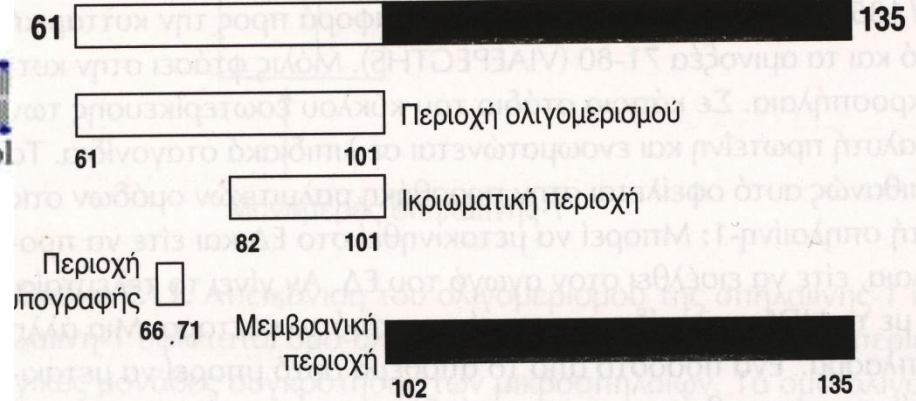
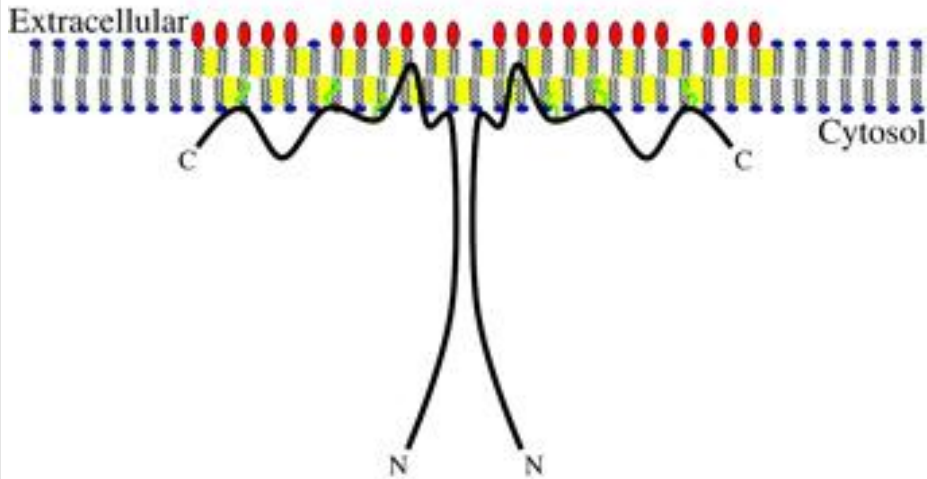
□ **Caveolin-3** is known to form HMW **homo-oligomeric complexes** in situ, in a fashion similar to that of caveolin-1

□ while it has long been thought that **caveolin-3** does not bind to caveolin-2, recent findings in isolated neonatal cardiac myocytes and smooth muscle cells suggest otherwise (**caveolin-2** coimmunoprecipitates with **caveolin-3**)

□ **Αντικαθιστά τη σπηλαιίνη-1** στα μικροσπήλαια σκελετικών και καρδιακών μυών

□ **Ειδικός ρόλος σε μυϊκό ιστό** (εκτός από διαμερισματοποίηση μορίων μεταγωγής σήματος):  
συνένωση πολλών μικροσπηλαίων σπηλαιίνης-3 οδηγούν στο σχηματισμό **T-σωληνίσκων**

## Caveolin Membrane Topology



Εικόνα 2.8. Απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών της σπηλαιίνης-1. (Από Couet και συν., 2001).

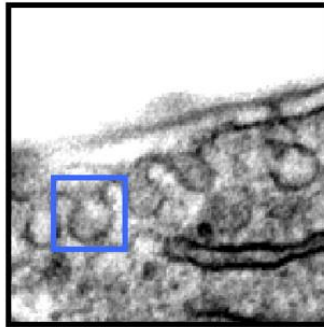
	Plasma membrane
	Caveolae membrane Cholesterol and sphingomyelin enriched
	Cav-1 monomer
	Transmembrane domain (residues 102-134)
	C-MAD (residues 135-150) <b>membrane attachment</b>
	N-MAD/Scaffolding Domain (residues 82-101) <b>membrane attachment</b>
	Palmitoyl groups (residues 133, 143, 156) <b>cys</b>
	Oligomerization domain (residues 61-101)



**Πρωτεϊνικά domains**



# Πρωτεϊνικά domains



 Membrane attachment domain

 Transmembrane domain

 Caveolin scaffolding domain

 Oligomerization domain



Cholesterol



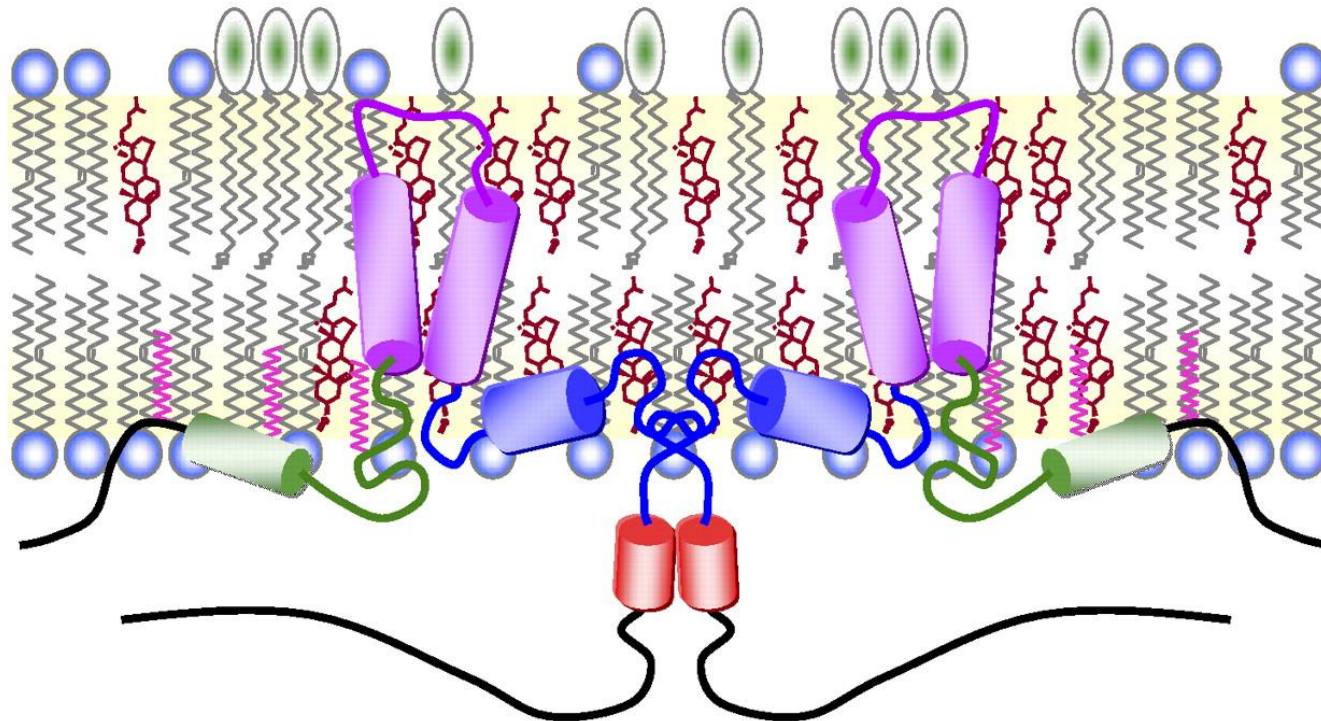
Phospholipid



Sphingolipid

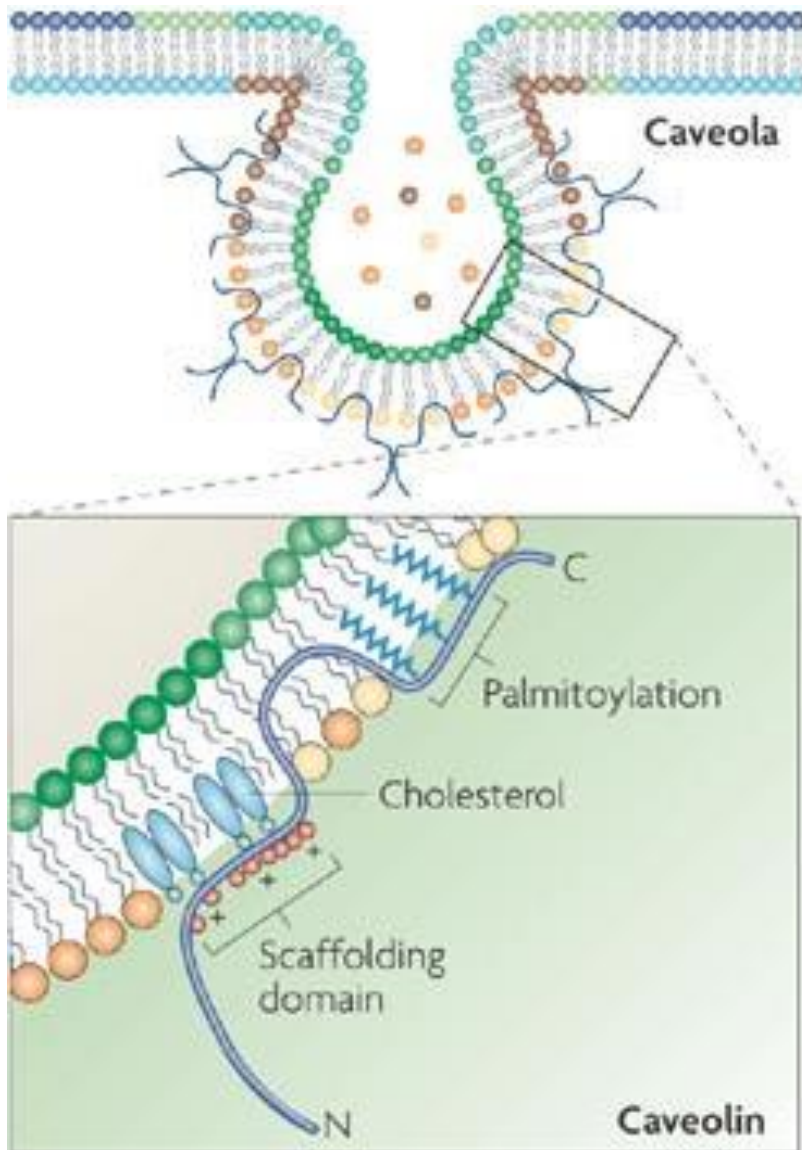


Palmitoylation



# Σπηλαιίνες (Caveolins)

- ❑ **“caveolin signature sequence”**: motif that is identical between all three caveolin proteins (short stretch of 8aa **FEDVIAEP**)-Η πιο διατηρημένη περιοχή-Απαραίτητο για έξοδο από το ΕΔ (εναλλακτικά παγίδευση σε ΕΔ)
- ❑ **Caveolin oligomerization domain (COD)**, aa61–101) mediates the homo-oligomerization of 14–16 individual **caveolin-1** molecules (and **cav-3**). Further contribution of **COOH-domain**
- ❑ **Caveolin scaffolding domain (CSD)** aa82–101, βασικά/αρωματικά αα: (ικριωματική περιοχή) 1) recognizes a hydrophobic caveolin-binding motif present in many signaling molecules-Άμεση δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τη μεμβράνη
- ❑ **cav-2/cav-1 hetero-oligomers** through membrane and CSD-cav-2)
- ❑ (**cav-2/cav-3 hetero-oligomers** ??? Probably...)
- ❑ **caveolin binding motifs (CBM)**: were identified in most proteins shown to interact with caveolin-1 (CBM; ΦXXXXΦXXΦ and ΦXΦXXXXΦ, where Φ represents an aromatic amino acid)
- ❑ The **scaffolding domain** serves a **dual role**: (1) **anchor** holding various proteins within caveolae, (2) **regulatory element** capable of either inhibiting or enhancing a given protein's signaling **activity**
- ❑ αα82-101 (**NMAD scaffolding domain/μικροσπήλαια**) και αα135-150 (**CMAD/TNG**): ελάχιστες απαιτήσεις για σύνδεση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη



1. N and C termini facing the cytoplasm
2. 'hairpin' intramembrane domain embedded within the membrane bilayer

The **scaffolding domain**, a highly **conserved** region of caveolin, might have a role in **cholesterol** interactions through conserved basic (+) and bulky hydrophobic residues (red circles).

The **C-terminal domain**, which is close to the intramembrane domain, is modified by **palmitoyl groups** that insert into the lipid bilayer.



# Σπηλαιίνες (Caveolins)

ΠΜ, συσκευή Golgi, κυστίδια, κυτταροπλασματικές θέσεις

**Σπηλαιίνη-1:** ασυνήθιστη πρωτεΐνη – εσωτερική μεμβρανική ΚΑΙ διαλυτή σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα

## A) Εσωτερική μεμβρανική:

### ➤ **αα-ακολουθία**

➤ Εισέρχεται **συν-ΜΦΡ στο ΕΔ** → ενσωματώνεται σε λιπιδιακές δομές Golgi ως διαλεγόμενες για ΠΜ

➤ Βρίσκεται στα **μικροσπήλαια** / Απομακρύνεται μόνο με απορρυπαντικά

➤ **Ανακύκλωση:** Μικροσπήλαια ΠΜ → κυστίδια → ενδοκυτταρικές θέσεις → ΠΜ

## B) Διαλυτή: (εκκρινόμενη και cyt εγκλεισμένη σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια)

➤ Ανιχνεύεται σε **αγωγό ΕΔ**

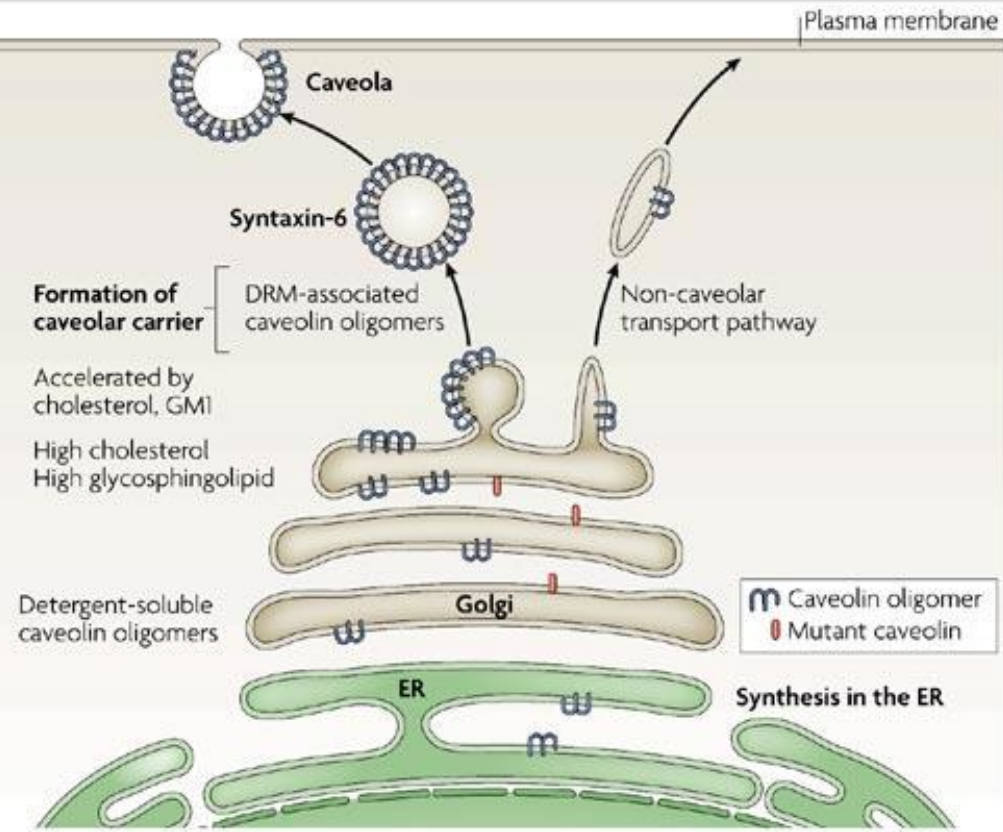
➤ **Κυτταροπλασματικό** απόθεμα σε ινοβλάστες, κύτταρα σκελετικών μυών, κερατινοκύτταρα

➤ **Εσωτερικό εκκρικών κυστιδίων** (πάγκρεας, στόμαχος, σιελογόνοι αδένες)

➤ **Μιτοχόνδρια** (ηπατοκύτταρα)

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

## Caveolin biosynthesis and trafficking to the plasma membrane



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Caveolin is **synthesized in the ER** (forms 8S oligomers containing 7-10 CAV1/2 molecules)

Is transported to the **Golgi complex** by **COPII-dependent transport** as detergent-soluble oligomers

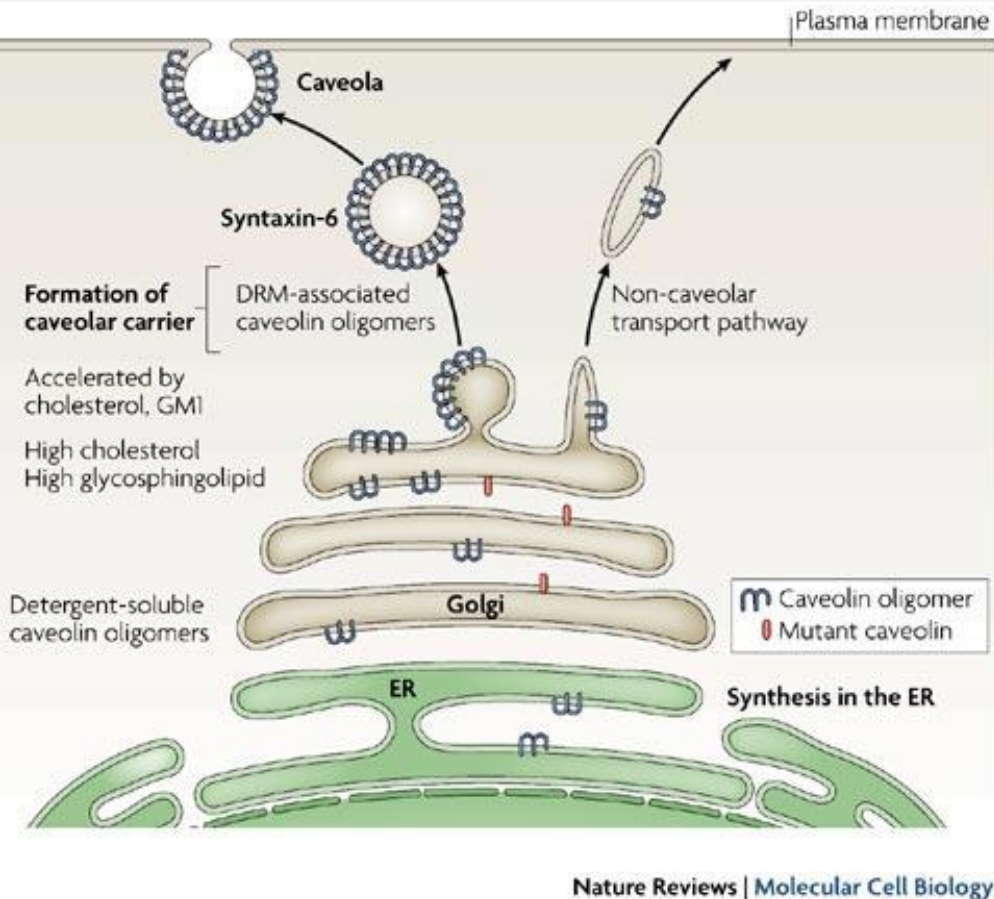
**In Golgi, the 8S oligomers** associate with **glycosphingolipid** and **cholesterol** and form a membrane-embedded **scaffold** composed of **15–25 8S complexes**. The scaffolds sediment as **70S particles**.

(detergent-resistant membrane (DRM))

*Parton RG & Simons K. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 185-194;2007*

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

## Caveolin biosynthesis and trafficking to the plasma membrane

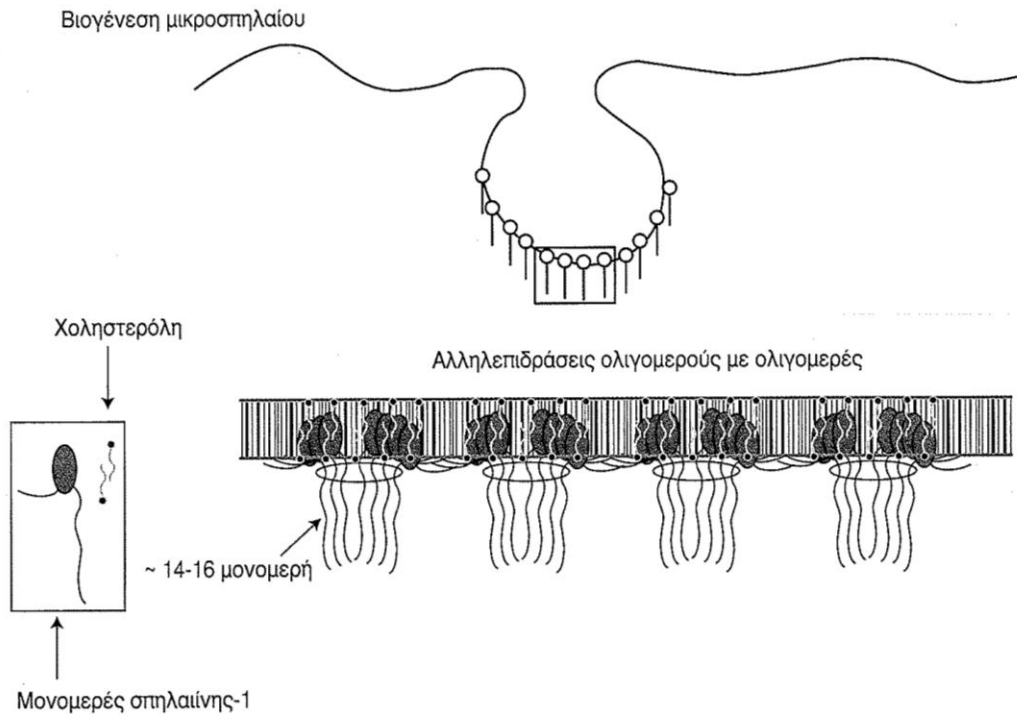


**1<sup>st</sup>)** A special **vesicular pathway** is responsible for transporting the **caveolin scaffolds** to the PM, where the **cavins** associate with them (in the form of large 60S complexes, *Hayer et al., 2010*).

Caveolar carriers fuse directly with the PM in a process that requires the SNARE protein **syntaxin-6**.

