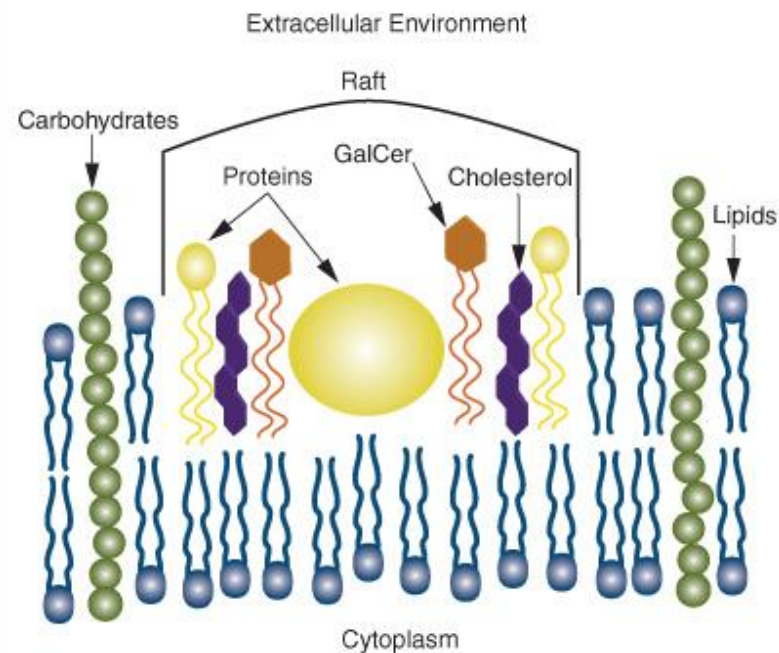




# ΕΙΔΙΚΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## Λιπιδιακές Σχεδίες και Μικροσπήλαια



Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, *Ph.D.*

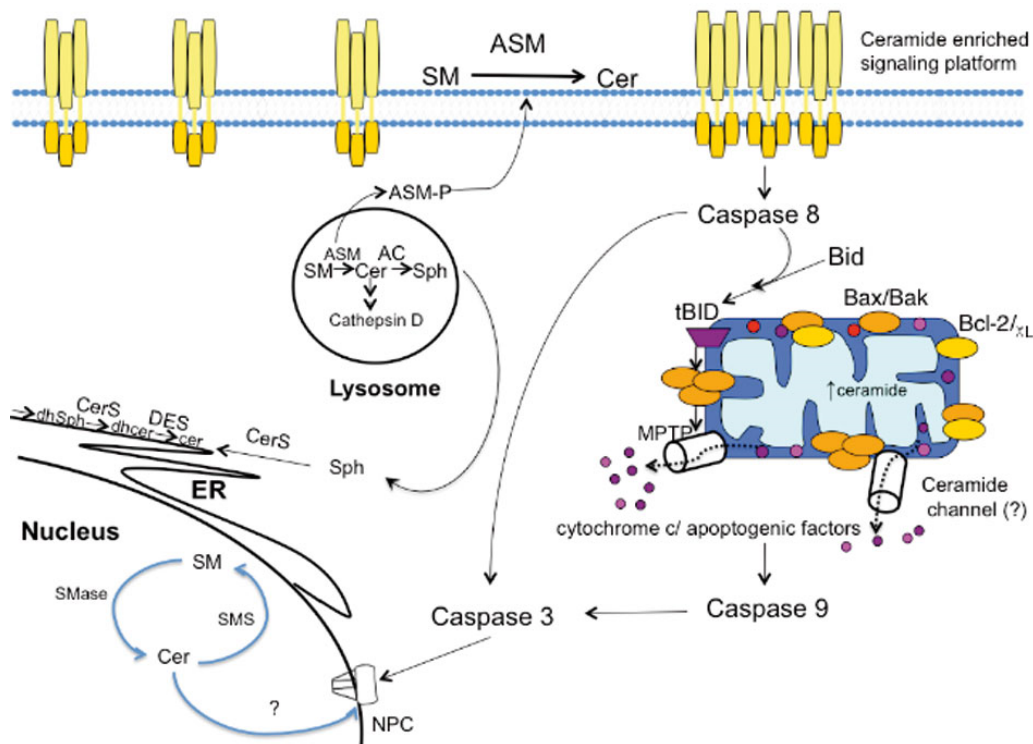
Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας,  
Πανεπιστημίου Αθηνών