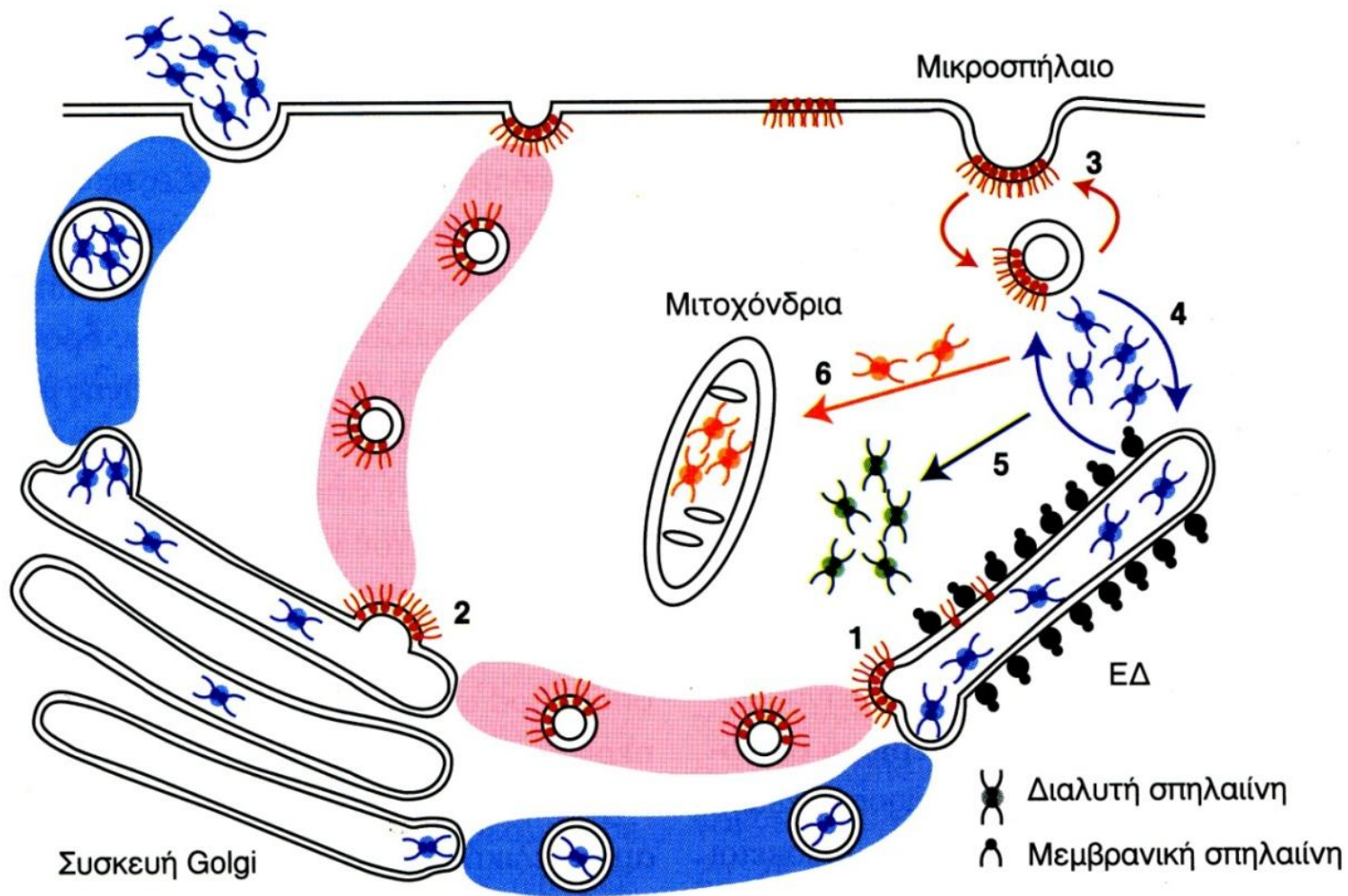
**2<sup>nd</sup>)** In addition, caveolin can be transported to the PM by **other carriers**.

Many **caveolin mutants** that have been associated with **disease conditions accumulate in the Golgi complex** and are not transported to the PM efficiently (as indicated by mutant caveolin (red) in the figure).



**Εικόνα 2.11.** Απεικόνιση του ολιγομερισμού της σπηλαιίνης-1 και της βιογένεσης των μικροσπηλαίων. Στο επίπεδο του ΕΔ η σπηλαιίνη-1 υφίσταται ομο-ολιγομερισμό και κάθε ολιγομερές περιέχει 14-16 μόρια. Τα ολιγομερή αυτά αντιπροσωπεύουν τις λειτουργικές μονάδες συγκρότησης των μικροσπηλαίων. Τα ομο-ολιγομερή υφίστανται ένα δεύτερο στάδιο ολιγομερισμού κατά τη μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη, πιθανόν στο TGN, σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο στο κάτω μέρος της πλασματικής μεμβράνης. Το δίκτυο αυτό μπορεί να δράσει συνεργατικά με τη χοληστερόλη, προκαλώντας παραμόρφωση της μεμβράνης και δημιουργία των μικροσπηλαίων. (Από Razani και συν., 2002).

# Caveolin biosynthesis and trafficking to the plasma membrane



# Σπηλαιίνες (Caveolins)

## Caveolin assembly-disassembly-degradation

(Once properly formed) **caveolae** in the PM are **stable structures** in which neither the **caveolins** nor the **cavins** undergo rapid turnover.

Caveolae can be activated and undergo **endocytic internalization** and there is evidence that they can participate in cycles of **fusion** and **fission** with the PM

**Cholesterol** is not only needed for **assembly** of caveolae but also for **stability**

**Cavins** also contribute to the **stability** of caveolae as down-regulation of cavin-1 shortens the half-life of CAV1.

CAV1 was degraded very slowly, but turnover could be accelerated by **compromising caveolae assembly**.

Under normal conditions, **CAV1 in the plasma membrane is localized in caveolae** without a detectable free pool.



# Σπηλαιίνες (Caveolins)

## Caveolin assembly-disassembly-degradation

Σε συνθήκες όπως:

1. Αποσταθεροποίηση μικροσπηλαίων **ΠΜ** πχ. διαμέσου απώλειας cavin-1
  2. Διαταραχή συγκρότησης μικροσπηλαίων σε **Golgi** (πχ. έλλειψη χοληστερόλης ή cavin-1)
- ⇒ Τα μικροσπήλαια χωρίζονται/καταρρέουν σε σύμπλοκα **8S** τα οποία ενδοκυτταρώνονται στα **πρώιμα ενδοσώματα** (ΕΕ)

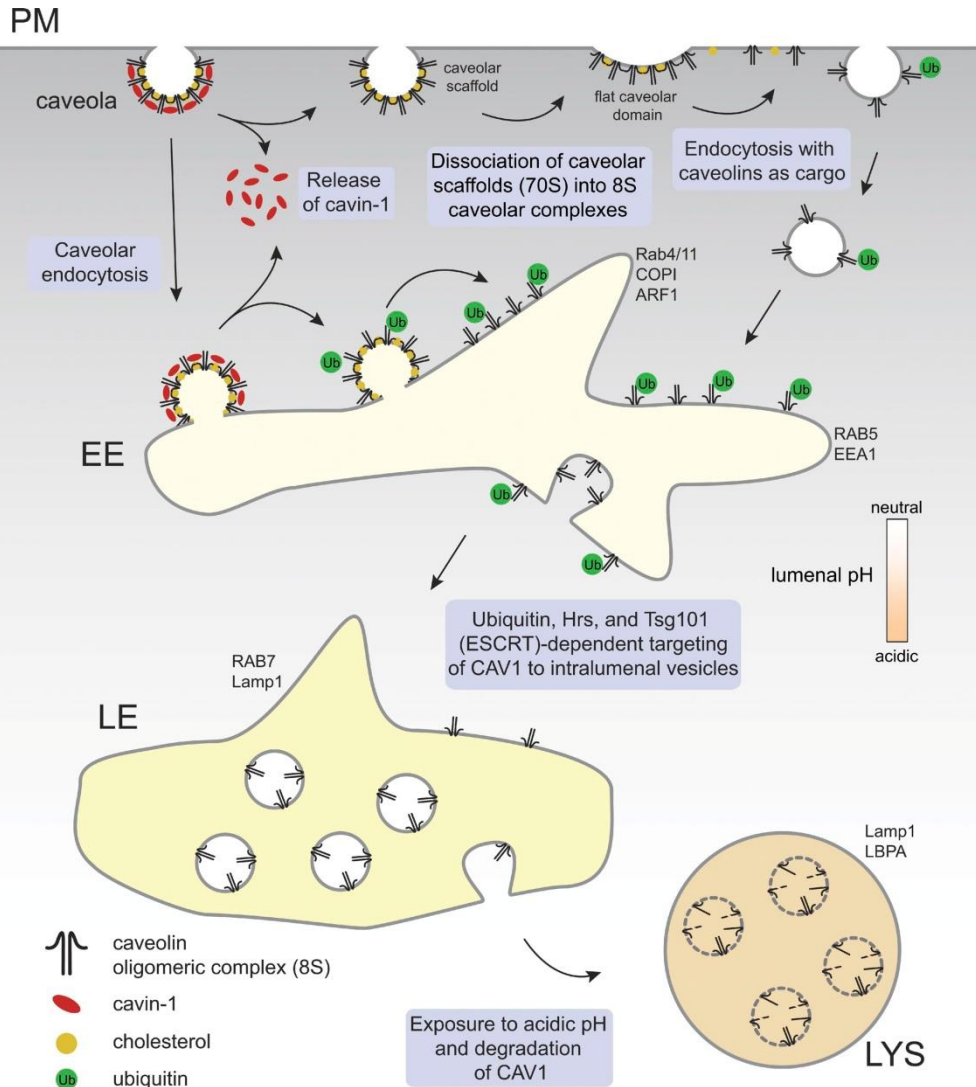
CAV1 is found in **late endosomes** (LE) and **lysosomes** where it is degraded.

Targeting of the **unassembled CAV1** to the **degradative** pathway required **ubiquitination** and the endosomal sorting complex required for transport (**ESCRT**) **machinery** for inclusion into intraluminal vesicles in endosomes

Σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται **διάχυση της CAV1 (free CAV1) στην ΠΜ, μείωση του χρόνου ζωής** (36h to 14h) και **αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης** της πρωτεΐνης.



## Model of caveolae disassembly and degradation of Caveolin 1(CAV1)



**Caveolae disassembly:** involves the **release of cavin-1** from an intact caveola followed by dissociation of the destabilized **70S** caveolar scaffold into **8S caveolar complexes**.

This may occur in **EE** after **caveolar endocytosis** or in the **PM**, from where disassembled CAV1 is delivered to EE as RAB5 endocytic cargo.

**Unassembled CAV1** may also arise when **assembly of caveolar scaffolds in the Golgi is compromised** and **CAV1 arrives in the PM in the form of 8S complexes**.

In endosomes, the ubiquitinated 8S caveolar complexes are recognized by the ESCRT machinery and targeted to ILV facing the lumen.

Upon lysis of ILV in **LYS**, CAV1 is exposed to the acidic vacuolar pH and degraded by **proteolytic cleavage**.

## Συνοπτικά:

### Η σπηλαιίνη-1:

- α) συνδέεται ισχυρά με τη **χοληστερόλη** και **γλυκοσφιγγολίδια**
- β) αποκτά **παλμιτικές** ομάδες
- γ) **αρκεί** για σχηματισμό μικροσπηλαίων (vs. -2) (σε συγκεκριμένες ποσότητες...)

⇒ οι ΛΣχ ΠΜ και Golgi ισχυροποιούνται από τον **ολιγομερισμό** της σπηλαιίνης

⇒ Βασική μονάδα: **16μερές** (**oligomerization domain** (aa61–101))

⇒ Ο ολιγομερισμός σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-λιπίδια

Ο σχηματισμός μικροσπηλαίων ξεκινάει στη συσκευή Golgi με το σχηματισμό περιοχών πλούσιων σε χοληστερόλη/γλυκοσφιγγολίδια/SM στις οποίες ενσωματώνονται η σπηλαιίνη-1 και άλλες πρωτεΐνες. Ακολουθεί μετακίνηση στην ΠΜ

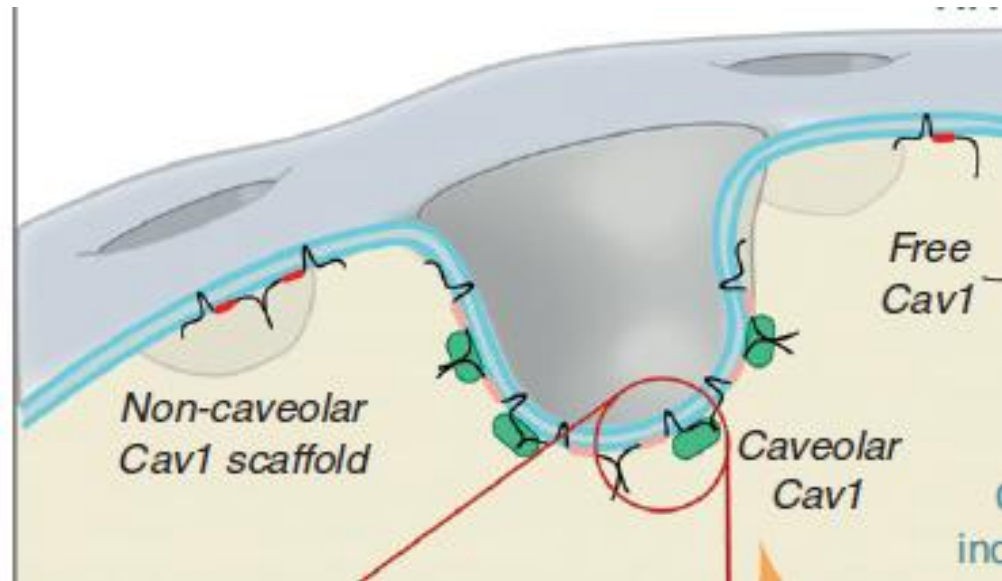
Τα μικροσπήλαια σταθεροποιούνται από τον ολιγομερισμό σπηλαιίνης-1 (Η σπηλαιίνη-2 χρειάζεται την -1 για ενσωμάτωση στα μικροσπήλαια) και μιας ομάδας βοηθητικών δομικών πρωτεϊνών της οικογένειας της φλοτιλλίνης.

**Λιπιδιακό περιβάλλον:** τουλάχιστον **40% χοληστερόλη** για να σχηματιστούν σταθερά μικροσπήλαια

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

There are **caveolin-1 scaffolds** structurally and functionally **distinct from caveolae**

1. caveolar Caveolin 1
2. Non-caveolar caveolin-1 **scaffolds** (low expression of caveolin-1-stable oligomerized caveolin 1 microdomains-15 molecules)
3. Single caveolin-1 molecules



*P. Nassoy and C. Lamaze. Stressing caveolae new role in cell mechanics.  
Trends in Cell Biology 22(7):381; 2012*

# Σπηλαιίνες (Caveolins)

role of **non-caveolar Caveolin-1**???

**Cavin-1** association with **Caveolin 1** is required for assembling caveolae. **WHY???**

Model organisms like *Caenorhabditis elegans* and cells like **leukocytes** or **neurons**, express **caveolins** (and/or caveolin 1-interacting proteins) but are **unable to form caveolae invaginations**

**These data support a model in which:**

**caveolins** might play a **role outside of caveolae**

**non-caveolar** and **caveolar** caveolin-1 have **distinct functions**

# Cavins

recently identified family of **four cytosolic proteins** with related function and sequence homology-MW 31–47 kDa

**interact with caveolin 1**

constitute large, **heteroligomeric complexes** that associate with and **stabilize** assembled **caveolar scaffolds** at the PM

Under-expression of Cavins leads to **caveolar disassembly** and **caveolin 1 degradation**

# Cavins

## adapter proteins

cavin-1 (polymerase transcript release factor, PTRF)-expressed in **muscle** and **non-muscle** tissues

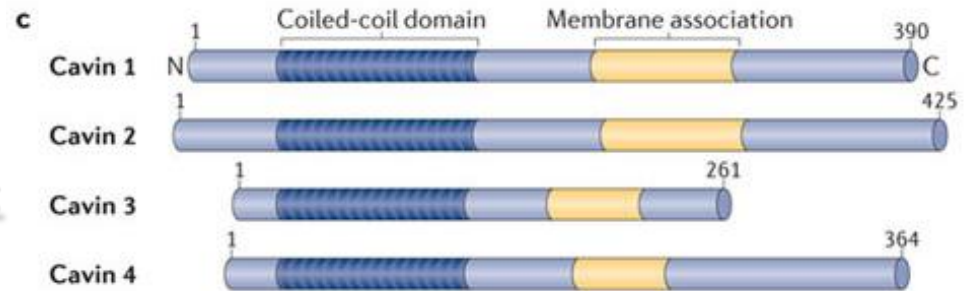
cavin-2 (serum deprivation protein response, SDPR)

cavin-3 (srd-related gene product that binds to c-kinase, SRBC)

cavin-4 (**muscle-restricted** coiled-coil protein, MURC)

important in regulating:

1. **caveolin expression**
2. **caveolar morphology**
3. **and probably caveolae-dependent signaling pathways**



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

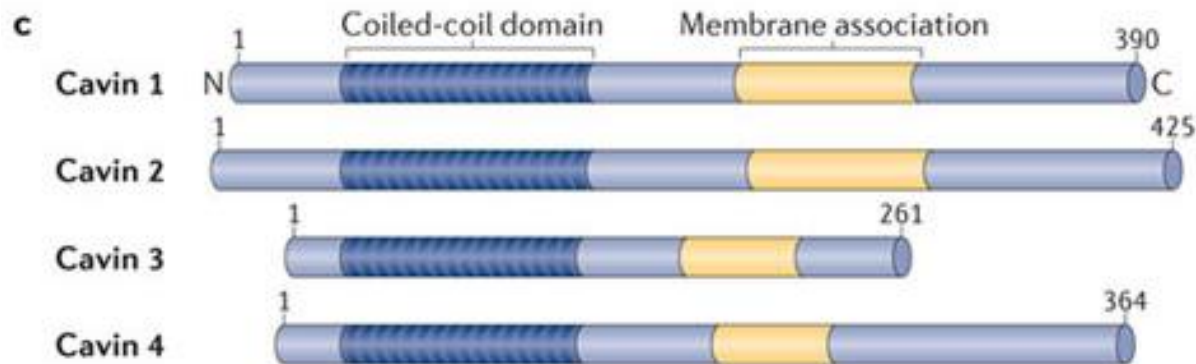
1. **Hetero**-oligomers of the **caveolar coat proteins, Caveolin 1 and -2** and **homo**-oligomers of Caveolin-1 crossing the inner leaflet of plasma membrane are responsible for creating a structure or **backbone of caveolae**.

2. The **adapter proteins** of caveolae, **cavins** provide the **scaffold**, determine **shape**, and regulate **internalization/budding of caveolae**

# Cavins

Κοινές ιδιότητες:

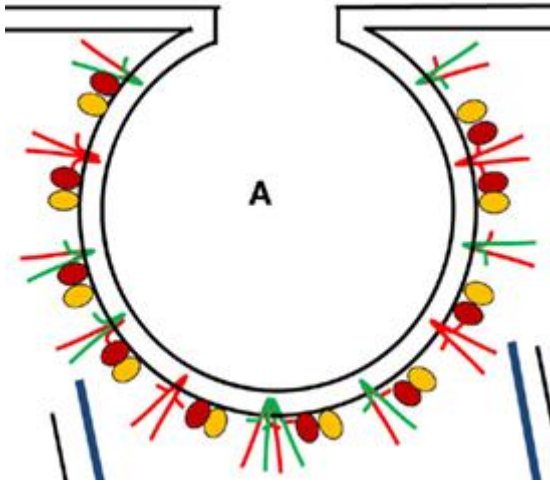
- ❑ **Domains**: protein-protein interactions  
targeting proteins towards **proteolytic degradation** (PEST domains)
- ❑ **Phosphorylated** on multiple sites
- ❑ Binding to **PS** (like caveolins...)





# Cavins

## Cavin-1: a new scaffold for caveolae



Cavin-1 is a **soluble** protein which is **recruited** to caveolae by caveolins as a scaffold **stabilizing** the caveolae unit

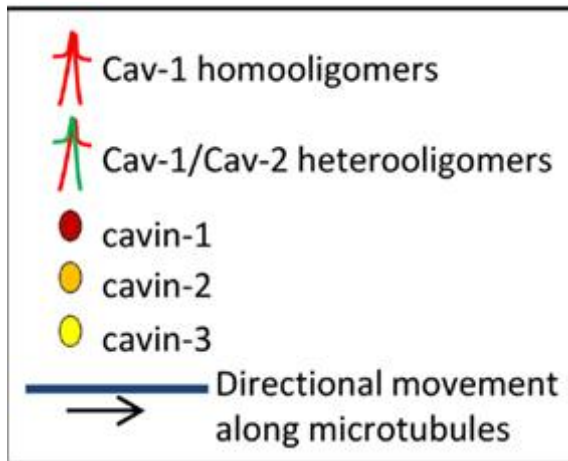
Nuclear localization signals-**Transcription factor**

Required for caveolae formation (caveolae marker?)

Absence of cavin-1: loss of morphologically distinct **caveolae**, reduced protein expression and stability of all 3 **caveolins** (no alteration in mRNA levels), increased mobility of **caveolin-1** (released from PM-internalization-degradation)

Cavin-1: associated with PM caveolae-NOT with non-caveolar caveolins. 1:1 in caveolae with caveolin-1 (cholesterol-dependent manner)

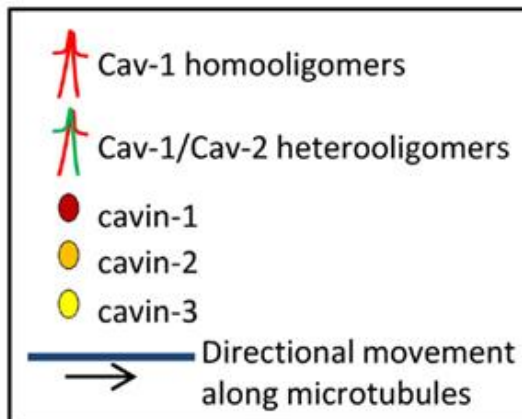
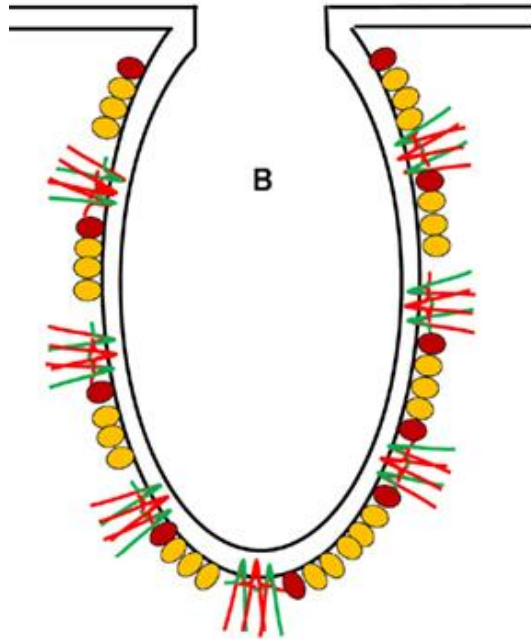
Cavin-2 and cavin-1 interact with each other



(Sowa G. *Frontiers in Physiology* 2012; Briand et al., *Biochimie* 93:71, 2011)

# Cavins

**Cavin-2: generating caveolae curvature?**



**Cavin-2** promotes **recruitment of cavin-1** to caveolae

**cavin-2 downregulation**: loss of cavin-1 and caveolin expression- limits caveolae formation  $\Rightarrow$  **cavin-1, cavin-2 and caveolin-1 are functionally inter-dependent**

**Cavin-2** is thought to be a necessary component for inducing **membrane-curvature** of caveolae – the membrane-curvature component of caveolae

**Overexpression of cavin-2**: **elongated caveolar morphology**

*(Sowa G. Frontiers in Physiology 2012)*

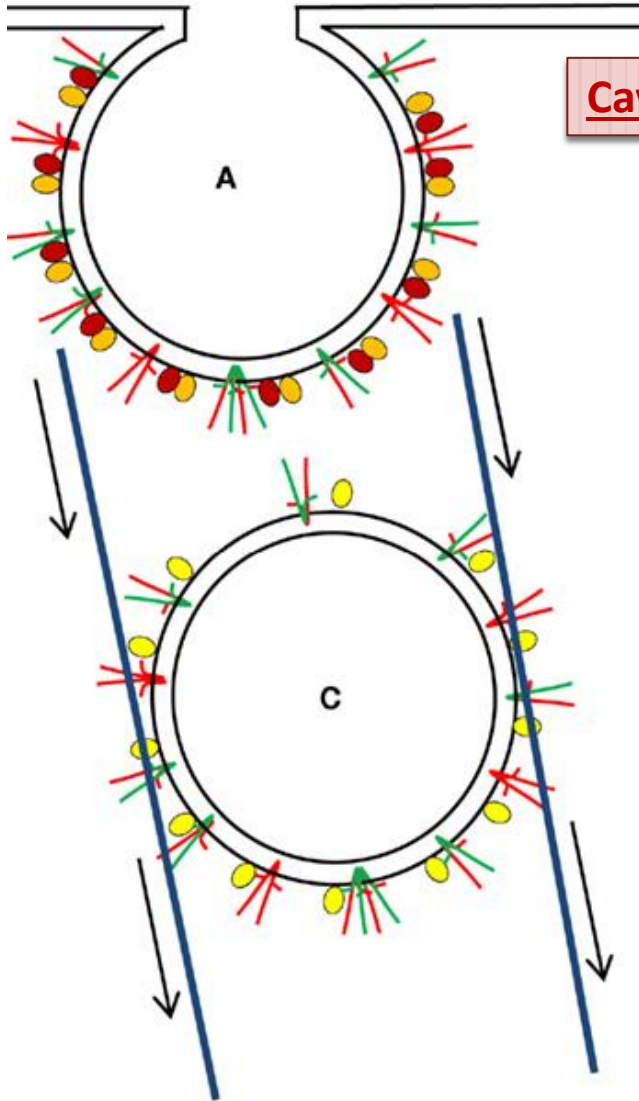
# Cavins

**Cavin-3: regulator of the caveolar endocytic pathway?**

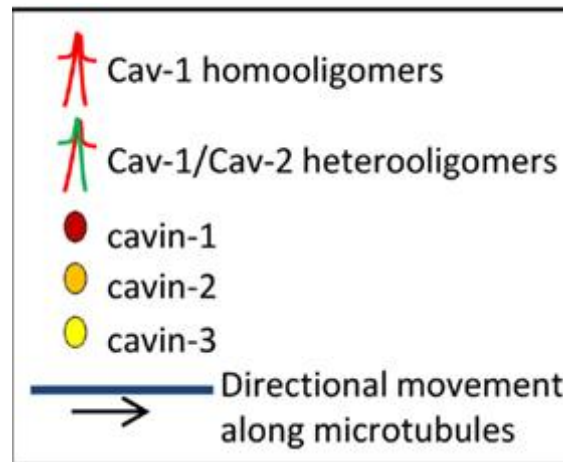
**Cavin-3** associates with **Caveolin-1** upon caveolae **internalization** to form **vesicles** and its absence markedly reduces intracellular Cav-1 traffic along **microtubules**.

involved in coupling caveolae to the **intracellular transport machinery**

The human **CAVIN3 gene** is situated in a tumor suppressor region and is **inactivated in breast and lungs cancers**



(Sowa G. *Frontiers in Physiology* 2012)



# Cavins

Cavin-4: the muscle-restricted cavin

Cavin-4: specific expression in cardiac and muscle tissues (parallels caveolin-3 expression)

Important in **muscle biogenesis**, associated with **cardiac dysfunction**

New potential candidate for muscle-related caveolinopathies

Interacts with cavin-2

all cavin members have been identified to localize to PM caveolae

# Cavins

## The cavin oligomeric complex

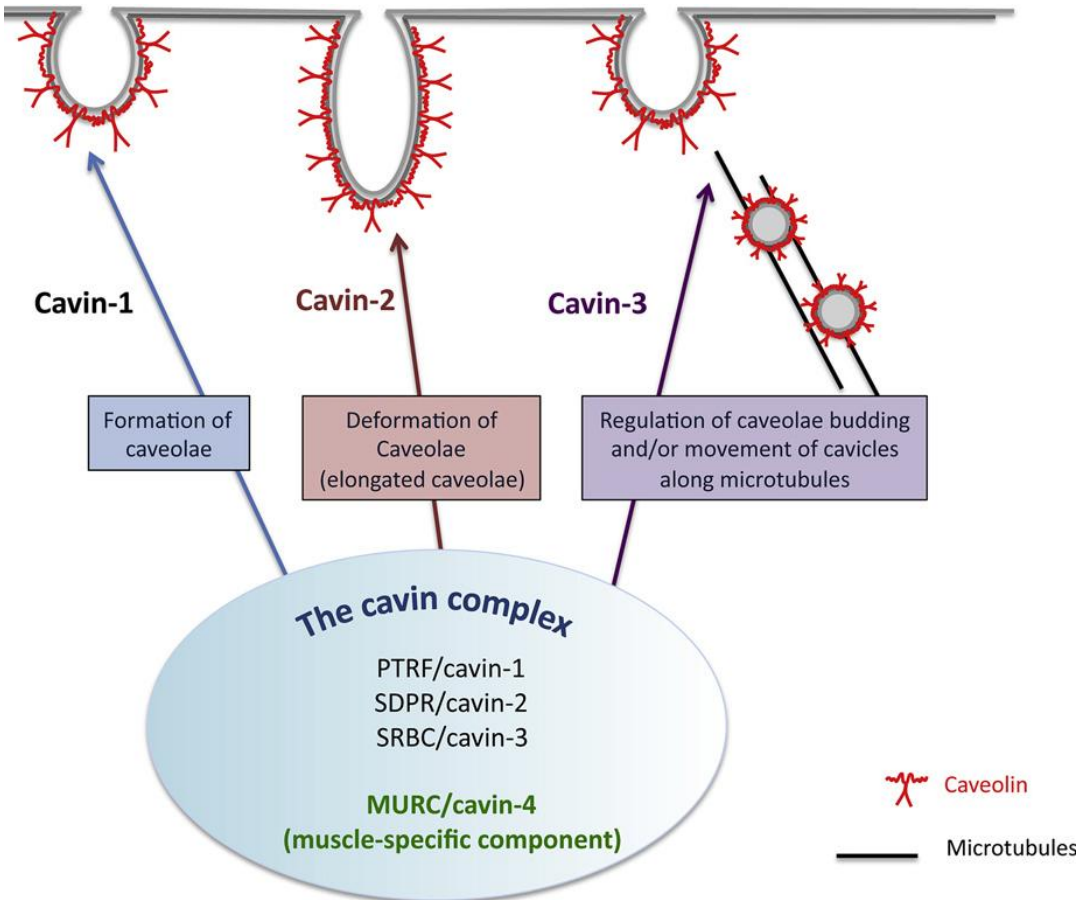
**Multimeric protein complex** containing **all cavin members**: detected in **PM** and **cytosol**  
In PM: associates with caveolins

**Model:** pre-assembled complexes of cavin proteins in the cytosol are recruited to PM caveolae (PS binding in common with caveolins??)

the presence of the **cavin complex** might serve as an **adapter platform** for mediating or regulating many signaling pathways in caveolae

# Cavins

Overexpression of individual cavin members alters caveolae biogenesis, morphology or dynamics suggesting that the stoichiometry between cavins could determine the functionality of caveolae



Cavin-1 is recruited by **caveolins** to PM caveolar domains and is required for caveolae **formation**.

Cavin-2 alone does not increase caveolae number but induces changes in caveolae **morphology**.

Cavin-3 still associates with caveolin upon caveolae budding to form **vesicles** and its absence markedly impairs intracellular caveolin-1 **traffic** along microtubules



# Cavins

interdependency between caveolins and cavins for their respective **expression**:

- **caveolin-1 null mice** ⇒ drastically reduced levels of cavin expression
- **Cavin deletion** ⇒ reduced caveolin-1 protein expression.

in cells with cavins, caveolins induce **caveola formation** efficiently (caveolins are sequestered into caveolae).

expression of caveolins in cells lacking cavins results in a large **pool of non-caveolar caveolin**

in the absence of cavins or if the **ratio of caveolin to cavin is high** caveolin can be targeted through non-caveolar pathways to endosomes and then lysosomes

The importance of such a mechanism is illustrated by the disrupted relationship between caveolae and caveolins in prostate cancer<sub>r</sub>

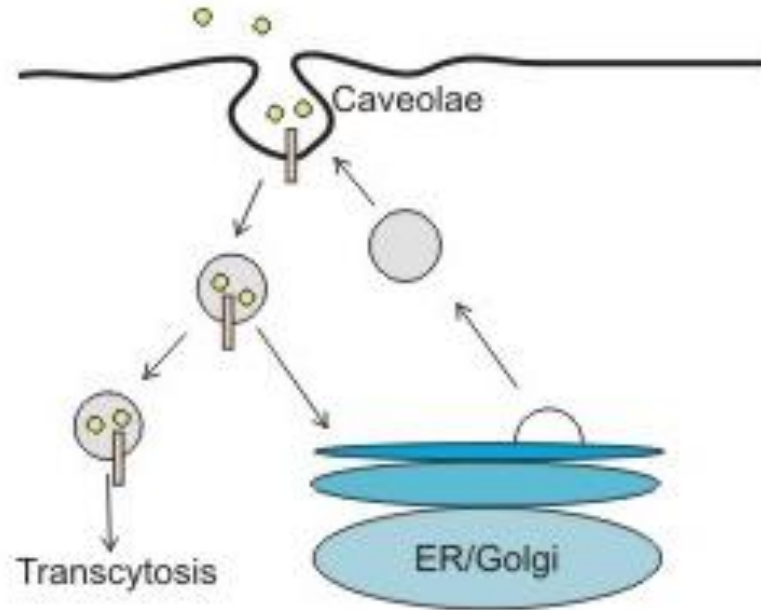
# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

- 1. Εσωτερίκευση (endo- and transcytosis)**
- 2. Μεταγωγή σήματος**
- 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης**
- 4. Ασθένειες-Ογκογένεση (pathogen entry)**

knockout mouse and small interfering RNA approaches

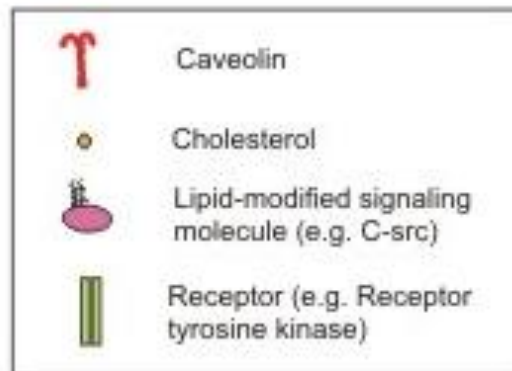
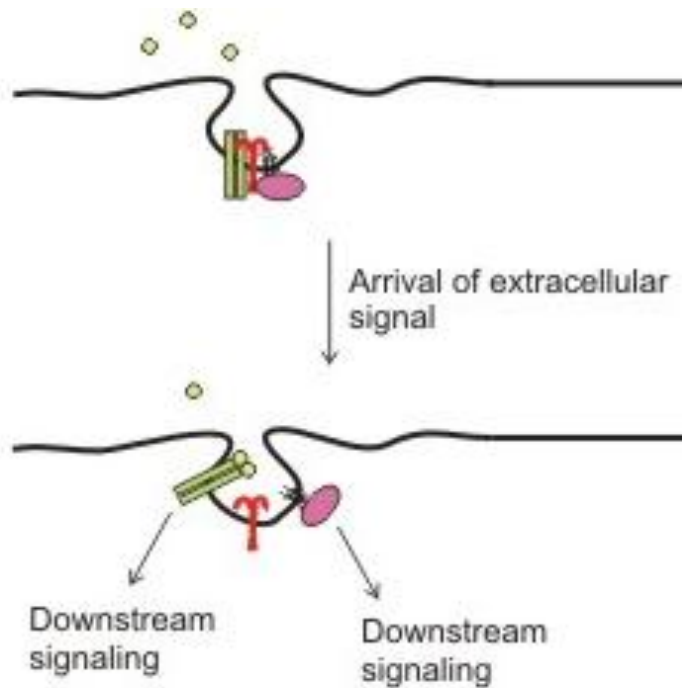
**ΠΟΛΥΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ:** λειτουργίες που διαφέρουν ανάλογα με κυτταρικό τύπο και κυτταρικές ανάγκες

1



Certain molecules have been shown to be predominantly **endocytosed** via **caveolae** and **not clathrin-coated vesicles**.

Depending on the cell type, caveolae can deliver their contents to the **ER/Golgi** compartments or to the **abluminal side of a cell**.



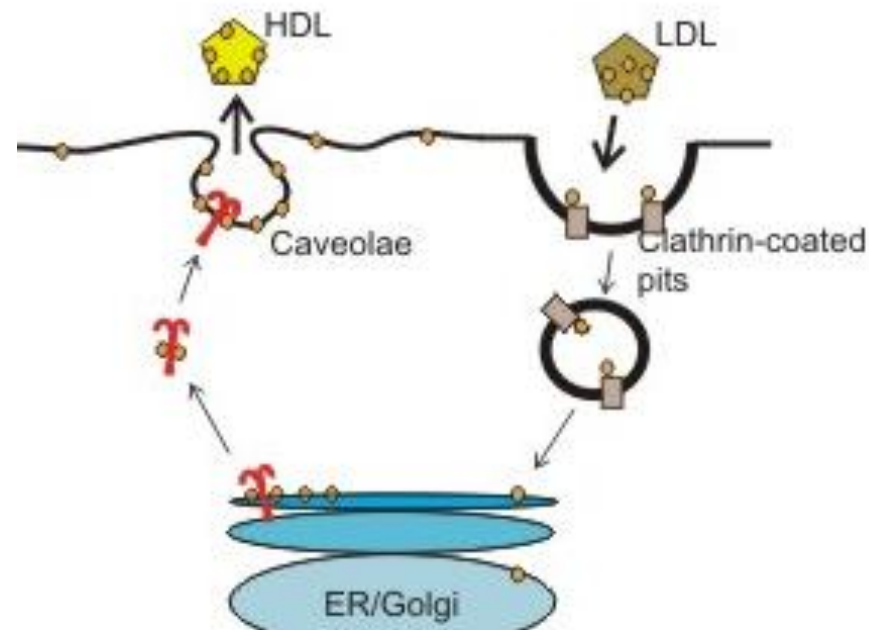
## 2

**Caveolae** are now thought to act as **signalosomes**, or entities in which **signal transduction** events can take place efficiently.

A **higher level of regulatory complexity** is provided by the caveolins where signaling molecules can be bound until extracellular ligands relieve them of inhibition.

Here, the dynamic regulation of a receptor tyrosine kinase (e.g. EGF receptor) and a lipid-modified kinase (e.g. the src-tyrosine kinase) in caveolae are shown.

3



**Intracellular cholesterol** is thought to be **transported to plasma membrane** caveolae via a golgi-independent **caveolin-mediated route**.

Caveolae then can deliver the membrane **cholesterol** to the bulk **plasma membrane** or to cholesterol-transporters such as HDL particles

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

Caveolae have now emerged as **vital plasma membrane sensors** that can respond to **plasma membrane stresses** and **remodel the extracellular environment**

4

*Parton RG, del Pozo MA*

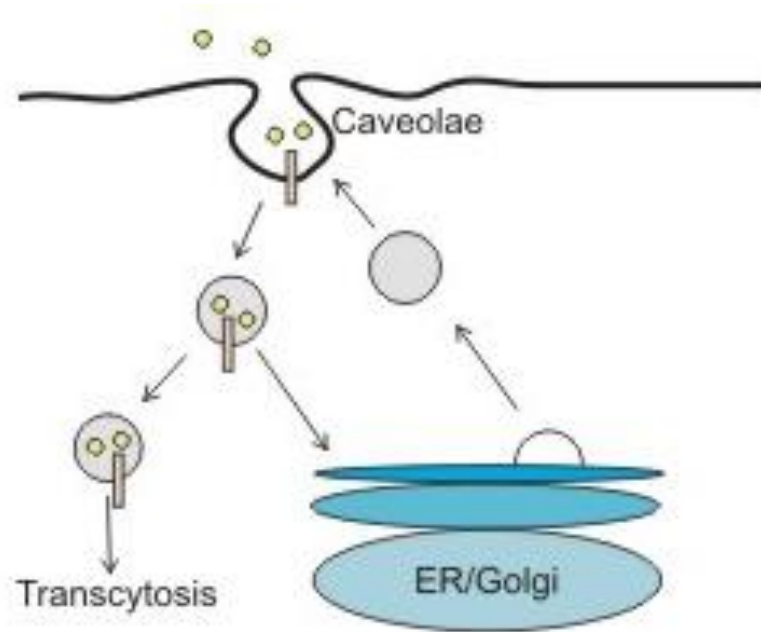
*Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers.  
Nat Rev Mol Cell Biol. 14(2):98-112; 2013*

caveolae seem to be directly involved in the **cell response to mechanical stress**:  
primary cell response to an acute mechanical stress occurs through the rapid  
**flattening** of caveolae into the plasma membrane

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

1





# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

### □ Διακυττάρωση

□ Ανεξάρτητη από κλαθρίνη ενδοκύτωση (σφιγγολιπίδια/τοξίνες, GPI-proteins, ιοί, βακτήρια)

Εκλεκτική πρόσληψη μέσω μικροσπηλαίων:  
υποδοχέας φολικού οξέος, τοξίνη χολέρας,  
τοξίνη τετάνου, αλκαλική φωσφατάση

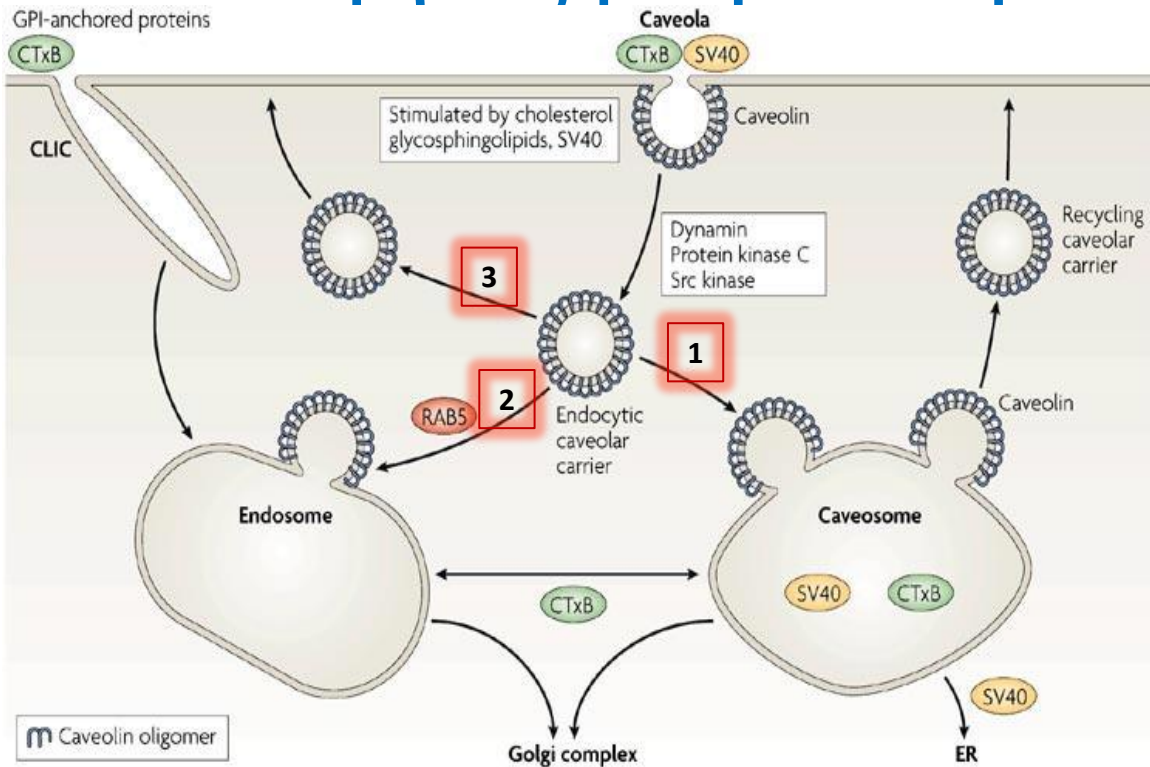
SV40, E.coli: προσλαμβάνονται από Υ που  
βρίσκονται στα μικροσπήλαια  
(μικροσπηλαιοσώματα)

Ενδοκύτωση διαμέσου μικροσπηλαίων/ΛΣχ:

1. Δεν εξαρτάται από κλαθρίνη
2. Ευαίσθητη στη συγκέντρωση χοληστερόλης (ρυθμίζεται από σπηλαιίνη)
3. Εξαρτάται από τη δυναμίνη
4. Κυστίδια συγκεκριμένης μορφολογίας/λιπιδιακής σύστασης
5. Ενεργοποιείται από γεγονότα μεταγωγής σήματος (στα κύτταρα που εκφράζουν σπηλαιίνη)

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Caveolae** carrying cholera-toxin-binding subunit (**CTxB**) and **SV40** can bud into the cell in a process that is regulated by **dynamin**, **PKC** and **Tyr kinases** (eg. Src kinases).

**Endocytic caveolar carriers** fuse with

1. the **caveosome or**
2. the **early endosome**
3. back to the **PM**

**Caveosomes:** non-endosomal (???), non-Lys compartment

From the **caveosome**, **SV40** is transported to the **ER** and recycling endocytic caveolar carriers carry caveolin back to the **PM**.

**CTxB** is transported to the **Golgi complex**, possibly through early endosomes.

**In cells with or without caveolae** there is at least one other main endocytic pathway that involves **clathrin- (and caveolin)-independent carriers (CLICs)**, which can endocytose the same surface markers into endosomes. **GPI-anchored proteins** are predominantly internalized through this pathway

# Caveosomes

ΔΕΝ είναι αρχικά ενδοσώματα (??????):

Ουδέτερο pH

Σπηλαιίνη-1

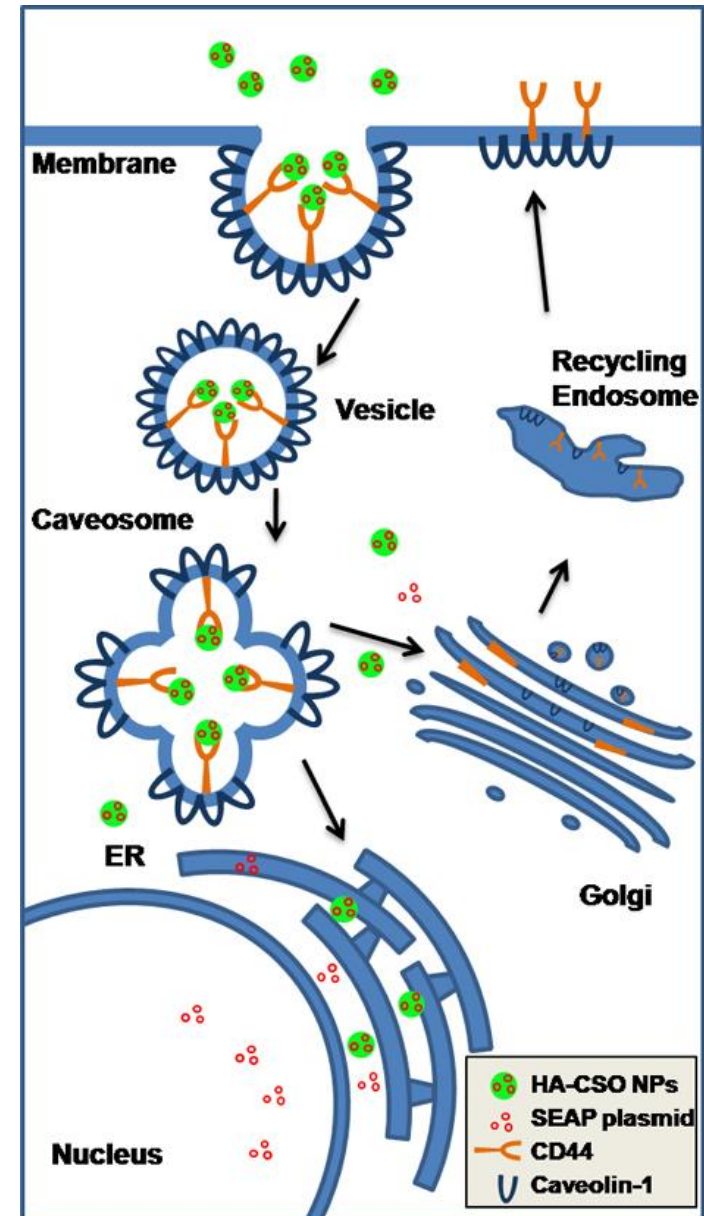
Χωρίς δείκτες early endosomal antigen 1 (EEA1) and transferrin receptor

Μικροσπηλαισώματα: σταθμός σύντηξης μικροσπηλαίων που έχουν αποκοπεί από την ΠΜ ή θέση διαλογής??