2014

# Μεμβρανικές περιοχές (domains)

- Ασυμμετρία μονοστιβάδων
- **Τμήμα μεμβράνης** με διαφορετική **σύσταση** και **φυσικές ιδιότητες** σε σχέση με όμορα τμήματα ίδιας μεμβράνης
- **Λιπιδιακές μικροπεριοχές**: πολλοί τύποι ακόμα και στην ίδια μεμβράνη  $\Rightarrow$  η μεμβράνη είναι ένα **μωσαϊκό λιπιδιακών domains**
- Membrane domains can be very **heterogeneous in size**, from less than **100 nm to microns**. The latter are often referred to as “**platforms**”.

large **ceramide-rich platforms (CRPs)**: formed upon degradation of **sphingomyelin** by **acid sphingomyelinase** in response to a **stress signal** that initiates in turn a cascade of **signalling** events leading to **apoptosis**



- ceramide generation on the **exoplasmic** leaflet of the PM

- alters membrane **structure**

- CRPs diameter: **200 nm** up to several **microns**.

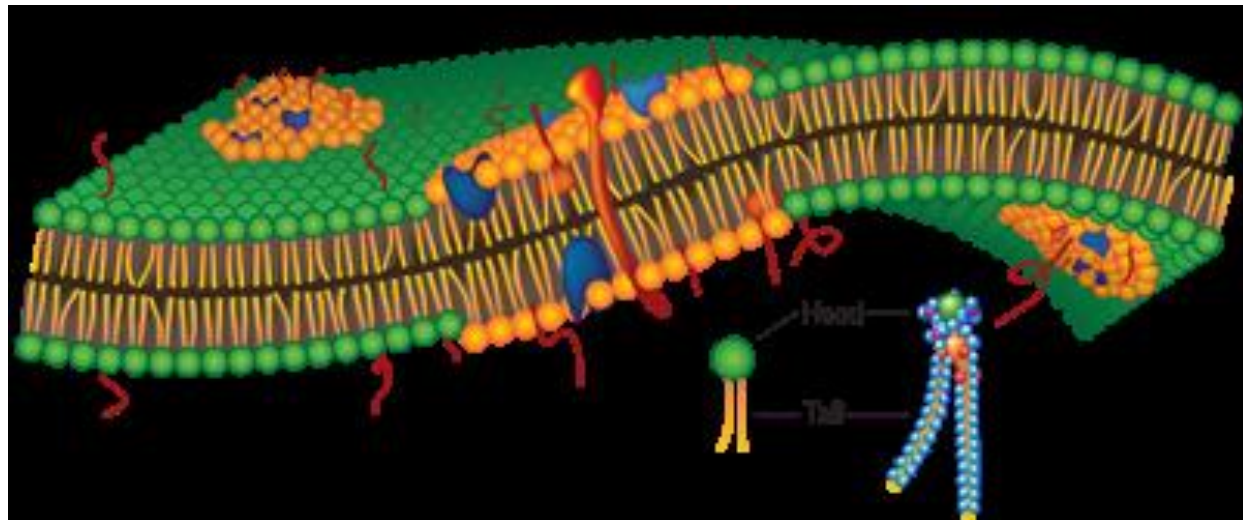
- These macrodomains can be visualized by a variety of techniques including **SEM**, and conventional and confocal **fluorescence microscopy**

- CRPs appear to be sites of **protein oligomerization** for the purpose of **transmembrane signaling**

*Stancevic and Kolesnick, FEBS Letters 584:1728-1740, 2010*

*Tirodkar and Voelkel-Johnson, Exp Oncol 34(3):231-242, 2012*

- ΛΙΠΙΔΙΑΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ



# The beginning

NCBI Resources ▾ How To ▾

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed ▾ K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cellmembranes, Nature 387 (6633) (Jun 5

RSS Save search Advanced

Display Settings: ▾ Abstract

Send to: ▾

See 1 citation found using an alternative search:

Nature. 1997 Jun 5;387(6633):569-72.

## Functional rafts in cell membranes.

Simons K, Ikonen E.

### Abstract

A new aspect of cell membrane structure is presented, based on the dynamic clustering of sphingolipids and cholesterol to form rafts that move within the fluid bilayer. It is proposed that these rafts function as platforms for the attachment of proteins when membranes are moved around inside the cell and during signal transduction.