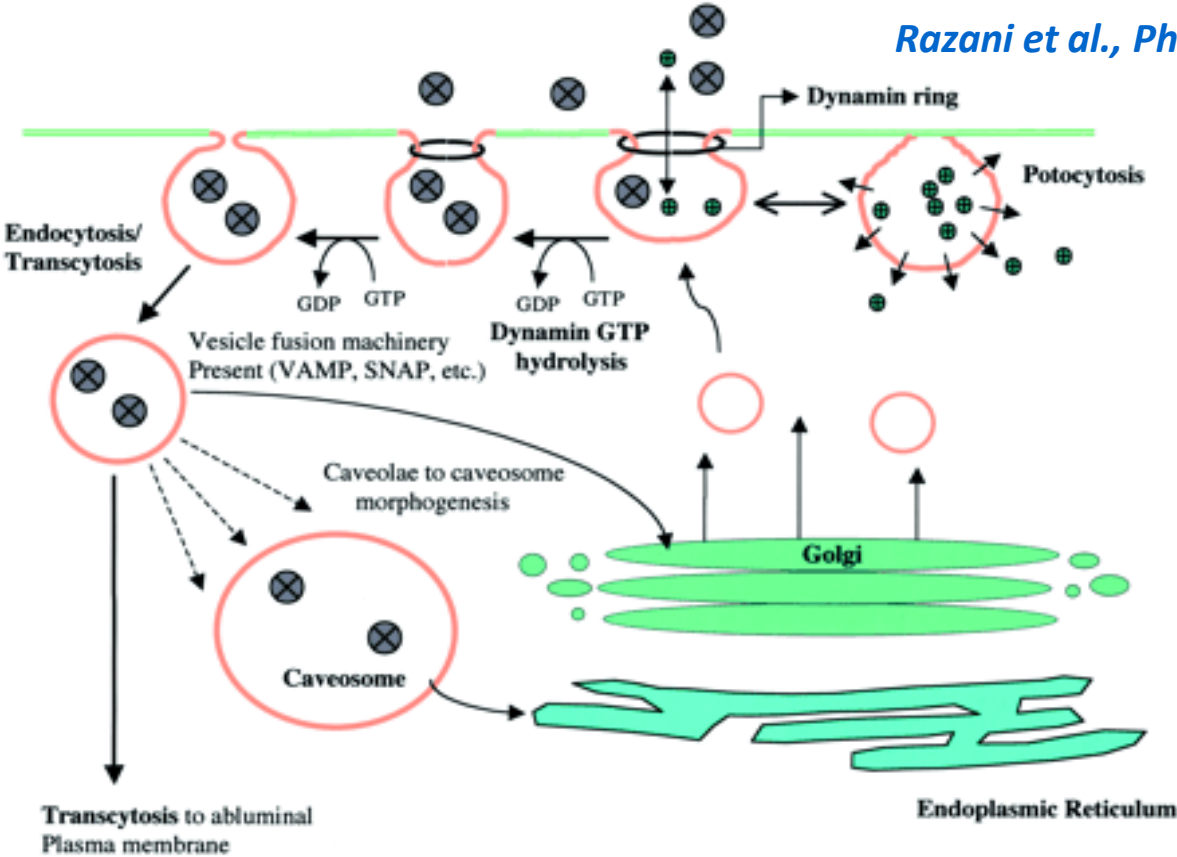
“caveosomes” previously described as independent organelles distinct from endosomes, actually correspond to **late endosomal compartments** modified by the accumulation of **overexpressed CAV1 awaiting degradation**.

*Hayer et al., J Cell Biology 191(3):615-629, 2010*

## 1. Εσωτερίκευση



## 1. Εσωτερίκευση



### Caveole vesicular trafficking

Caveolae mediate the selective uptake and transport of several molecules via [transcytosis](#), [endocytosis](#), and [potocytosis](#)

[Transcytosis](#): transport of proteins from the one side of the cell (eg. endothelial) to the other.

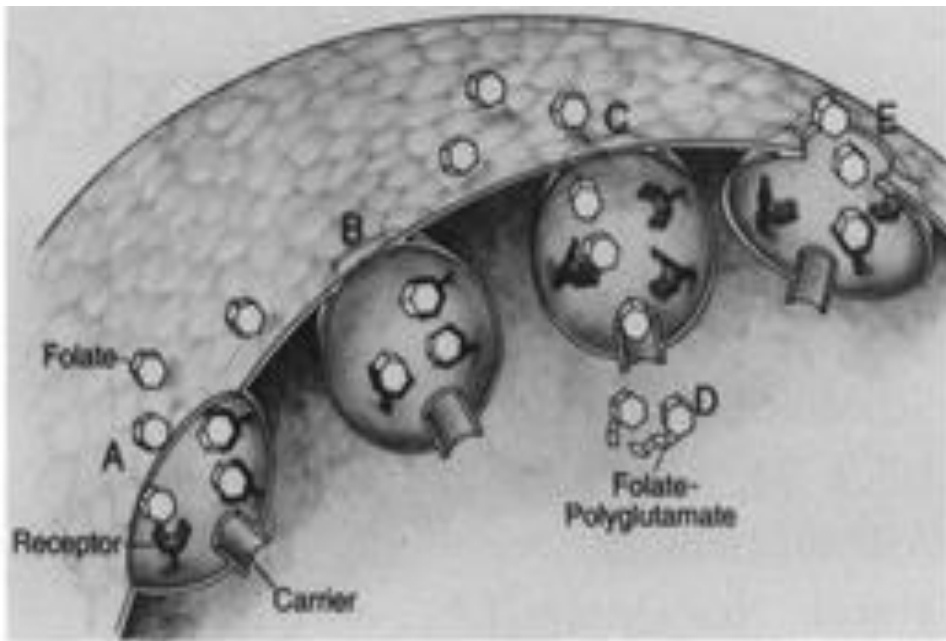
[Caveolae-mediated endocytosis](#): (distinct from that of clathrin-coated pits), caveolae bud off from the PM and fuse with various intracellular compartments. Possible transport routes include the [caveolae-caveosome-ER pathway](#).

[Potocytosis](#): caveolae mediate the uptake of small solutes (<1 kDa) by pinching off but remaining associated with the plasma membrane.

Classic vesicular transport molecular machinery **requirements**: [dynamamin](#), [VAMP](#), [SNAP-25](#), the [SNARE](#) complex, and [GTP hydrolysis](#)

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση



**Fig. 1.** A model for receptor-mediated potocytosis of folate. Caveolae contain receptors that bind folate when the compartment is open (A). The caveola closes and possibly detaches from the membrane (B), and a proton gradient is generated that causes the folate to dissociate from the receptor (C). The high concentration of folate generated in the caveola space creates a gradient that favors movement across the membrane by an anion carrier. The folate is polyglutamated in the cytoplasm to retain the vitamin within the cell (D). The caveola reopens to initiate another round of folate uptake (E).

Εκλεκτική πρόσληψη μέσω μικροσπηλαίων και ποτοκυττάρωση: υποδοχέας φολικού οξέος

**Potocytosis:**

- Ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση  $\gamma$
- Μικρά μόρια (πχ. βιταμίνες, ιόντα) μεταφέρονται διαμέσου των μικροσπηλαίων της ΠΜ απευθείας στο cyt
- Τα μικροσπήλαια παραμένουν συνδεδεμένα με την ΠΜ κατά τη μεταφορά των μορίων



## 1. Εσωτερίκευση

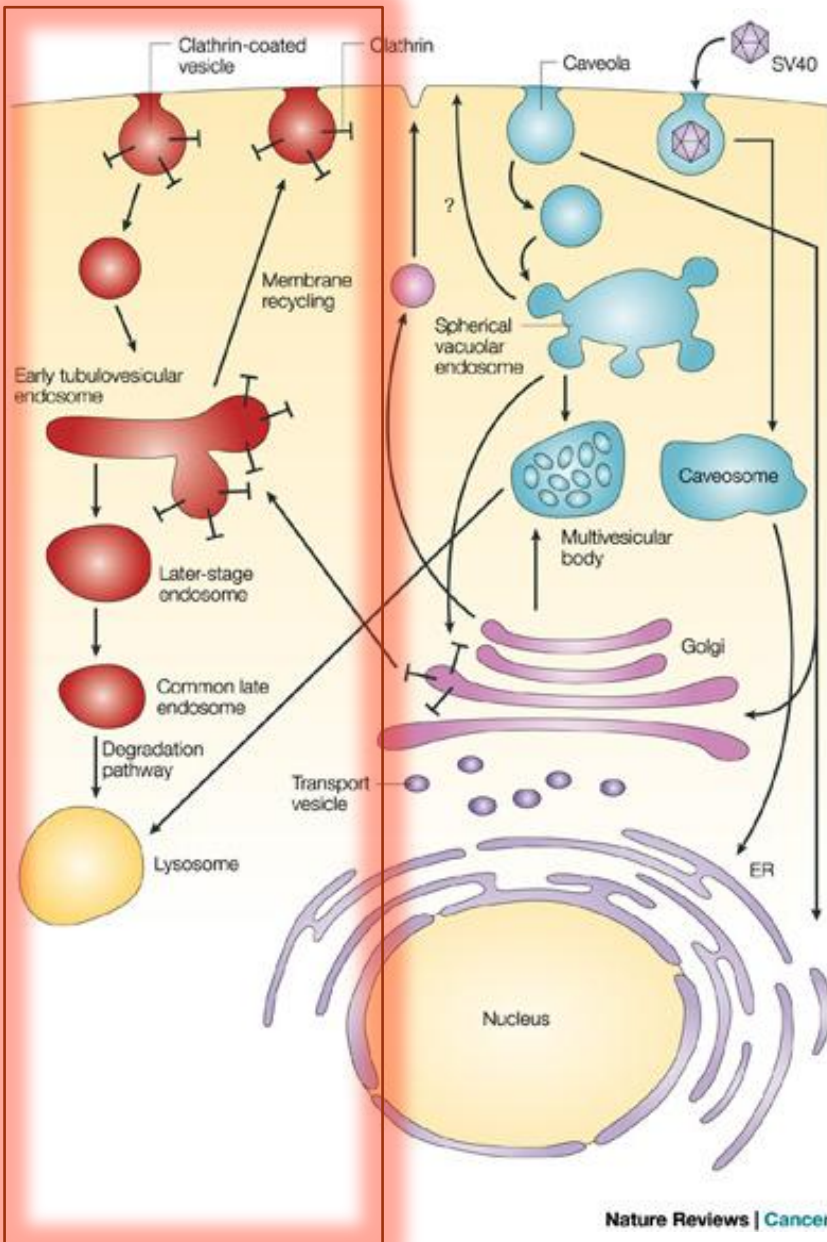
### caveolae vesicular endocytic pathway vs. clathrin-coated vesicle pathway

#### Endocytosis carried out by clathrin-coated pits:

✓ after **budding** from the PM the vesicle **sheds its clathrin coat** before delivering its protein cargo to tubular endosomes that are marked by **early endosomal antigen 1 (EEA1)** and **transferrin receptor (TfR)**.

✓ In this acidic environment, **ligands** are dissociated from their **receptors** and **protein sorting** occurs to determine the subsequent intracellular route of the internalized vesicular contents.

✓ The proteins might be recycled back to the **PM** or can be transported to **Lys** via the late endosomes for degradation.



## 1. Εσωτερίκευση

### caveolae vesicular endocytic pathway vs. clathrin-coated vesicle pathway

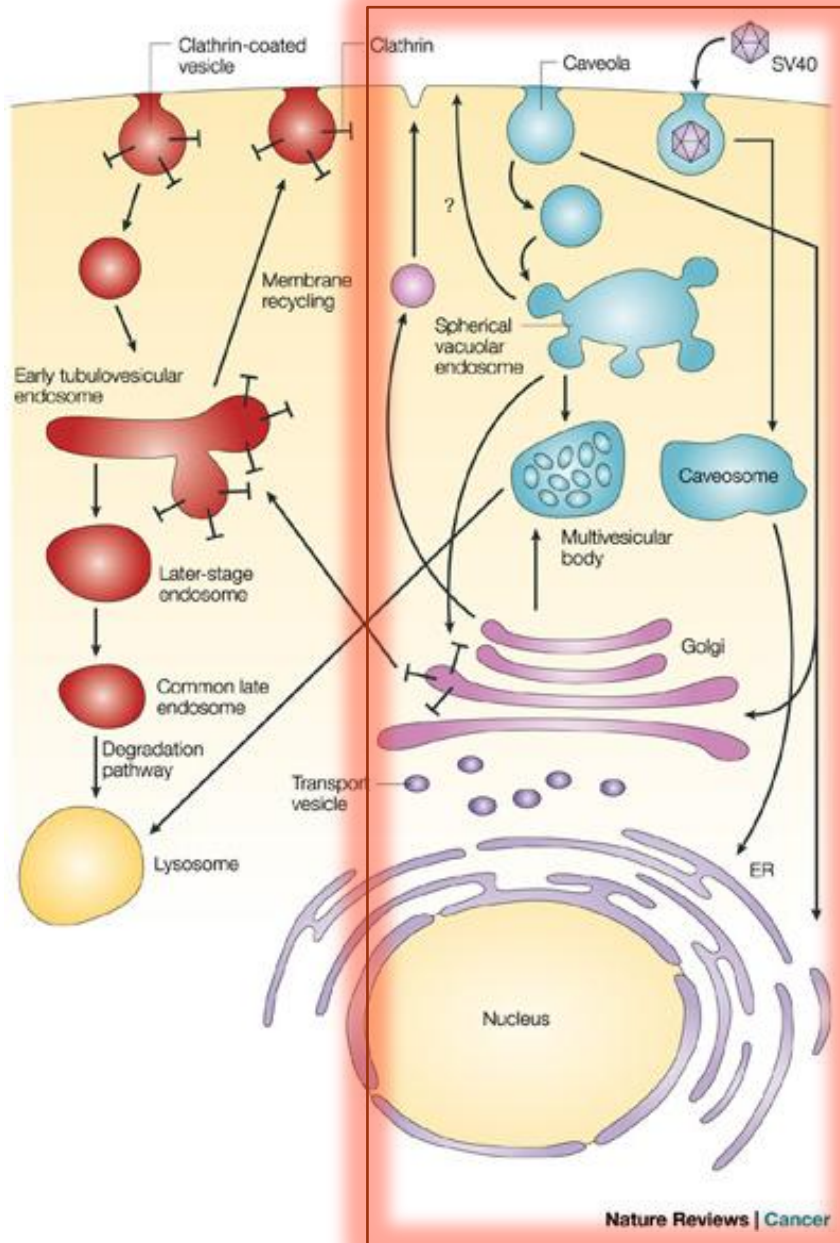
#### caveolin-coated vesicles machinery:

Within **15–30 minutes**, caveolar cargo can be delivered to distinctive **spherical vacuolar endosomal-like compartments** (TfR-negative) for ultimate delivery to late endosomes and, presumably, **lysosomes** for degradation.

Viruses such as **SV40** are internalized by caveolae using a **slower** mechanism (2–3 hours) to EEA1-negative, TfR-negative compartments called **caveosomes**, then are subsequently transported to the ER

Caveolae could traffic **directly** to the **ER** or **Golgi**

Caveolin-1 is transported from the **Golgi** to the **PM**.





# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

Διαφορετικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια στόχευσης συνδετών:

- Ετερογένεια ΛΣχ στην ΠΜ
- Προσέλκυση μορίων στα μικροσπήλαια/ΛΣχ
- Απομόνωση/διαλογή λιπιδίων- πρωτεϊνών σε διαφορετικές περιοχές
- Λειτουργικό διαχωρισμό πρωτεϊνών και λιπιδίων (ΛΣχ-associated) σε διαφορετικά **κυστίδια**

Στο **cyt** και στις **μεμβράνες** μικροσπηλαίων υπάρχουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία μηχανισμού αποκοπής και σύντηξης κυστιδίων: δυναμίνη, SNARES κλπ

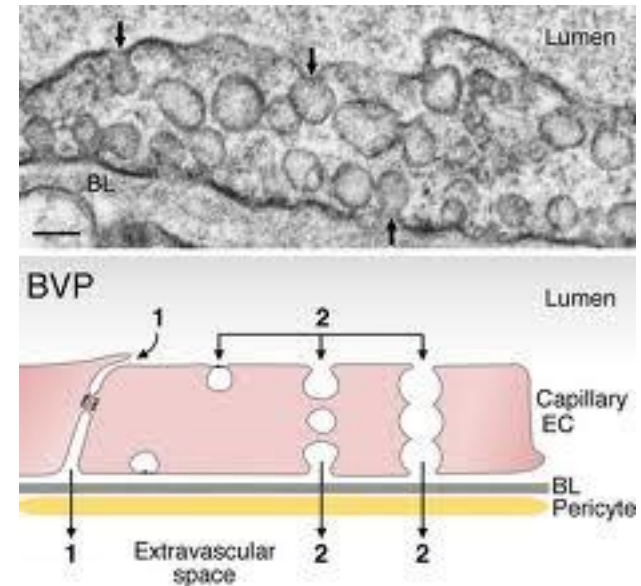
# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

### Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα μικροσπήλαια σχηματίζουν **παροδικά κανάλια διαμέσου του cyt**

**Διακυττάρωση** μέσω ελεγχόμενης ημι-αποκοπής και σύντηξης **χωρίς ποτέ να αποκόπτονται από τη μεμβράνη** και να σχηματίζουν πραγματικά κυστίδια



# Ορισμός και Μορφολογία

Originally regarded as **fixation artifacts** of electron microscopy

Identified in the **1950s** by electron microscopists (Eichi **Yamada** and George **Palade**) investigating cellular ultrastructure, caveolae appear as “**smooth**” **uncoated pits or vesicles** at the PM, typically observed using conventional resin-embedded techniques

## Morphological variants of caveolae:

### 2. Trancellular channel

3. Traditional caveolae

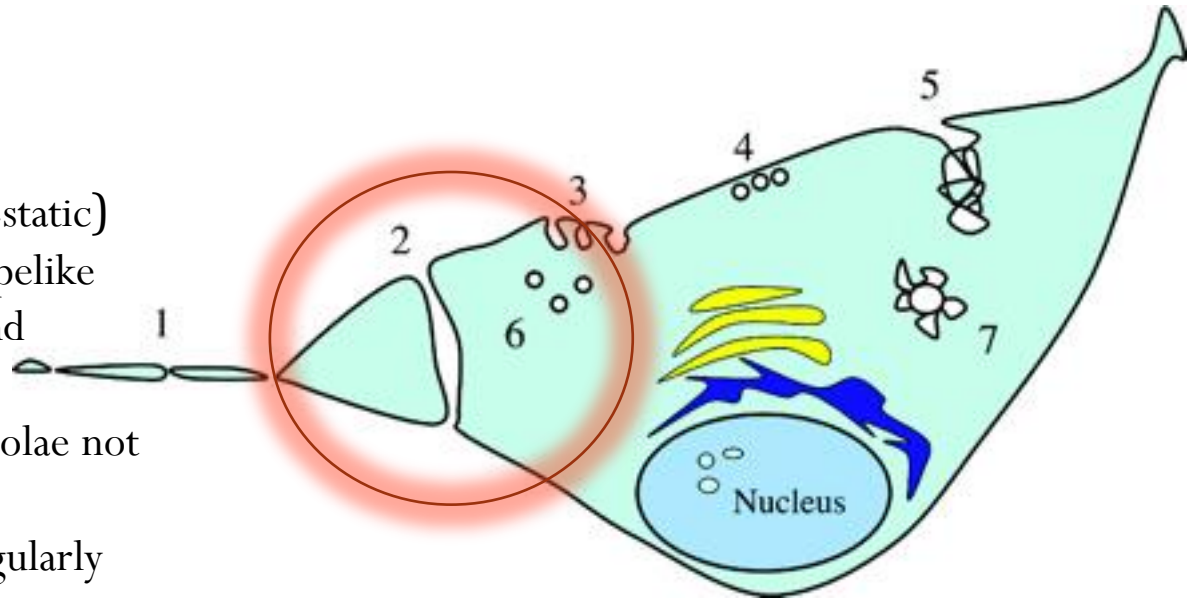
4. PM vesicles (πλήρως εγκολπωμένα-static)

5. vesiculo-vacuolar organelle (a grapelike cluster of interconnected caveolae and vacuoles)

6) cavicles (mobile, internalized caveolae not associated with the PM)

7) a caveosome (a slow moving, irregularly shaped, cytoplasmic organelle)

Golgi, dark blue; endoplasmic reticulum, yellow

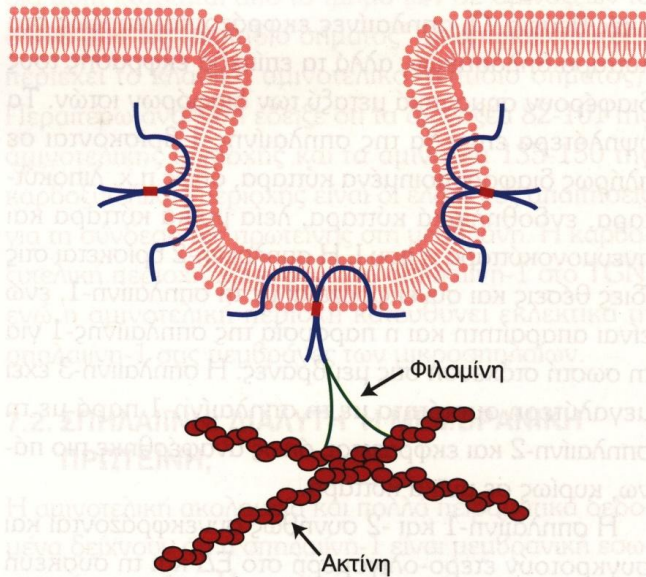


(Cohen et al., *Physiological Reviews* 84:1341, 2004)

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

**Συγκέντρωση μικροσπηλαίων:** σε περιοχές ΠΜ με μεγάλα ποσά **ακτίνης** στον κυτταρικό σκελετό



Εικόνα 2.7. Απεικόνιση της σχέσης μικροσπηλαίων-δικτύου ινιδίων ακτίνης, η σύνδεση των οποίων επιτυγχάνεται μέσω της φιλαμίνης. (Από van Deurs και συν., 2003).

Σύμπλοκο **σπηλαιίνης-φιλαμίνης:**

- Ρυθμίζει αλληλεπιδράσεις **μικροσπηλαίων με σκελετό**
- Ελέγχει **θέση** μικροσπηλαίων στην **ΠΜ ή στο Cyt**
- Ελέγχεται από **p-Tyr** της σπηλαιίνης

**Εσωτερίκευση μικροσπηλαίων** διευκολύνεται από:

- I. Διάσπαση δικτύου ινιδίων ακτίνης**
- II. Φωσφορυλίωση** (κινάσες ή αναστολείς φωσφατασών)
- III. Αλληλεπίδραση σπηλαιίνης με Y** μεταφερόμενης ουσίας

**Σύνδεση SV40 σε ΠΜ:** (\*) μεταγωγή σήματος **Tyr-Kinase**, διάσπαση δικτύου **ακτίνης**, προσέλκυση **δυναμίνης II** σε θέσεις εσωτερίκευσης

**Πρόσληψη αλβουμίνης:** αλληλεπίδραση **σπηλαιίνης με gp60 (Y)** (κύτταρα χωρίς σπηλαιίνη δεν προσλαμβάνουν αλβουμίνη)

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 1. Εσωτερίκευση

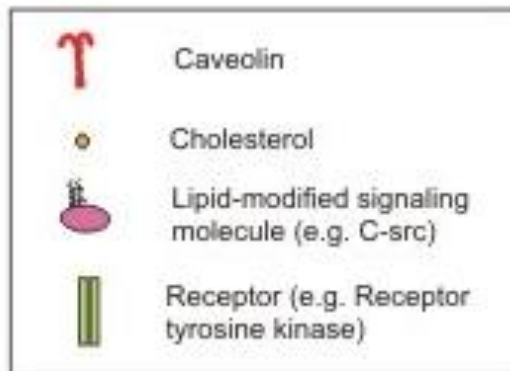
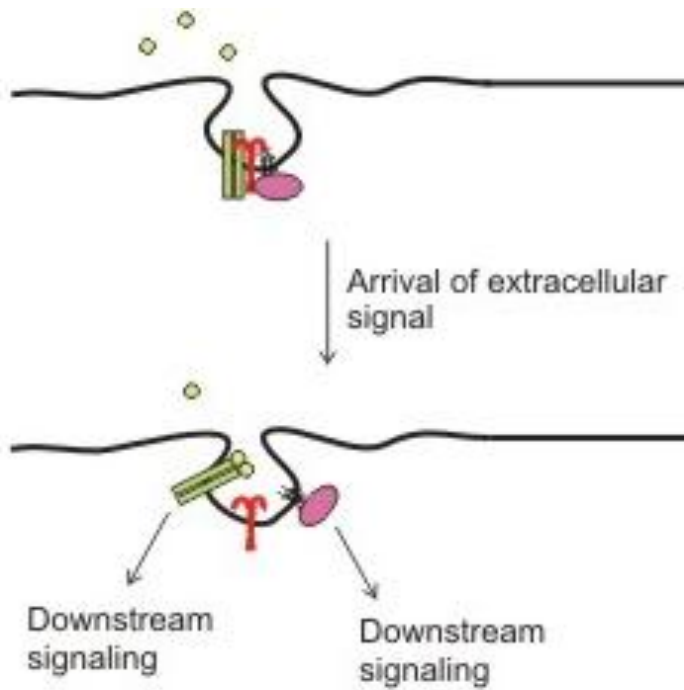
Ωστόσο: τα μικροσπήλαια **ΔΕΝ είναι κύριες θέσεις εσωτερίκευσης** μορίων (t1/2 σπηλαιίνης σε μικροσπήλαια)

Κυρίως **σταθερές** μεμβρανικές δομές με **δυναμικό εσωτερίκευσης** που ενεργοποιείται **ΜΟΝΟ** σε συγκεκριμένες **συνθήκες**

Η σπηλαιίνη **ΔΕΝ** δρα ως κύριος παράγοντας εγκόλπωσης της ΠΜ αλλά ως **σταθεροποιητής των μικροσπηλαίων στην ΠΜ μειώνοντας την ικανότητα ενδοκύτωσης τους**

**Caveolin-1 is a negative regulator of the budding of caveolar invaginations**, and caveolin-1-expressing stable cell surface caveolae can become **endocytosis-competent after specific signaling events**.

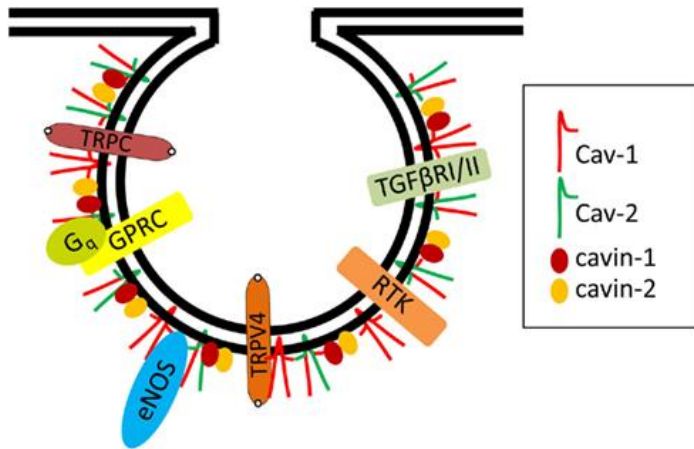
## 2. Μεταγωγή σήματος



2

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος



(Sowa G. *Frontiers in Physiology* 2012)

### Examples of **signaling proteins** localized in **endothelial cell caveolae**

Several signaling molecules were **localized** in endothelial caveolae and **interact with Cav-1** including: eNOS, RTK (e.g., VEGF Receptor 2), GPCR (e.g., Bradykinin Receptor 2, Endothelin Receptor, Muscarinic Receptor), heterotrimeric G protein subunits (e.g., G $\alpha$ ), TGF-beta Receptors I and II, calcium channels (e.g., TRPC1 and 4, TRPV4).

I. Περιέχουν μόρια μεταγωγής σήματος  
(**ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ**)

II. Δρουν ως **κέντρα οργάνωσης** μεταγωγής-  
διαμερισματοποίηση μονοπατιών

III. **Συγκέντρωση**  $\Rightarrow$  επικοινωνία  
μηχανισμός ρύθμισης

IV. Διαταραχή σπηλαιίνης  $\Rightarrow$  **Παθολογία**

**Εξειδικευμένα «οργανίδια» μεταγωγής σήματος**



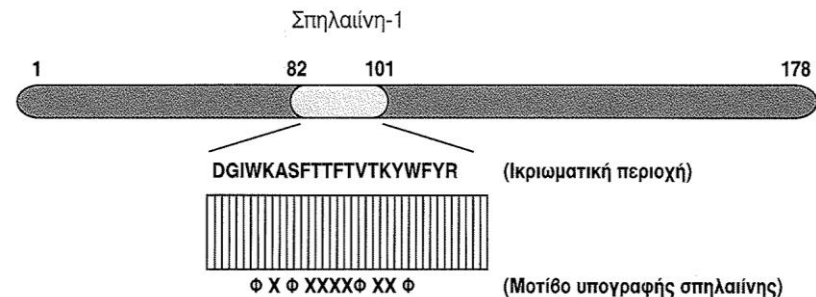
# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

**Εκλεκτική σύνδεση** πρωτεϊνών: (συχνά) **λιπιδιακές τροποποιήσεις** (μυριστικές, παλμιτικές, πρενυλικές ομάδες σε πρωτεΐνες)-**Select signalling molecules concentrate in caveolae**

**Αλληλεπίδραση σπηλαιίνης με μόρια μεταγωγής σήματος: σύνδεση KAI δραστικότητα:**

The signaling molecules are bound to the **caveolin scaffolding domain** of caveolin-1



□ **Caveolin scaffolding domain (CSD** βασικά/αρωματικά αα): recognizes a hydrophobic **caveolin-binding motif** present in most signaling molecules shown to interact with caveolin-1 -Άμεση δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τη μεμβράνη (**CBM**; ΦXXXXΦXXΦ and ΦΧΦXXXXΦ, where Φ represents an aromatic aa)

□ The **scaffolding domain** serves a **dual role**:

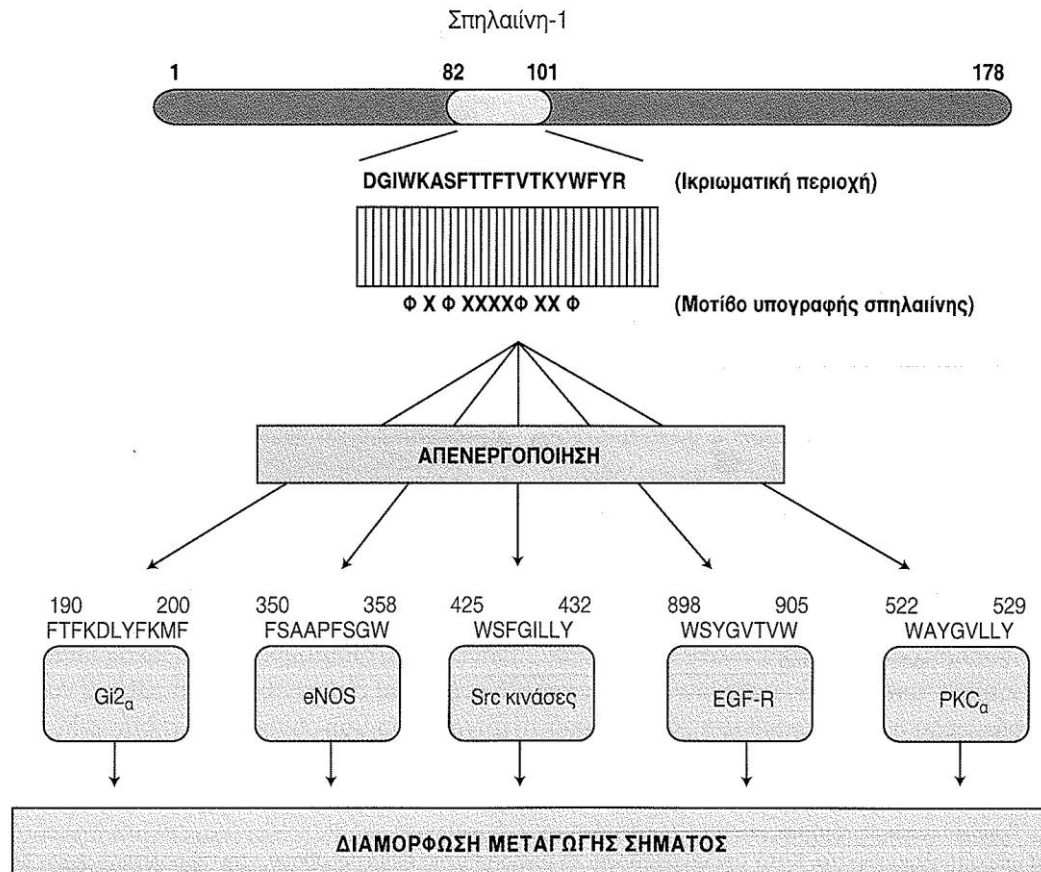
- (1) **anchor** holding various proteins within caveolae
- (2) **regulatory element** capable of either **inhibiting** or **enhancing** a given protein's **signaling activity** (H-Ras, κινάσες Tyr οικογένειας Src, PKC, eNOS, παρεμποδίζει υδρόλυση GTP των ετεροτριμερών πρωτεϊνών G κλπ)

CSD of **caveolin-1** and **-3**

CSD of **caveolin-2** is inactive

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος



**Εικόνα 2.15.** Αλληλεπιδράσεις της CSD με τις περιοχές αλληλεπίδρασης μορίων μεταγωγής σήματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζει τη μεταγωγή σήματος. (Από Razani και συν., 2002).

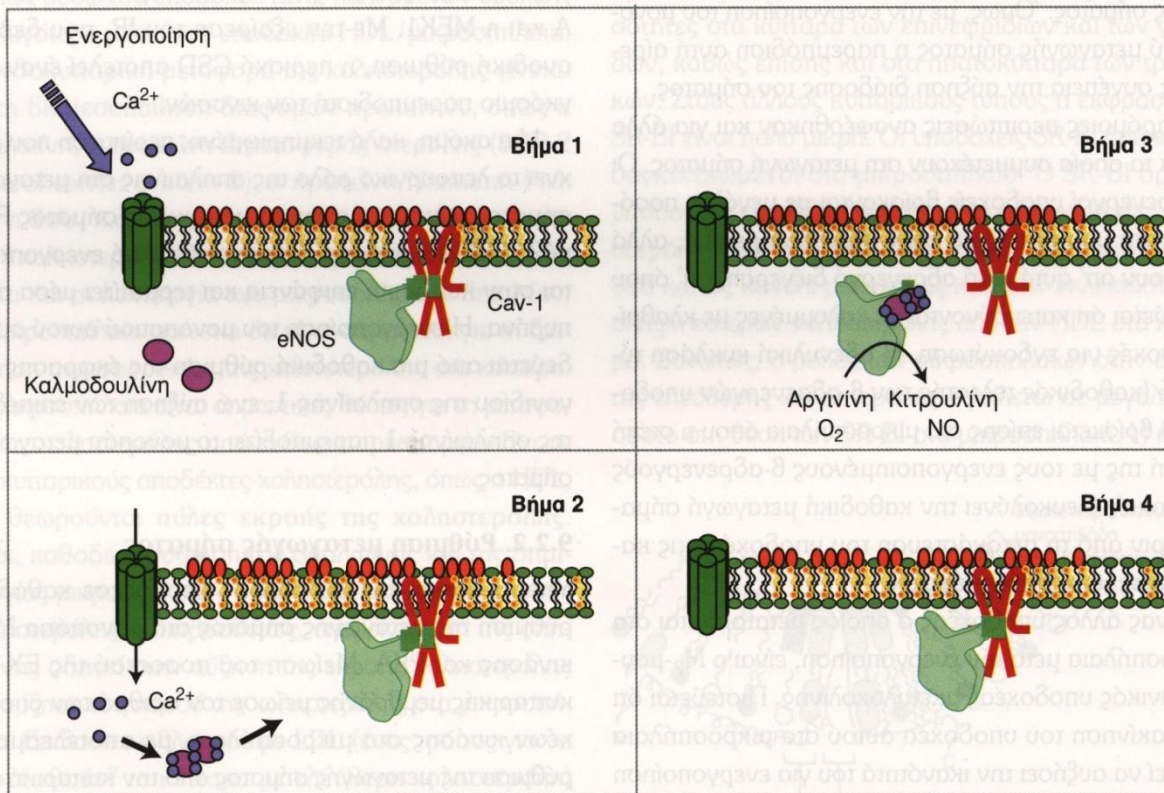
Στις περισσότερες περιπτώσεις η αλληλεπίδραση **παρεμποδίζει** τη μεταγωγή σήματος

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

### eNOS ενδοθηλιακών κυττάρων

Αγγειογένεση, χαλάρωση αγγείων, διαπερατότητα



**Ακυλίωση eNOS** ⇒ μετακίνηση σε ΛΣχ ΠΜ κ Golgi

Σε **σύνδεση** (παρεμπόδιση δράσης) ή **όχι** (βέλτιστη δράση) με τη σπηλαιίνη (CSD caveolin-1) + υδρόφοβη περιοχή σύνδεσης eNOS)

**Mutated eNOS domain:** όχι σύνδεση με caveolin-1 αλλά φυσιολογική ενεργότητα eNOS

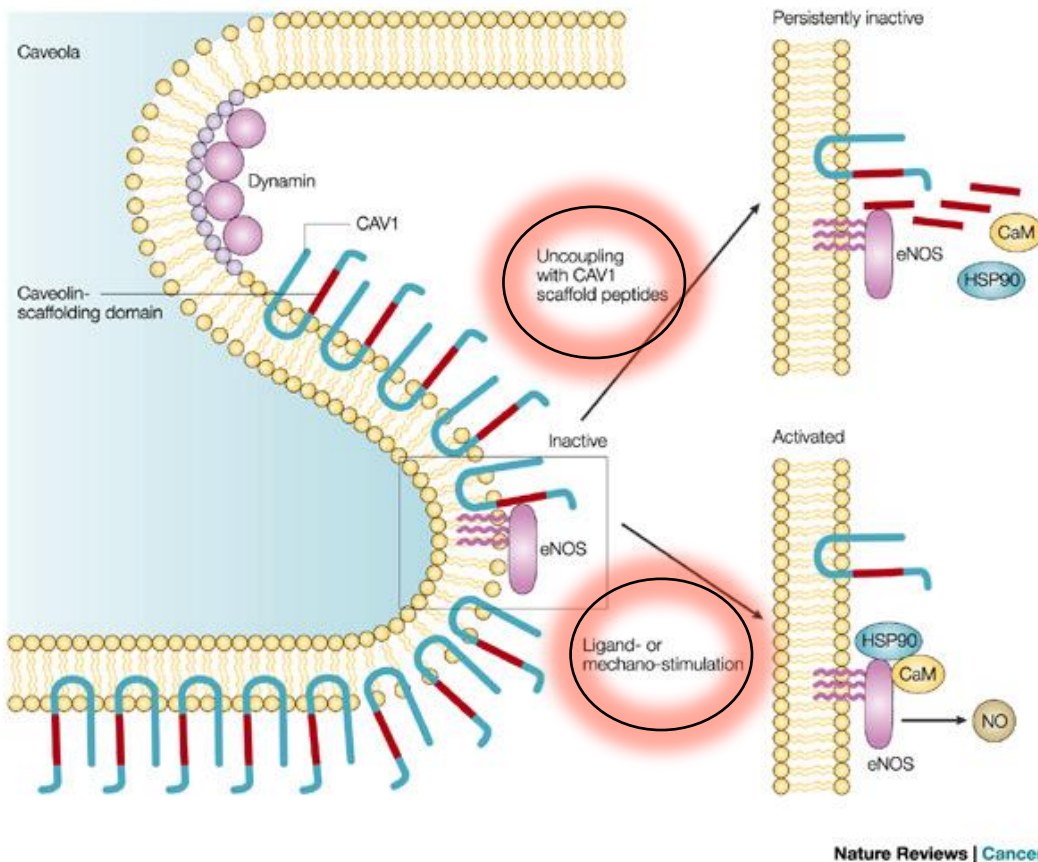
**Εικόνα 2.16.** Μικροσπήλαια και μεταγωγή σήματος eNOS. Στο βήμα 1, η σύνδεση της σπηλαιίνης (Cav-1) με την eNOS παρεμποδίζει τη μεταγωγή σήματος. Στο βήμα 2, η ενεργοποίηση του αγωνιστή κινητοποιεί την εισροή ιόντων ασβεστίου τα οποία συνδέονται και ενεργοποιούν την καλμοδουλίνη. Στο βήμα 3, η ενεργοποιημένη από τα ιόντα ασβεστίου καλμοδουλίνη συνδέεται στην eNOS, παρεμποδίζει τη σύνδεση της eNOS με τη σπηλαιίνη και προάγει την παραγωγή του νιτρικού μονοξειδίου. Στο βήμα 4, η σπηλαιίνη συνδέεται πάλι με την eNOS και έτσι ολοκληρώνεται ο κύκλος. (Από Razani και συν., 2002).



# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

**Caveolin-1** functions as an inhibitory clamp that **inhibits** select **signalling proteins** such as eNOS



Following **ligand-** or **mechano-** stimulation, eNOS **dissociates** from CAV1, allowing **accessibility** to **co-activators**, such as **calmodulin** (CaM) and **HSP90** to produce nitric oxide (NO)

Signalling can be inhibited by **peptides** that correspond in sequence to the CAV1 **scaffolding domain** which binds the signalling molecules and maintains them in a **permanent 'off' state**.

**Mimetic peptides** illustrated that the interaction of **eNOS** with Caveolin 1 **CSD** resulted in eNOS **inactivation in vivo**

*Carver LA & Schnitzer JE. Nature Reviews Cancer 3, 571-581; 2003*

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

**Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Ras-p42/44 MAP κινάσης**

Ενεργοποιείται στην κυτταρική επιφάνεια και τερματίζει στον πυρήνα

**Ενεργοποίηση μονοπατιού** συνοδεύεται από **αρνητική ρύθμιση έκφρασης γονιδίου σπηλαιίνης-1**

**Αύξηση των επιπέδων σπηλαιίνης-1:** παρεμποδίζει το **μονοπάτι μεταγωγής σήματος**

**Μείωση συγκέντρωσης χοληστερόλης ΠΜ:** μείωση αριθμού **Υ κινάσης στα μικροσπήλαια** και ρύθμιση **μεταγωγής σήματος** από κυτταρική επιφάνεια σε πυρήνα

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

Στις περισσότερες περιπτώσεις η αλληλεπίδραση παρεμποδίζει τη δραστηριότητα πολλών μορίων μεταγωγής σήματος

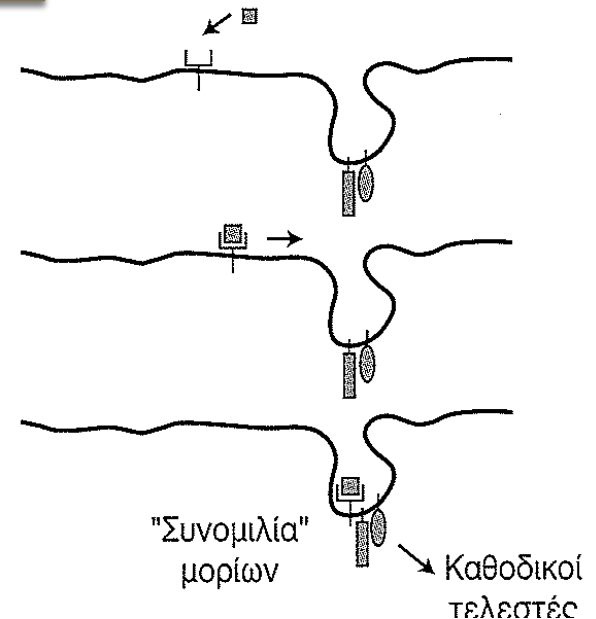
“παγκόσμιος» παρεμποδιστής κινασών



**Ενεργοποίηση μονοπατιού**

Η παρεμπόδιση αίρεται  $\Rightarrow$  αύξηση διάδοσης σήματος

Πολλοί Υ μετατοπίζονται στα μικροσπήλαια μετά την ενεργοποίηση (πχ. M2-μουσκαρινικός Υ ακετυλοχολίνης)



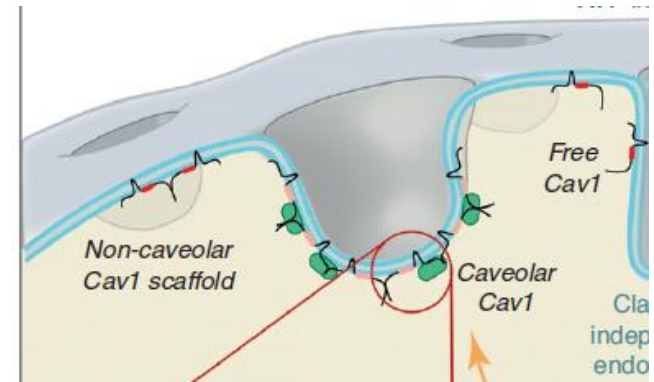


# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

**CSD** is supposed to form an in-plane amphipathic helix **buried within the membrane in assembled caveolae**

Proposal: the binding of signaling molecules to **CSD in caveolae** would result in **inactivation**, whereas binding to **non-caveolar caveolin-1 CSD** would **activate** signaling



# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 2. Μεταγωγή σήματος

### Θετική ρύθμιση

IR (insulin receptor)

PDGFR υποδοχέας

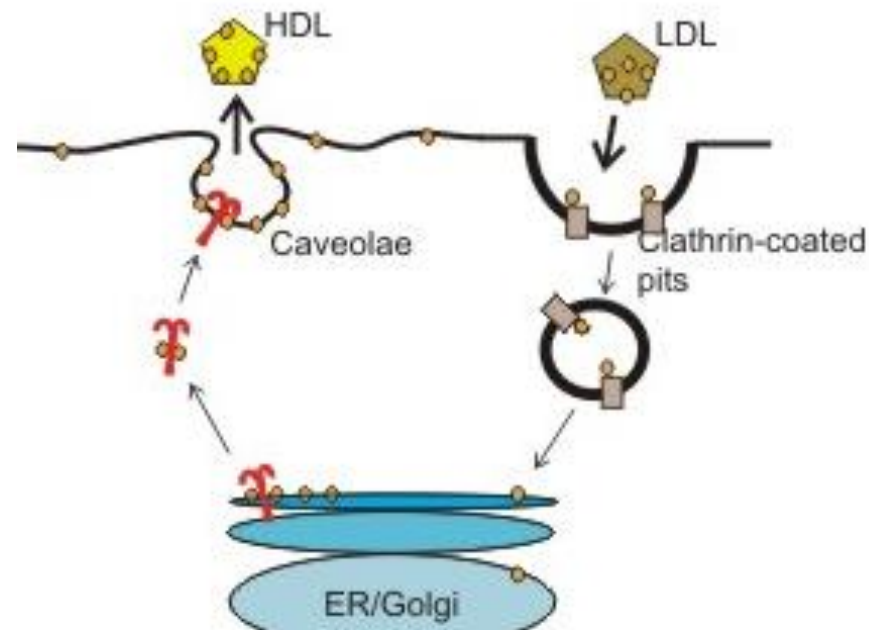
Η **χοληστερόλη** είναι απαραίτητη για τη **σύζευξη** του PDGFR με τα **υποστρώματά** του και άλλα μόρια μεταγωγής σήματος που βρίσκονται στα **μικροσπήλαια**

**Λιπίδια:** σχηματίζουν **ικρίωμα** που προκαλεί οργάνωση μορίων μεταγωγής σήματος και ελέγχει τις αλληλεπιδράσεις τους με τον PDGFR

**Σπηλαιίνη:** διατηρεί το λιπιδιακό **ικρίωμα**

### 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

3



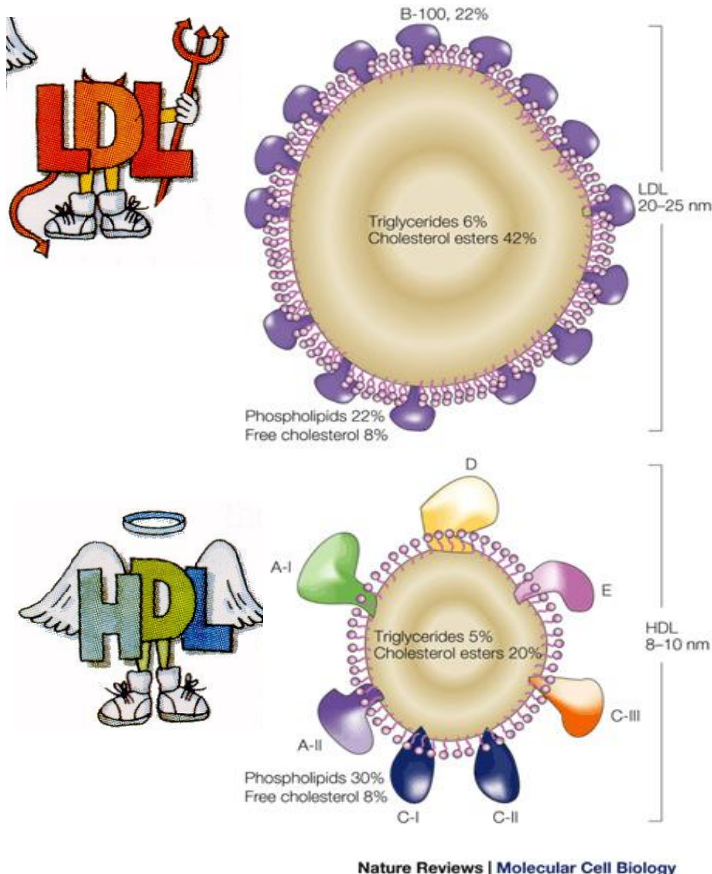
**Intracellular cholesterol** is thought to be **transported to plasma membrane caveolae** via a golgi-independent **caveolin-mediated route**.