PMID: 9177342 [PubMed - indexed for MEDLINE]

The hypothetical existence of LIPID RAFTS was proposed by **Simons and Ikonen in 1997**

This is probably the theory that has elicited the **largest number of studies** ever in the field of membranes

# ΛΙΠΙΔΙΑΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ



**Μικρές** (<300nm, mostly 10-200nm)

**δυναμικές**

**παροδικές** (100 msec)

**ετερογενείς** μεμβρανικές υποπεριοχές (domains/platforms) πλούσιες σε **χοληστερόλη** και **σφιγγολιπίδια** οι οποίες «**διαμερισματοποιούν**» πολλές κυτταρικές λειτουργίες/διαδικασίες

# ΛΙΠΙΔΙΑΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ



- Πλευρικά οργανωμένες** συγκεντρώσεις **χοληστερόλης** (2x) – SM (αύξηση 50%)- Εμπλουτισμός
- Μεγαλύτερη τάξη, σφικτό **πακετάρισμα** (Πλευρική διάχυση-επιδράσεις σε ρευστότητα μεμβράνης)
- Μοριακά σύμπλοκα μαζί με **πρωτεΐνες** (ειδικές, GPI-anchored, διαμεμβρανικές)
- Πλευρική μετακίνηση-Επιπέδουν** ελεύθερα στη διπλοστιβάδα Lc (GPLs) ως μονάδα  
[Cell membrane - YouTube](#)
- Δεν έχουν συγκεκριμένο **σχήμα**
- Ποικίλο **μέγεθος** και **διάρκεια ζωής** (συνήθως μικρές και με μικρό χρόνο ημιζωής)
- Σε **πολωμένα** και **μη** κύτταρα
- Σε **ανώτερα** και **κατώτερα** ευκαρυωτικά κύτταρα (σακχαρομύκητας) -Εξελικτική σταθερότητα

# ΛΙΠΙΔΙΑΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ

Συγκεντρώνουν/διαχωρίζουν πρωτεΐνες στο επίπεδο της μεμβράνης-  
**Κέντρα αλληλεπίδρασης ή αποκλεισμού**

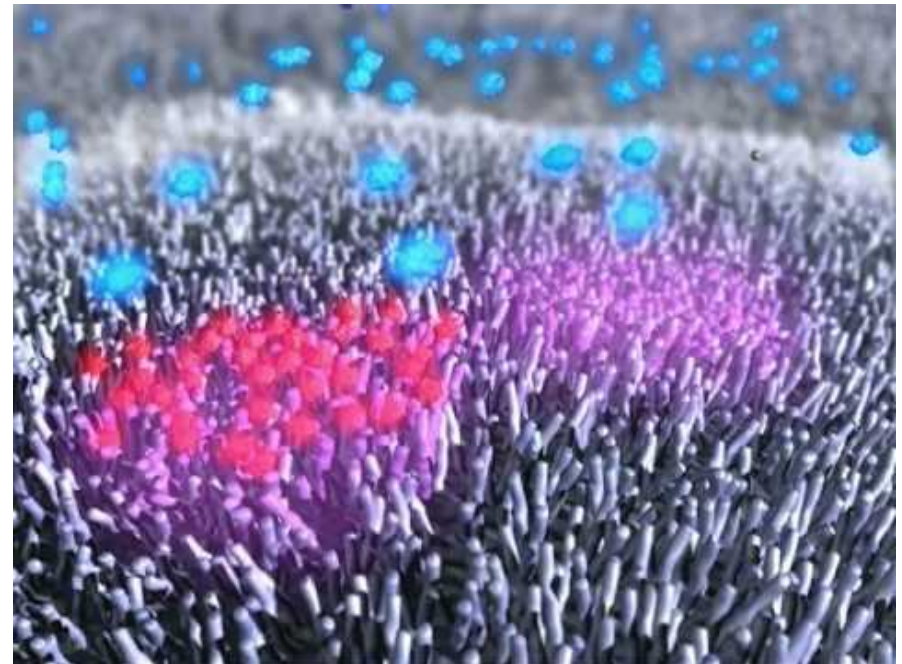
- Πλατφόρμες διαλογής πρωτεϊνών
- Ενδοκυτταρική κυκλοφορία
- Μεταγωγή σήματος (Σχηματισμός συμπλόκων μεταγωγής)
  