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

### Intracellular free cholesterol:

1. externally (from **LDL** (κυρίως) by either receptor-mediated endocytosis (**clathrin**) or by membrane loading)
2. de novo synthesis
3. HDL entrance (λιγότερο) (**SR-B1-μικροσπήλαια**)



LDL particles are **large** with a core that is rich in **cholesterol esters**. Their protein coat is composed predominantly of **APOB-100**.

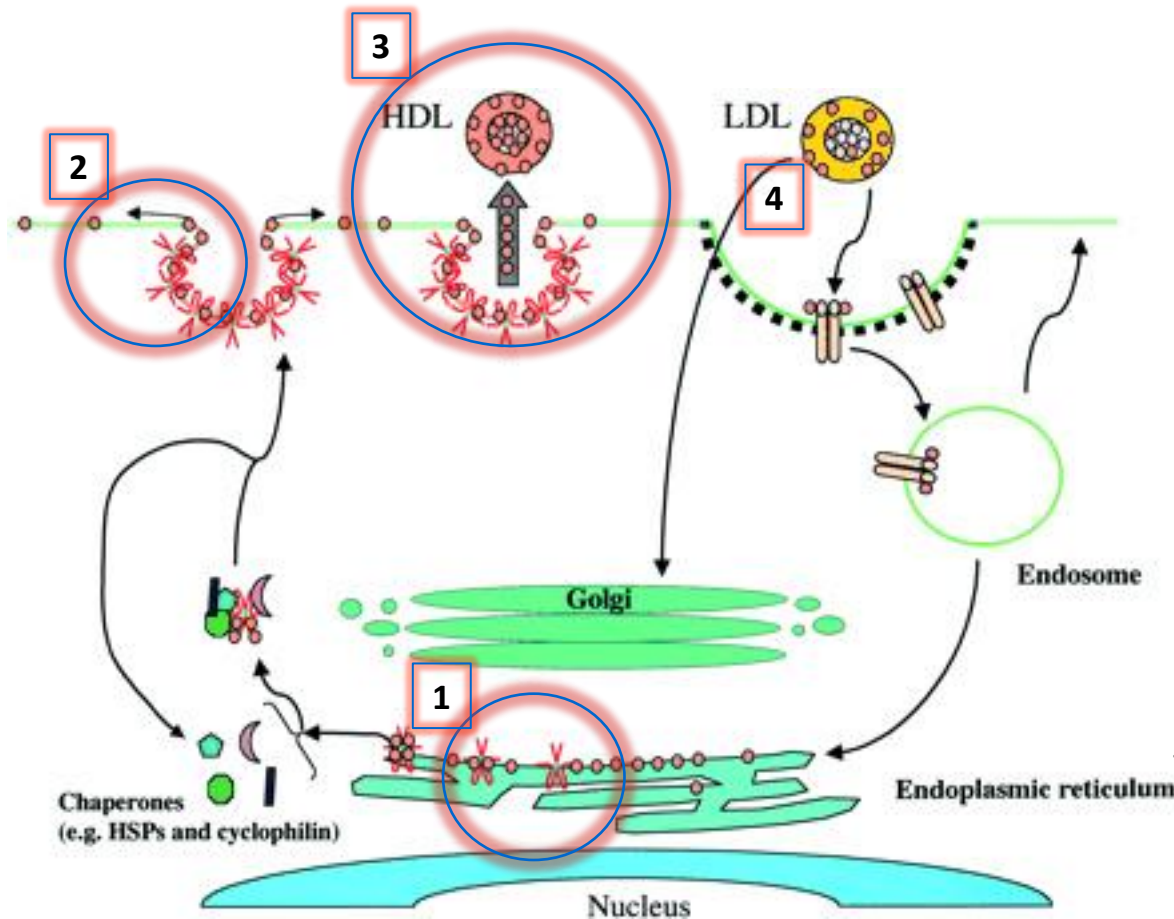
HDL particles are similar and their protein coat contains a number of **different apolipoproteins**.

*YA. Ioannou*

*Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:657-668; 2001*

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης



**1. Caveolin-1** binds **cholesterol** in the **ER** and transport it to **caveolae** at the **PM**

cholesterol can either be **effluxed** to extracellular lipoproteins (namely **HDL**) or be siphoned into the **PM** bulk plasma membrane.

**2. Caveolin-1** can then retreat to the **ER/Golgi** compartments and repeat this **transport cycle**.

*(Pharmacological Reviews 54(3):431, 2002)*

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

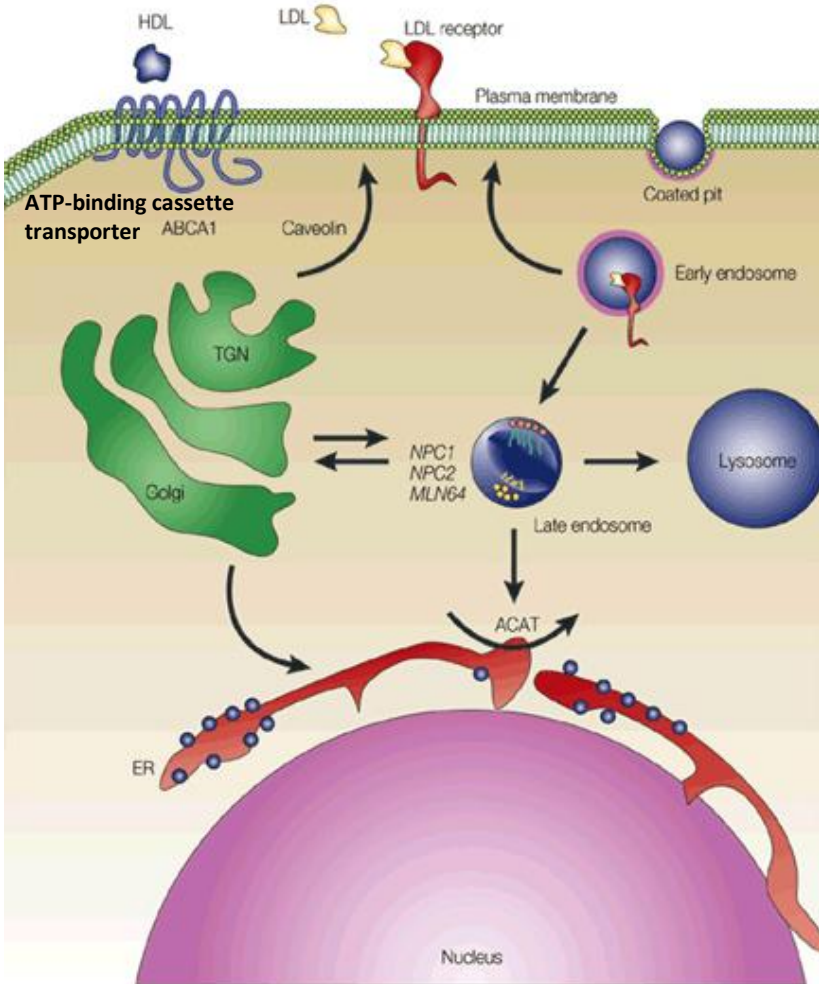
### LDL-R pathway

- **endocytosis** of the **LDL particles** in **clathrin-coated pits**
- cholesterol is released into the **endosomal-lysosomal** system
- Niemann-Pick C 1 (**NPC1**), **NPC2** and **MLN64** (malignancy antigen 64): mediate **cholesterol exit from the endosomal system** and its eventual transport to the **PM**.

**Caveolins (???)** are thought to facilitate **cholesterol movement to the PM** where an ABC-type PM transporter (**ABCA1**) can facilitate its **efflux** onto **HDL** particles (**ATP-dependent**).

**Excess cholesterol** can be transported from the **PM** to the **ER** where acyl-coenzyme A:cholesterol acetyltransferase (**ACAT**) facilitates **esterification** of cholesterol for storage in **lipid droplets** in the cytosol.

Cholesterol transport to the **mitochondria** or **peroxisomes** is not shown.



YA. Ioannou

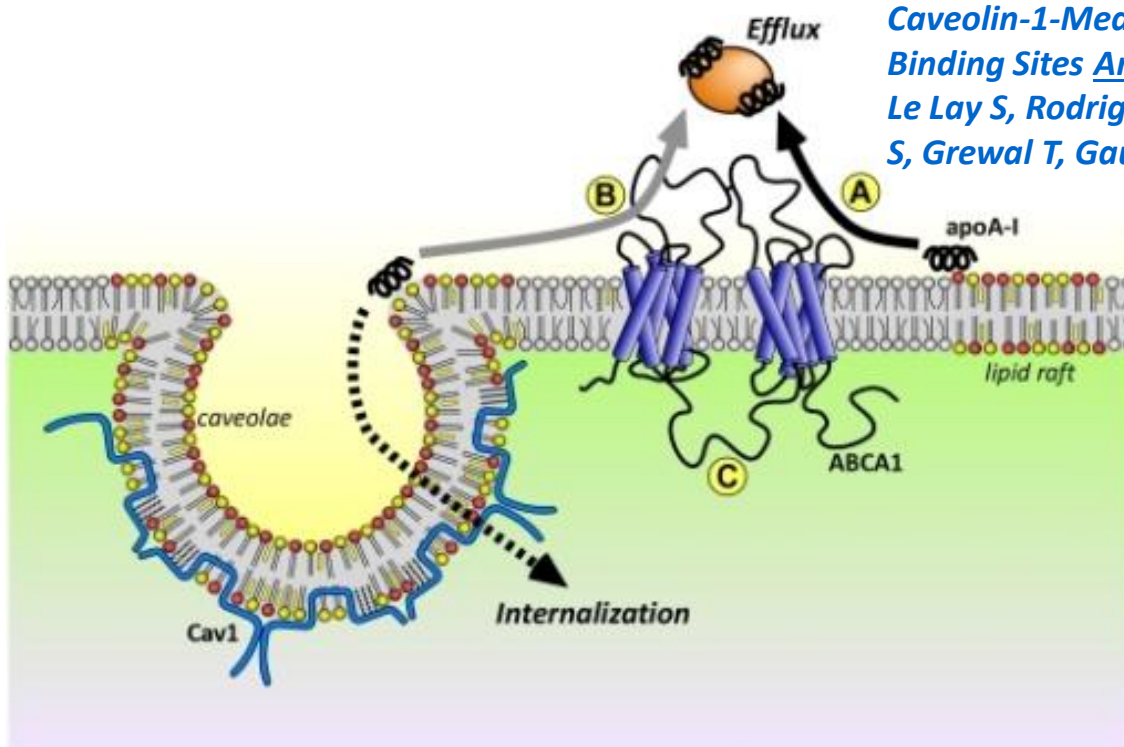
Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:657-668; 2001

Nature Reviews | Molecular Cell Biology



# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης



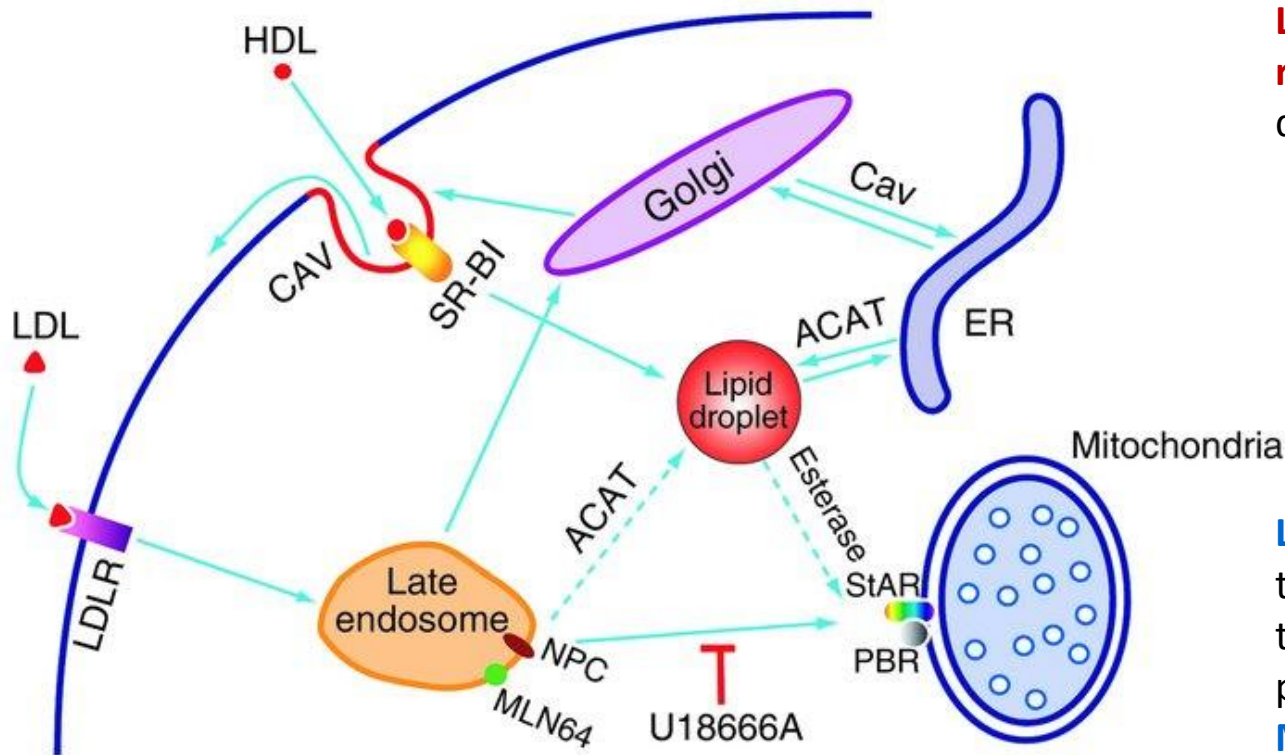
*Caveolin-1-Mediated Apolipoprotein A-I Membrane Binding Sites Are Not Required for Cholesterol Efflux*  
Le Lay S, Rodriguez M, Jessup W, Rentero C, Li Q, Cartland S, Grewal T, Gaus K - PLoS ONE (2011)

membrane domains other than caveolae regulate ABCA1-mediated cholesterol efflux

- High-capacity apoA-I binding sites** preferentially form at the **raft/non-raft border** where **disordered lipid packing** creates space for the insertion of **apoA-I's amphipathic  $\alpha$ -helices** between the phospholipids polar head groups.
- apoA-I may bind with high capacity to **caveolae** at the PM. ApoA-I bound at the caveolae neck is **targeted for internalization and degradation** (dashed arrow) and is not required for lipid efflux (grey arrow)
- Stimulation of ABCA1 translocase activity** by apoA-I facilitates **efflux** (solid black arrow)



### 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης



Cholesterol is **taken up** from **both LDL receptors** and **apoA/HDL receptors (SR-BI)** in **caveolin-rich domains (SR-BI + εκροή)**.

**Late endosomes** mediate this transfer to the **mitochondria** via the activities of **NPC-1** and possibly the StAR-like protein **MLN64**.

**Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT)** converts free cholesterol derived from organelles (e.g., **endosomes** and endoplasmic reticulum (ER)) to the **cholesterol esters** that represent the predominant components of **lipid droplets**.

**High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex**  
*Colin Jefcoate. J Clin Invest. 110(7):881–890; 2002*

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

### Εκροή χοληστερόλης

1. Απλή διάχυση διαμέσου μεμβράνης (βαθμίδωση συγκέντρωσης μεταξύ κυτταρικής επιφάνειας-εξωκυττάρου μέσου)
2. Πρωτεΐνες-μεταφορείς ΠΜ-Χωρίς κατανάλωση ενέργειας (**SR-BI/μικροσπήλαια**, επινεφρίδια-γονάδες-Υποδοχέας HDL: μεταφορά χοληστερόλης από ΠΜ σε HDL)
3. Πρωτεΐνες-μεταφορείς- Με κατανάλωση ενέργειας (**ABC**-σχηματισμός HDL από Apo-A1-Ενάντια στη βαθμίδωση συγκέντρωσης)

### Εισροή χοληστερόλης

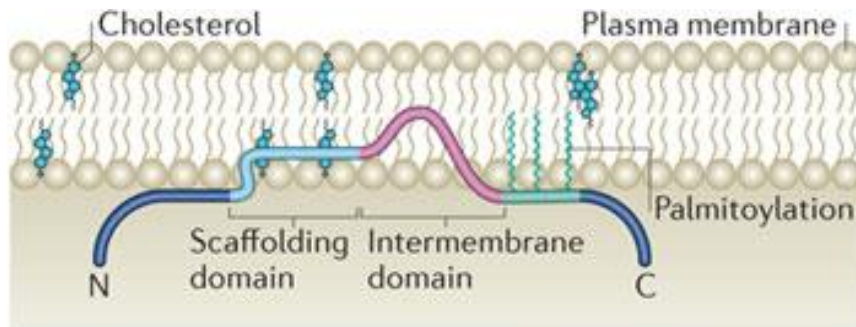
1. LDL-R (κυρίως): σε καλυμένες εσοχές → ενδοσώματα (διαλογή πρωτεϊνών και λιπιδίων) → α) ΠΜ (πχ. υποδοχείς) και β) **Λυσοσώματα** (μεταβολισμός και μεταφορά σε άλλες θέσεις)
2. HDL-SR-B1 in caveolae: **SR-B1** υποδοχέας HDL-Εκλεκτική/ταχύτατη πρόσληψη χοληστερόλης/εστέρων χοληστερόλης με μη-κυστιδιακό μηχανισμό

Απουσία LDL-R: υπερέκφραση **SR-B1** και μεταφορά στερολών από **HDL/LDL** στο κύτταρο

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

RG Parton & MA. del Pozo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:98-112; 2013



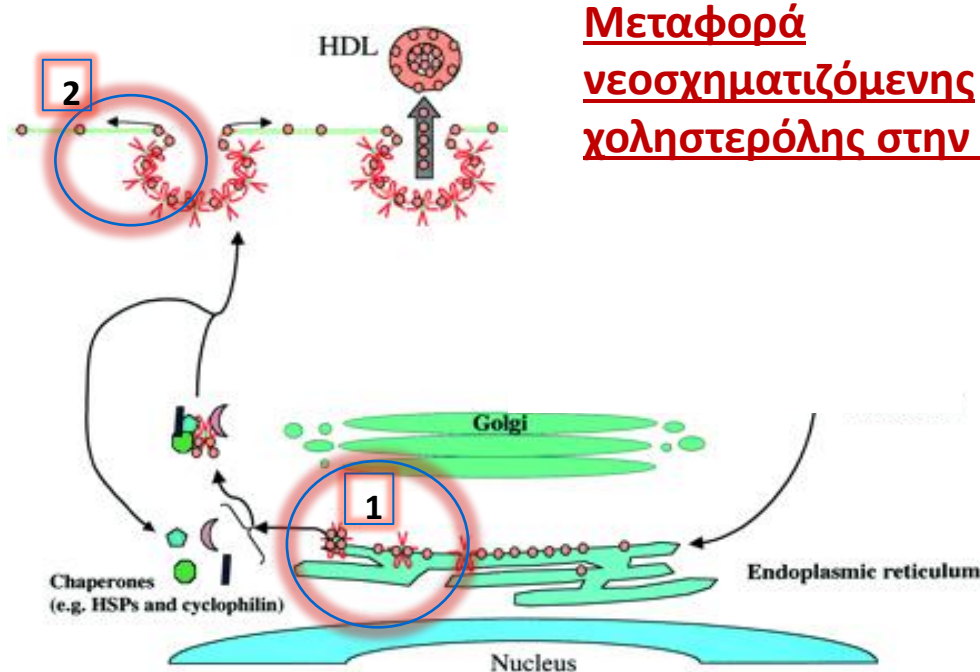
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Στα **μικροσπήλαια** συγκεντρώνονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεταφορά χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης ΚΑΙ **λιπαρών οξέων** (σπηλαιίνη, CD36, FAT: fatty acid translocase συνδέονται με τα λιπαρά οξέα και τα μεταφέρουν στο cyt)

Η **σπηλαιίνη** διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια **μεταφορά λιπιδίων**:

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης



### Μεταφορά νεοσχηματιζόμενης χοληστερόλης στην ΠΜ

σύμπλοκο χοληστερόλης-σπηλαιίνης-1 και άλλων συνοδών πρωτεϊνών. «Συσκευή μεταφοράς»- ΟΧΙ ΑΠΛΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ: ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟ ΛΙΠΙΔΙΑΚΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟ (μεταφορά λιπιδίων μεταξύ οργανιδίων –αντίστοιχο λιποπρωτεϊνών πλάσματος που μεταφέρουν λιπίδια μεταξύ των ιστών)

Κρίσιμο ρόλο για μεταφορά: οι 3 θέσεις παλμιτιλίωσης σπηλαιίνης (εκτός από σταθεροποίηση πρωτεΐνης στη μεμβράνη)

υψηλή έκφραση σπηλαιίνης σε λιποκύτταρα: σχετίζεται με ενδοκυτταρική /εξωκυτταρική μεταφορά λιπιδίων

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

### Σχέση σπηλαιίνης 1-χοληστερόλης:

Καθοδική ρύθμιση σπηλαιίνης (δημιουργίας μικροσπηλαίων)  $\Rightarrow$  μείωση εκροής χοληστερόλης

Υπερέκφραση σπηλαιίνης  $\Rightarrow$  αύξηση εκροής χοληστερόλης + αύξηση % χοληστερόλης σε μικροσπήλαια

Ινοβλάστες + LDL  $\Rightarrow$  αύξηση mRNA σπηλαιίνης

Τα επίπεδα της σπηλαιίνης 1 προσαρμόζονται μεταγραφικά σε διακυμάνσεις ελεύθερης κυτταρικής χοληστερόλης μέσω 2 ρυθμιστικών στοιχείων στερόλης (SREs) που βρίσκονται στον προαγωγέα σπηλαιίνης 1

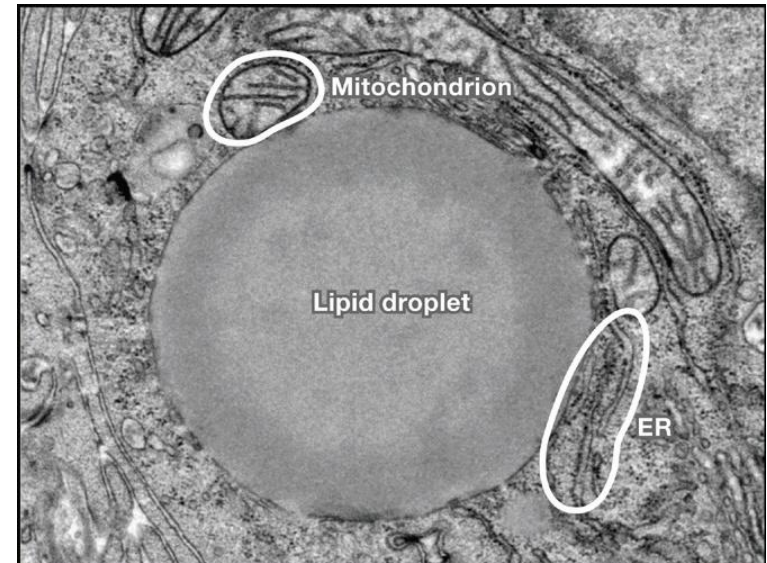
# Λιπιδιακά σταγονίδια

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

are now considered as actual cellular organelles (diameter < 1–100 μm)

Lipid Droplets arise **from the ER**

(Προτεινόμενο άρθρο: [Farese, R. & Walther, T. \*Lipid Droplets Finally Get a Little RESPECT. Cell 139:855; 2009\*](#))



([Farese & Walther Cell 139:855; 2009](#))

are involved in **membrane biogenesis** and "**trafficking**" of membranes to different locations in the cell

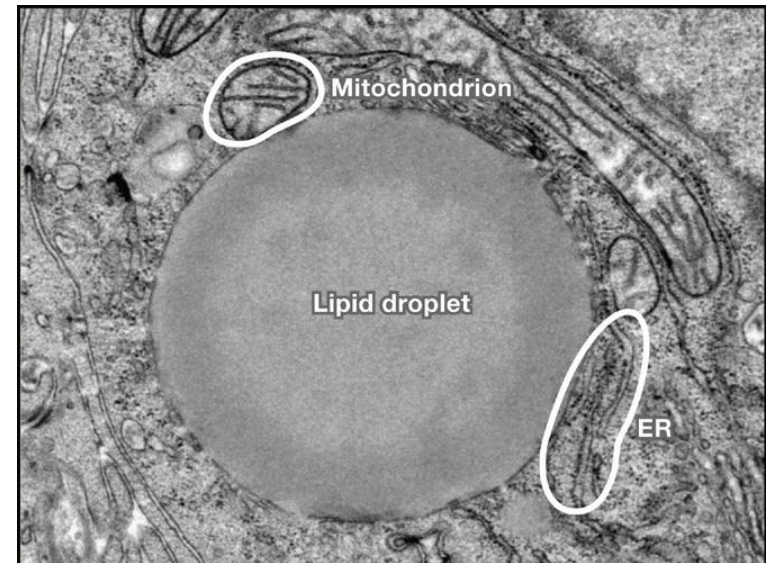


# Λιπιδιακά σταγονίδια

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

are now considered as actual cellular organelles (diameter < 1–100 μm)

- ❖ **Energy storage**
- ❖ **Αποθήκη δομικών υλικών** βιολογικών μεμβρανών
- ❖ **Compartmentalizing lipids** in cells-buffer cells from the toxic effects of excessive amounts of lipid
- ❖ involved in **intracellular protein metabolism**: LDs might serve as **platforms** for the deposition and **degradation** of some proteins by the **proteasome**



*(Farese & Walther Cell 139:855; 2009)*



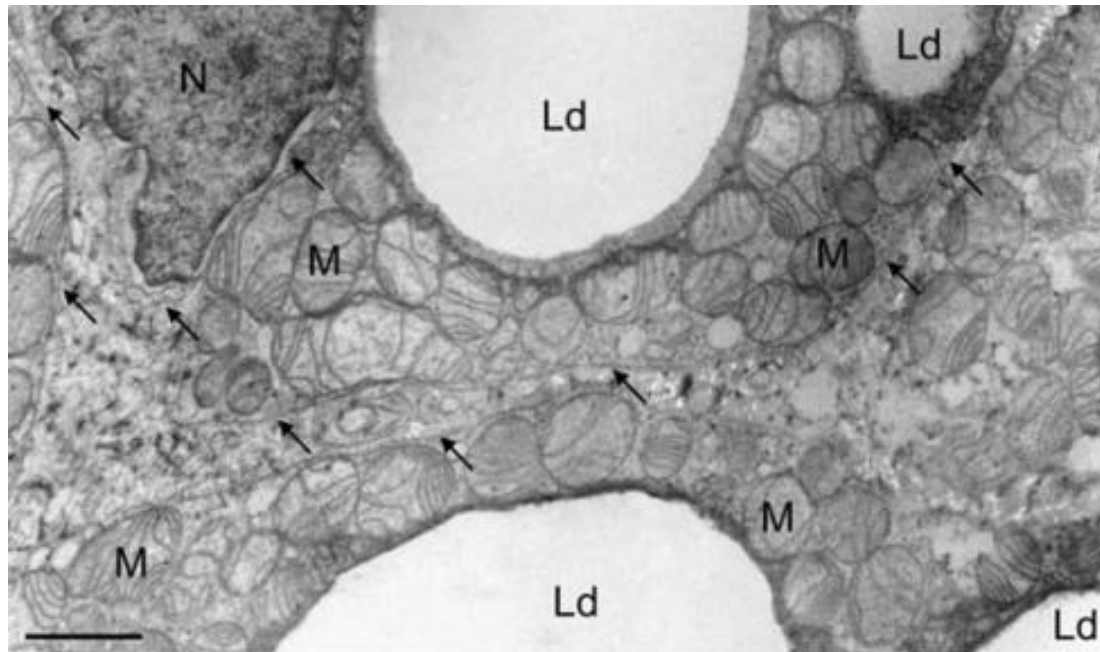
# Λιπιδιακά σταγονίδια

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

Βρίσκονται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα (όχι μόνο στα λιποκύτταρα)

in adipocytes: **very big**-they take up almost all of the available space-they are used for energy storage

In other cells: **small**-they are used mostly for membrane biogenesis and energy mobilization



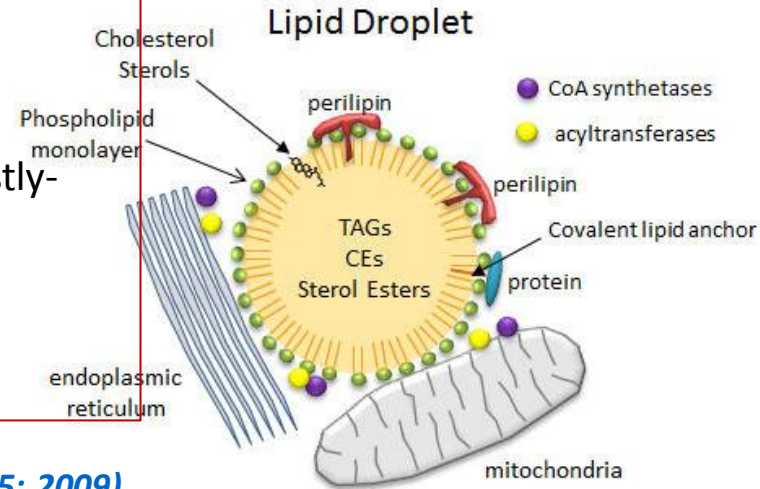
Electron microscopy of brown adipose tissue (BAT). **Ultra-thin section** of a tissue fragment showing the main constituents of a BAT cell. **Large lipid droplets (Ld)** are present, surrounded by **mitochondria (M)**. The endoplasmic reticulum (arrows) can be seen all over the cytosol, but mainly close to mitochondria. N, nucleus. Bar = 1  $\mu$ m.

# Λιπιδιακά σταγονίδια

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

### Σύσταση:

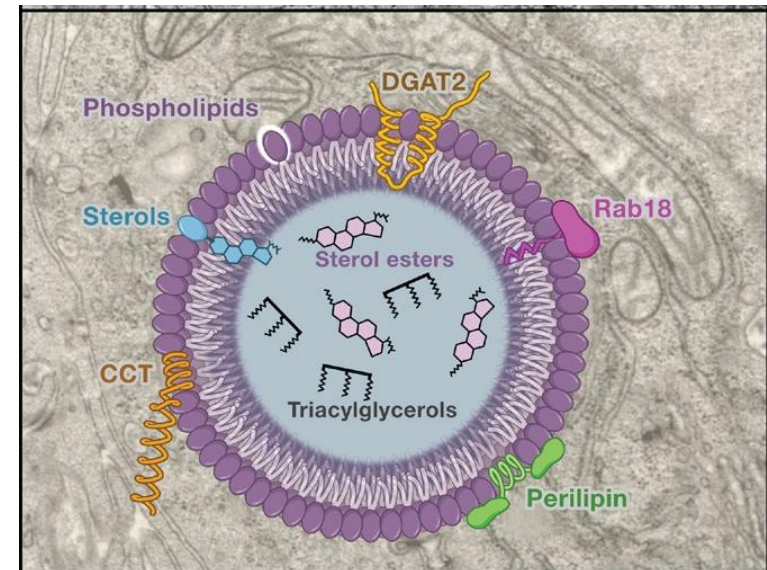
1. **Κεντρικά:** ουδέτερα λιπίδια (**τριγλυκερίδια/εστέρες χοληστερόλης**)
2. **Περιφέρεια:** **μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων** (PC, PE mostly- από ΕΔ)  
**πρωτεΐνες** (attached **perilipins**, **ADRP**-adipocyte differentiation-related protein, **Acyl CoA synthetases** and **acyltransferase**)



(Farese & Walther Cell 139:855; 2009)

**Structurally similar to plasma lipoproteins**, which are secreted from cells and transport lipids through the aqueous circulation to different regions of the body

Often found in close proximity or attachment to **mit**, **ER** and **peroxisomes**



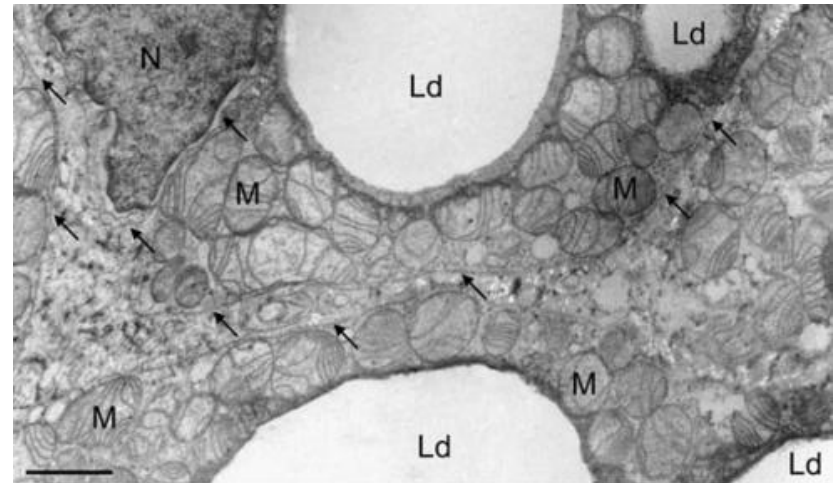
# Λιπιδιακά σταγονίδια

## 3. Ομοιοστασία και μεταφορά χοληστερόλης

**Λιποκύτταρα:** Mammals have two types of adipocytes, **white** and **brown**, but their anatomy and physiology is different. White adipocytes **store lipids**, and brown adipocytes burn them to **produce heat**

- πρόσληψη/αποθήκευση λιπαρών οξέων ως **τριγλυκερίδια**
- περιέχουν το μεγαλύτερο αριθμό **μικροσπηλαίων/επίπεδα σπηλαιίνης-1, 2**
- **σπηλαιίνη-1**: κύρια πρωτεΐνη σύνδεσης με τα **λιπαρά οξέα**

Σε κάποιες περιπτώσεις οι **σπηλαιίνες** κατευθύνονται στα **Λιπιδιακά σταγονίδια** (αντί για το ΕΔ)?? (πύλες πρόσληψης/μεταφοράς λιπαρών οξέων στα σταγονίδια?)



# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

4

caveolae seem to be directly involved in the cell response to mechanical stress: primary cell response to an acute mechanical stress occurs through the rapid **flattening** of caveolae into the plasma membrane

### Regulators of cell mechanics

mechanosensors and mechanotransducers that respond immediately to **mechanical stress** by reversible flattening (“οριζοντιοποίηση») into the PM

caveolar **disassembly/reassembly cycles** induced by membrane tension variations at the surface of the cell under **physiological** and **pathological** conditions

It is certainly no coincidence that **caveolae were first observed in cell types that are constantly exposed to mechanical constraints:**

- ✓ the flat monolayer of **endothelial cells**
- ✓ **epithelium cells** of the gall bladder
- ✓ **adipocytes**
- ✓ **muscle cells**

*P. Nassoy and C. Lamaze. **Stressing caveolae new role in cell mechanics.**  
Trends in Cell Biology 22(7):381; 2012*

1. The first implication of caveolae in cell mechanics: **flattened caveolae in frog skeletal fibers** after mechanical elongation (*Dulhunty et al., 1975*)
2. chronic and repetitive **shear stress** applied to the PM **increases the number of caveolae** by several fold (*Park et al., 1998; Boyd et al., 2003*)
3. **shear flow** at the surface of **endothelial** cells  $\Rightarrow$  increase of **caveolar density** AND **activation** of endothelial nitric oxide synthase (**eNOS**) and MAPK

**Plasma membrane tension**: a force per unit length (usually in mN/m) or, equivalently, an energy per unit area (in mJ/m<sup>2</sup>) that represents the **amount of energy** required to **form the closed cellular interface** between **cell interior** and **exterior**. It has two components: the **in-plane tension** in the lipid bilayer and the **adhesion energy** between the membrane and the underlying **cytoskeleton**.



# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 4. mechanosensors

Συλλογιστική:

**In vivo**, cells are **challenged** under physiological and pathological situations by various stresses (**volume changes** and **stretching**): stretching by more than **30%** in cell length or swelling as large as **20%** in volume are commonly reported

Εγγενείς μηχανικές ιδιότητες ΠΜ + **δυναμικό ελαστικότητας** ΠΜ (to avoid lysis) + **mechanosensitive mechanisms to regulate membrane tension**

- 1. Corrugations** (αυλακώσεις) or  **folds** at the cell surface: serve as a **reserve of membrane** to avert any increase in membrane tension. Nonetheless, such smoothing of the plasma membrane is generally not desired because it implies **membrane-to-cytoskeleton detachment** which inevitably leads to alteration of the dynamics of major **cellular functions** (e.g., motility and endocytosis)
- 2. Surface area homeostasis:** High tensions  $\Rightarrow$  favor recruitment of membrane to the surface via **exocytosis**. Low tensions  $\Rightarrow$  increase the **endocytic** rate to retrieve excess membrane. These mechanisms (requiring synthesis, transport and fusion of vesicles from the Golgi to the cell surface) are consistent with the characteristic time of **membrane tension relaxation  $\cong$  10 min.**

However, in contrast to **neurons** (lack caveolae) **endothelial** and **muscle** cells exhibit negligible membrane tension sensitivity to osmotic swelling and stretching

**Instantaneous** (within **less than 30 s**) membrane tension buffering: ATP and actin-independent **flattening of caveolae**.

**complete** and **rapid disassembly** of the caveolar structure by free diffusion of caveolins in the PM.  
Afterwards: increased caveolin-1 synthesis

On the removal of the mechanical stress, the initial density of the caveolae is **recovered**, suggesting that the process is **reversible**. **Pacsin-2** (caveolae biogenesis) invaginates flat Caveolin 1 domains into budded caveolae at the PM

**Disassembly**: passive, driven by the mechanical state of the membrane

**Reassembly**: **ATP- and actin-dependent**.

**Acute** osmotic shock or stretching  $\Rightarrow$  **decrease** in the number of caveolae at the PM

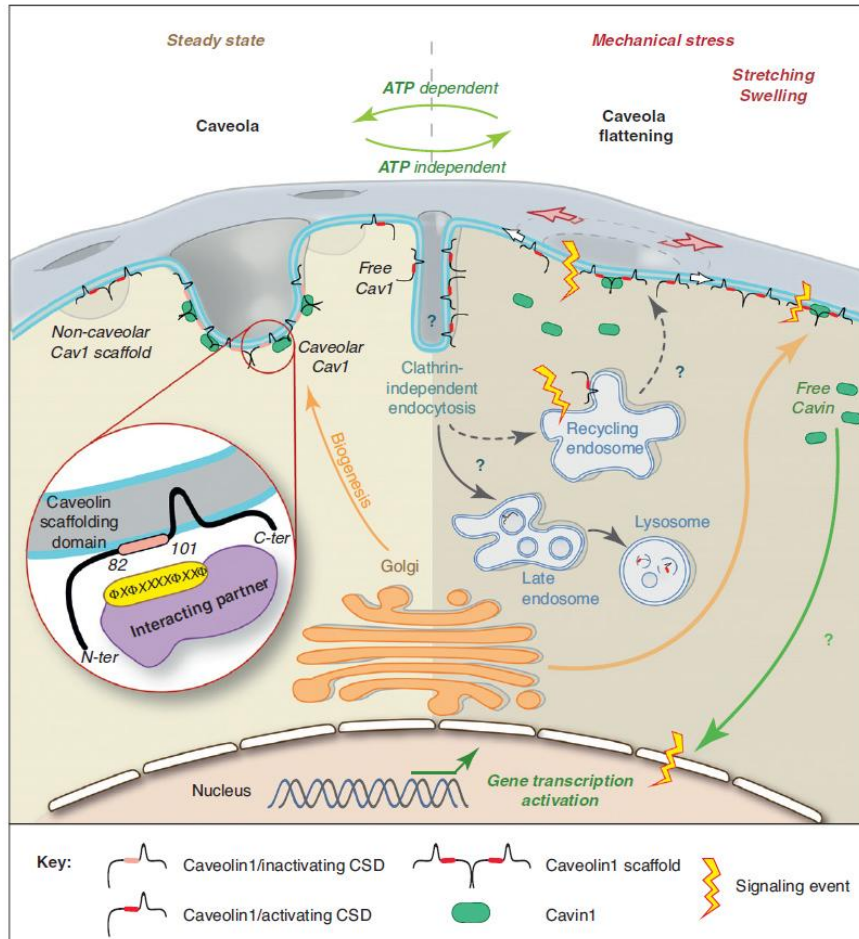
On acute mechanical **stress caveolae flatten out** in the PM to provide **additional membrane** and **buffer membrane tension**.

**Chronic** shear stress  $\Rightarrow$  **increase** in the number of caveolae at the PM by several-fold

It is possible that the **endosomal** and **Golgi pools** of Cav1 are used

### Λειτουργικότητα μηχανισμού caveolar flattening:

- ❑ Provides **additional membrane for buffering** surface area changes induced by mechanical stress
- ❑ **Dissociation of cavin-1 from caveolin-1**  $\Rightarrow$  **free diffusing caveolin-1** at the inner monolayer  $\Rightarrow$  **signaling** (eg. caveolar CSD interaction with eNOS  $\Rightarrow$  inactivation vs. **interaction with non-caveolar CSD**  $\Rightarrow$  activation)
- ❑ **redistribution of glycosphingolipids** at the PM  $\Rightarrow$  modulation of stretch-induced **signaling**
- ❑ **Release and activation of transcription factors** (endothelial cells: shear stress can activate transcription factors such as AP-1, **NF-kB**, Sp-1 and Egr-1, which in turn **induces genes** encoding factors that modulate **vascular structure** and **function**)
- ❑ **Release of cavin-1**: Cavin-1 was initially named Pol I and transcript release factor (PTRF) and was found to **increase ribosomal gene transcription**. Cavin-1 release from caveolae could therefore modulate cell signaling through cytosolic interactions, or **nuclear translocation and gene activation**. Chronic shear stress (increase in the number of caveolae) may be associated with cavin-1-dependent nuclear gene activation and **caveolin-1 synthesis**



Under resting conditions, caveolae are mostly budded at the PM

### Mechanical stress: Caveolar flattening

1. Release of **Cav1** and **Cavin-1** from the caveolar structure (increased amount of freely diffusing Cav1 and Cavin-1 at the PM)
2. On the removal of the force, Cavin-1 and Cav1 rapidly **reassemble into caveolae** (ATP-dependent)
3. Non-caveolar Cav1 is **internalized** (clathrin-independent- To LE/lys or recycling endosomes)
4. released **Cavins** activate cellular processes to induce **caveolar biogenesis** (increasing membrane reservoir size)

*P. Nassoy and C. Lamaze. Trends in Cell Biology 22(7):381; 2012*

# Λειτουργίες μικροσπηλαίων

## 4. mechanosensors

mechanical stress could **not** flatten **more than 40–50%** of caveolae in endothelial cells

Probably:

- 1. caveolae** are present in a **large excess**
- Mechanical stress solicits only a particular population of caveolae. **No direct evidence has documented the existence of molecularly distinct subpopulations of caveolae.** Nevertheless, **1)** live cell imaging has revealed kinetically different pools of caveolae. **2)** EHD2 and pascsin-2 partially localize with caveolae...

**CANCER:** It is likely that the **mechano-dependent cycle** of **caveolar disassembly/reassembly** will be affected in cellular microenvironments with **increased membrane tension** and **rigidity** such as those experienced by cancer and stromal cells during **tumor mass progression** .

However, the role of caveolae in mechanical force buffering and mechanotransduction in solid tumors has not been studied.

**Pulmonary hypertension and bladder smooth muscle hypertrophy:** defects in Caveolin 1 and Cavin-1 described in the endothelial and muscle cells of these patients will lead to **impaired caveola-mediated responses to mechanical stress**.

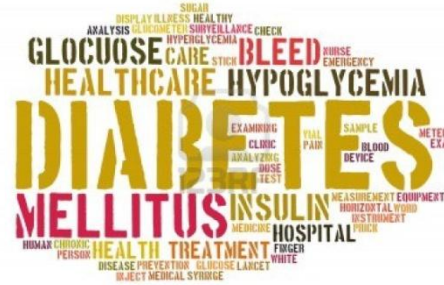
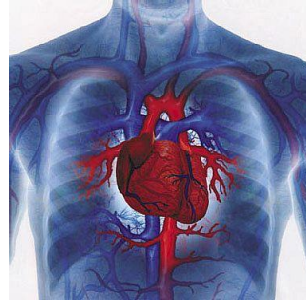


# Ασθένειες

Many **signaling molecules** and **signaling cascades** are regulated by an interaction with the **caveolins** ⇒ numerous **disease processes** may be affected by ablation or mutation of these proteins.

Studies in **caveolin-deficient mice** have implicated these structures in a host of diseases including:

- diabetes
- cancer
- cardiovascular disease
- Atherosclerosis
- pulmonary fibrosis (formation or development of excess fibrous connective tissue in the lungs)
- a variety of degenerative muscular dystrophies

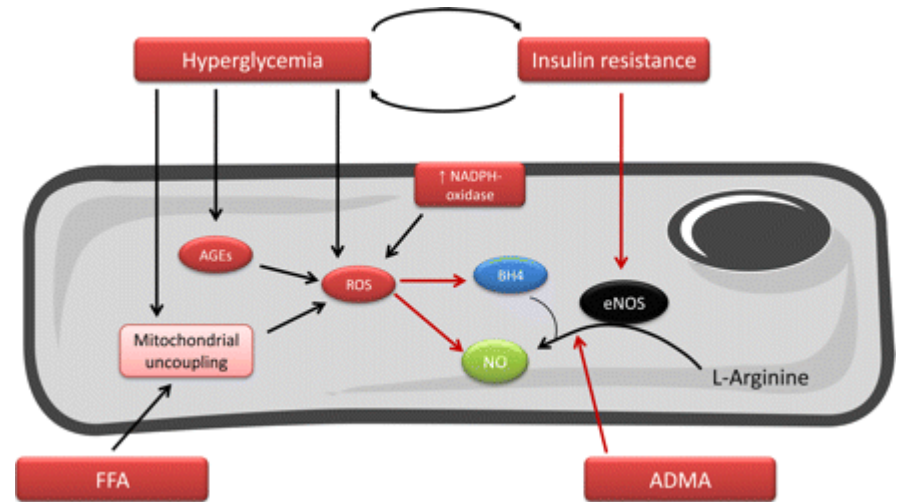
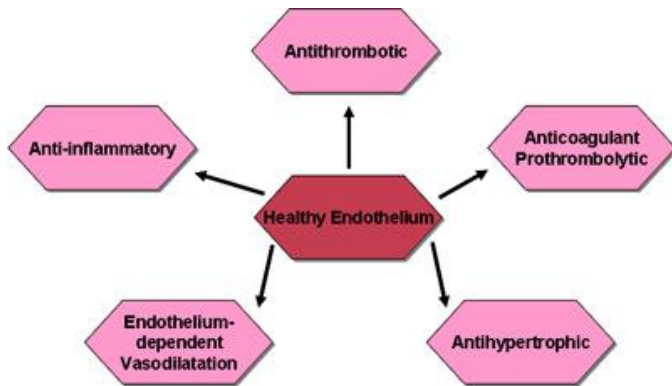


(Although **mice deficient for caveolae are viable**)

**Mutations** in **caveolins** and **cavins** are associated with various diseases in human:

- skeletal muscle dystrophies
- cardiac abnormalities
- Lipodystrophies
- Cancer

# Ασθένειες



**Caveolin-1** is an essential **regulator of eNOS** (endothelial nitric oxide synthase) and its disruption leads to **endothelial dysfunction** which initiates a range of **cardiovascular** and **pulmonary disorders**

cytokine signal transducer **gp130** (glycoprotein 130) (signaling receptor sequestered in caveolae) is mediator of **chronic inflammation** during **atherogenesis**

*Williams JJ, Palmer TM.*

*Cavin-1: caveolae-dependent signalling and cardiovascular disease  
Biochem Soc Trans. 42(2):284-8; 2014.*

# Ασθένειες

## Muscle and adipose tissue pathologies

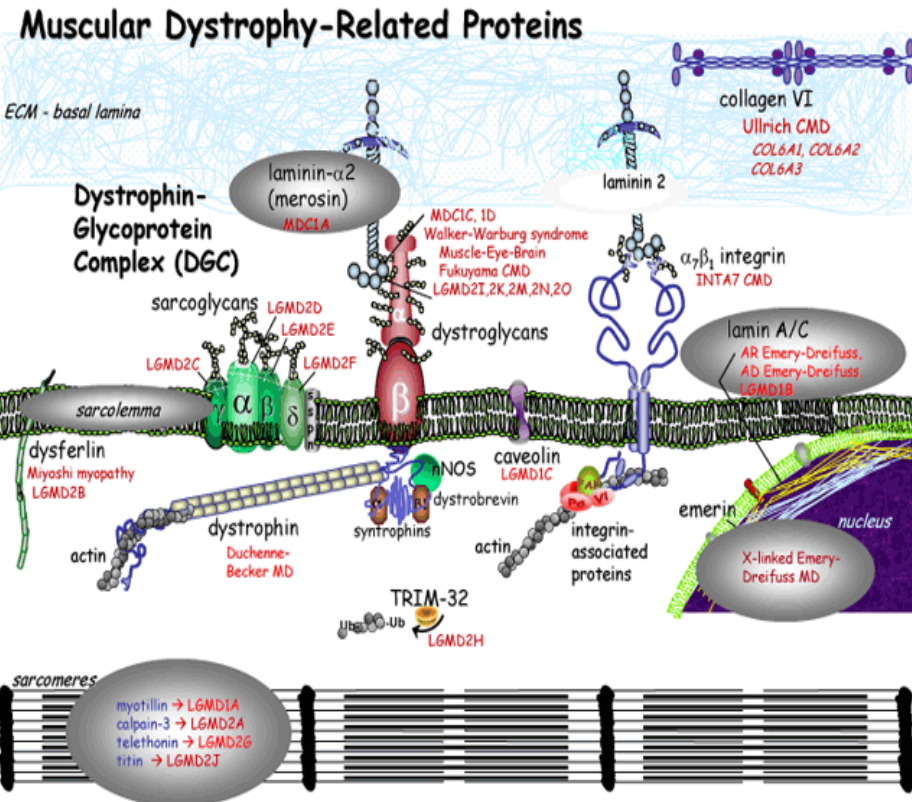
### Caveolae seem to be important for normal muscle physiology

- ❖ Involvement of **caveolin 3** (CAV3) in various types of human muscle dystrophies: long established.
- ❖ **cavin 1** mutations also result in muscular dystrophies (Cavin 1 is also expressed in muscle cells)
- ❖ The interaction of **cavin 1** and **caveolin 3** with the membrane repair proteins mitsugumin 53 (**MG53**) and **dysferlin**, respectively, may have a role in **muscle homeostasis**.

Mutations in **human caveolin 3** or **cavin 1** also result in human cardiomyopathies, such as long-QT syndrome

Mutations in **human caveolin 1** and **cavin 1** result in lipodystrophy, demonstrating the importance of caveolae in human **adipose tissue**

Most **Muscular dystrophies-associated caveolin-3 mutants** are **retained at the Golgi complex** ⇒ **no formation of functional caveolae at PM**



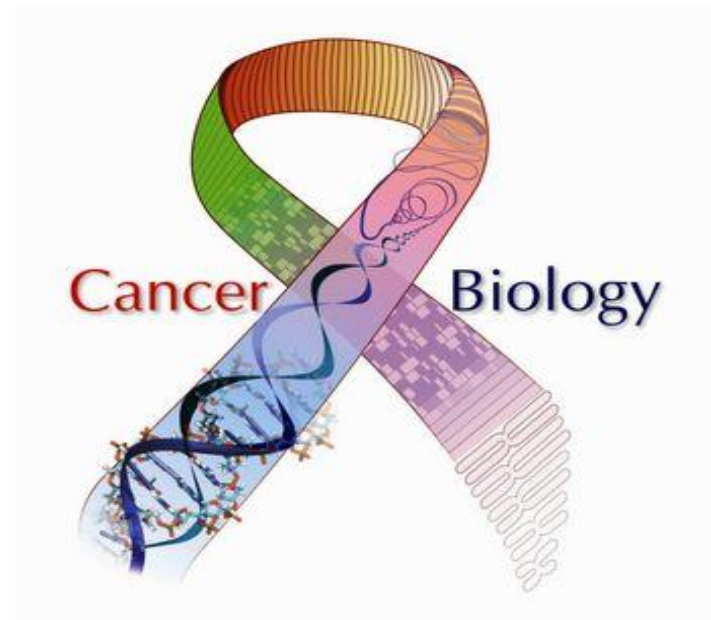
# Ασθένειες

## CANCER

A multistep **genetic** and **epigenetic disease** that results from the progressive **accumulation of mutations** which either inactivate **tumour suppressor genes** or activate dominant **proto-oncogenes**

These aberrant events free cells from **proliferative control** and allow primary **tumour** formation.

The initial tumour growth is followed by **metastatic spread**, and ultimately, **metastases** that are **resistant to conventional therapies** and represent the major cause of **death** from cancer



# Ασθένειες

## CANCER

**Caveolin-1** (CAV1) is involved in **cancer progression**- However, the role of caveolae remains unclear, with studies reporting both **oncogenic** and **tumor suppressor** functions within a **particular tumor type**. **Καταστολέας όγκων??**

### A) Δεδομένα για ογκοκατασταλτική δράση σπηλαιινών

1. Ογκογενής **μετασχηματισμός** κυτταρικών σειρών ⇒ μείωση ΜΓΡ σπηλαιίνης-απώλεια μικροσπηλαίων
  2. **Cav-1, cav-2 genes**: σε περιοχή γενώματος (D7S522 locus ) που χάνεται πολύ συχνά σε μεταστατικούς καρκίνους
  3. Κατά την **ογκογένεση** (σε αρκετούς τύπους): μειωμένη έκφραση σπηλαιίνης-1
  4. **Caveolin-1 deficiency**: leads to increased **proliferation, tumorigenesis** and **metastasis**
- Small cell lung cancers have reduced levels of caveolin-1**
5. **Έκφραση σπηλαιίνης-1 σε καρκινικά κύτταρα** ⇒ αναστροφή αρκετών καρκινικών χαρακτηριστικών
  6. Η έκφραση της σπηλαιίνης-1 μειώνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου-Υπερέκφραση: παρεμποδίζει τη μίτωση ⇒ **ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**

Ωστόσο: στόχευση χαμηλής έκφρασης σπηλαιίνης δεν αρκεί για σχηματισμό όγκων



# Ασθένειες

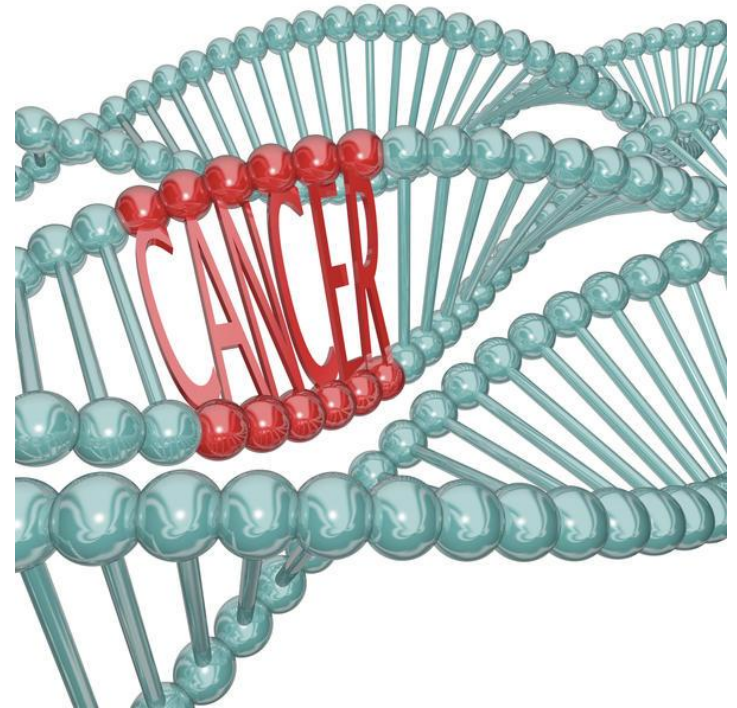
## CANCER

**Caveolin-1 expression** is regulated at the post-transcriptional level in a differential manner by **ROS species** and subsequent proteasome-mediated **degradation**

[*Luanpitpong et al. Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and Caveolin-1. J Biol Chem 285(50): 38832-40; 2010*].

To what extent this might be a relevant mechanism in the tumor environment remains to be established

In summary, a variety of mechanisms have been described that may contribute to loss of Caveolin-1 without implicating the need for mutations. In conjunction, these posit Caveolin-1 as a non-conventional tumor suppressor protein.





### B) Δεδομένα για μεταστατική δράση σπηλαιινών

#### more advanced or metastatic tumours have Cav1 activation

Cav1 is commonly **up-regulated** in several advanced **epithelial tumours** including prostate, kidney, breast and bladder carcinomas and brain tumours

tumour promoting role for caveolin 1??? (has been described in **melanoma** and **prostate cancer-breast cancer**)

Caveolin 1 is also important for **remodeling of the tumor microenvironment** which facilitates **local invasion** and **distant metastasis**.

**Tumor tissue** often exhibits **enhanced rigidity** in comparison to the surrounding tissue.

Due to both 1) increased rigidity of the **stromal microenvironment** (e.g., fibroblasts, blood vessels, extracellular matrix) and 2) intrinsic increase in **membrane tension** in tumor cells

**Moreover, presence of the protein in tumors has been associated with poorer patient prognosis.**

# Ασθένειες

CANCER

In fact, the **expression of Caveolin 1** in human cancer cell lines and tumor samples seems to depend on tumor type and stage

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε κυτταροτοξικά φάρμακα σχετίζεται με αυξημένη έκφραση σπηλαιίνης-1



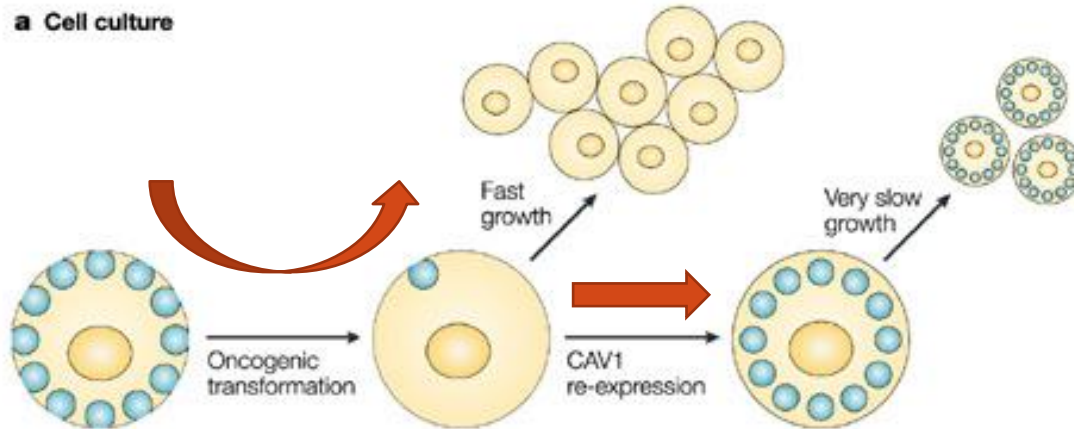
this **“switch” in function** can occur within **the same cell**

Studies related to caveolin-1 (and a few other select molecules) are beginning to **alter the classic view** suggesting that cancer originates as the consequence of mutations **in either oncogenes or tumor suppressors.**

In doing so, they are likely also to alter how we go about **treating the disease.**

# Ασθένειες

## CANCER

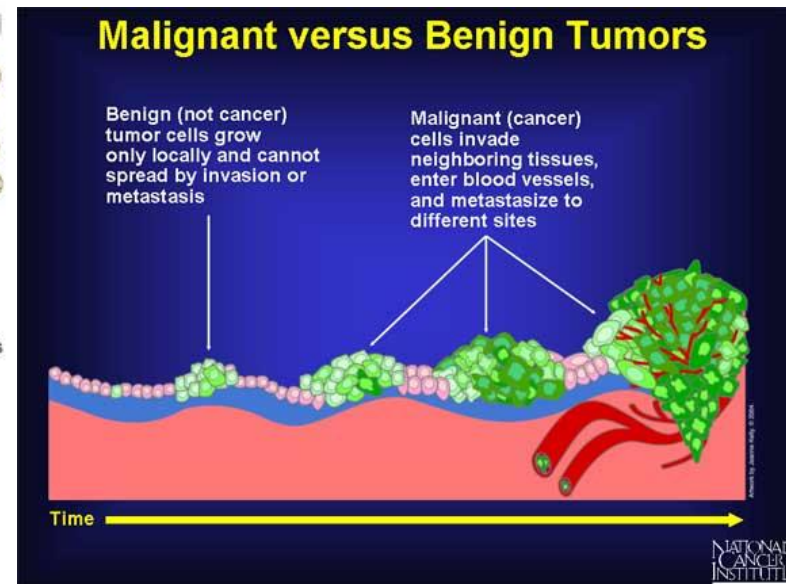
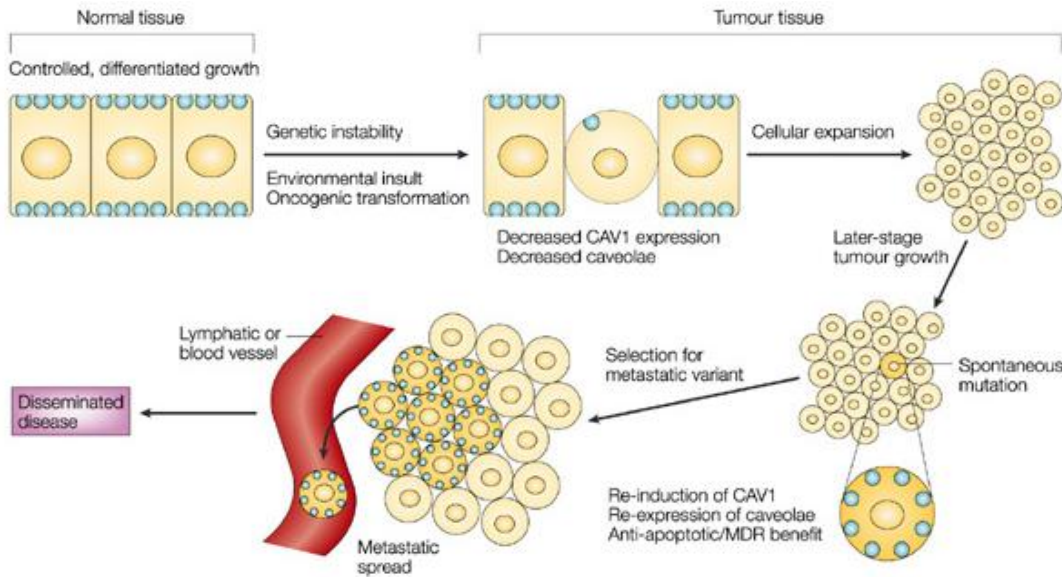


**Transformed cultured cells** are marked by a **loss of caveolin-1 (CAV1)** expression and decreased caveolar (blue) density, leading to rapid, **unregulated growth** and anchorage-independent growth.

**Re-establishment of CAV1 expression:** reversal of the transformed phenotype, apparently restoring **normal cell growth, caveolar density** and anchorage-dependent growth.

# Ασθένειες

## CANCER



Nature Reviews | Cancer

***In vivo***, the relationship of **CAV1** and **caveolae** to tumour **initiation** and **progression** is more **complex**.

In the **initial stages**, tissue cells can undergo **oncogenic transformation**. The resulting **decrease in caveolin 1** expression can confer a **growth advantage** to these abnormal cells, allowing them to undergo **rapid expansion**.

In **later stages**, CAV1 expression **might be re-induced**, conferring a survival benefit by **suppressing apoptosis** and allowing acquisition of **multidrug resistance** (MDR). These traits aid in **metastatic spread** of the disease by enhancing the ability of the cells to **survive in new environments**

**Carver LA & Schnitzer JE, Nature Reviews Cancer 3, 571-581; 2003**

➤ **Caveolin 1** interacts with a series of **molecules/receptors** which do not specifically function in **caveolae**, but which **regulate initial steps of cells transformation** as well as their **metastatic potential**

*(growth factors, cytokines, Rho-GTPases (cell movement, migration), integrins (remodelling of ECM), eNOS (neo-angiogenesis, vascular growth, oxidative stress) etc...*

❖ **Cav1 expression** in the **tumour stromal cells** (stromal Cav1): promoting tumour progression and metastasis (through tumour cells interactions with the **microenvironment** and **mechanical remodeling of the ECM** around the tumour)

**stromal Cav1** is a regulator of **matrix-dependent cell behaviour** (*ability to facilitate invasion and metastatic potential*)

*Goetz et al., Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. Cell 146:148-63, 2011*

# Ασθένειες

## CANCER

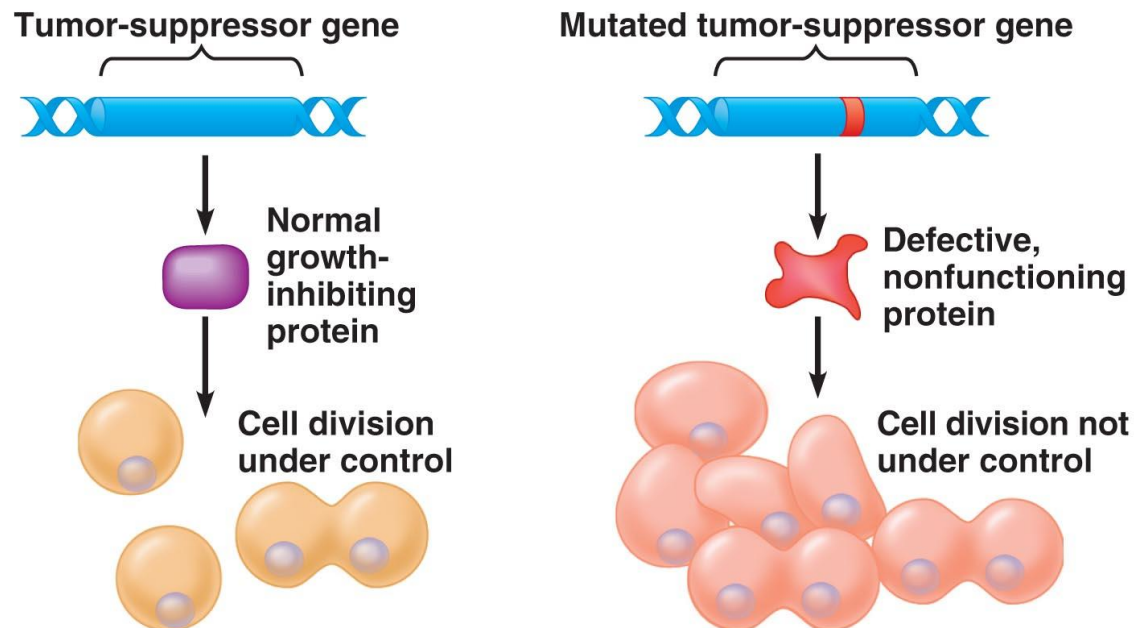
Cavin family members seem to behave as tumour suppressors

Cavin 3 is **lost** in breast and lung tumours

Cavin 1 and cavin 2 are also **absent** in breast tumour samples

cavin 1 expression is **increased** in senescent human fibroblasts

*RG Parton & MA. del Pozo. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14:98-112; 2013*





# Μικροσπήλαια (caveolae)

Πολυλειτουργικά ενδοκυτταρικά «οργανίδια» (δομή- λειτουργία??) που αποτελούνται από σπηλαιίνες, **cavins** και **cholesterol-rich membrane**.

Σταθερές (long-lived) δομές μεμβράνης

ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (clathrin-independent **endocytosis, cholesterol transport, mechanosensing** and **signal transduction**)

Caveolae provide an environment where multiple **receptor signalling components** are sequestered, **clustered** and compartmentalized for efficient signal transduction

Διακύμανση λειτουργικότητας προϊόντος του χρόνου σε έναν κυτταρικό τύπο

**Δεν έχουν πάντα τον ίδιο ρόλο σε κάθε χρονική στιγμή-διαδικασία-κυτταρικούς τύπους**

# Μικροσπήλαια (caveolae)

Caveolae at the plasma membrane **can be removed by endocytosis** to regulate their surface density or can **be disassembled** and their structural components degraded.

Coat proteins, called **cavins**, work together with **caveolins** to regulate the **formation** of caveolae but also have the potential to dynamically **transmit signals** that originate in caveolae to various cellular destinations.

The importance of caveolae as **protective elements** in the plasma membrane, and as **membrane organizers** and **sensors**, is highlighted by links between caveolae dysfunction and **human diseases**, including muscular dystrophies and cancer

lipid rafts and caveolae reveal that **there is much more to be learned** about the structure and function of the **cell membrane**