- Trafficking μεμβρανικών πρωτεϊνών
- Ενδοκύτωση
- Κυτταρική προσκόλληση
- Ασθένειες (HIV-1, AD, Ebola κλπ)



# ΛΙΠΙΔΙΑΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ

**Διαμερισματοποίηση** και διαχωρισμός  
μεμβρανικών συστατικών

Δημιουργία **βιολογικά ενεργών** μεμβρανικών  
περιοχών



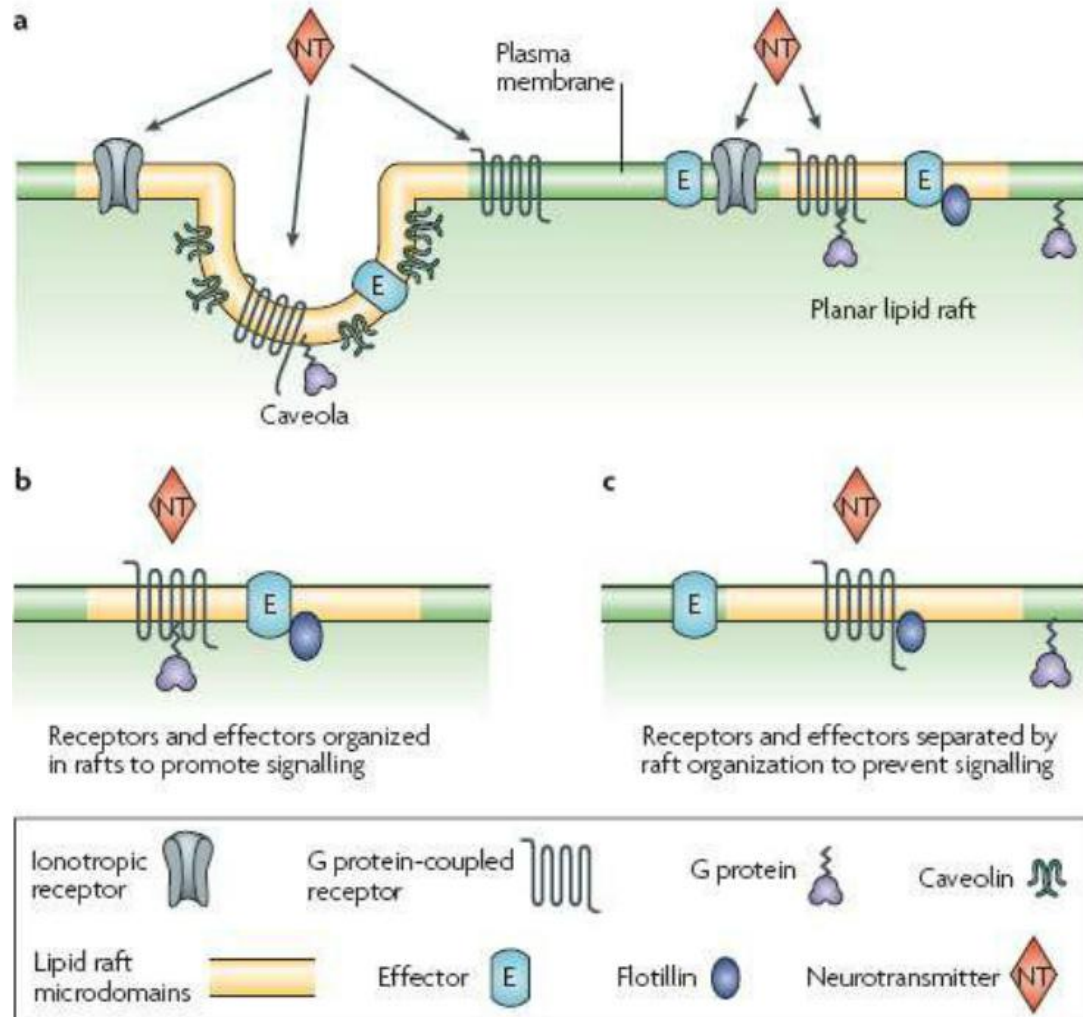
**A. Επίπεδες (δυσδιάστατες) λιπιδιακές σχεδίες**  
**B. Μικροσπήλαια**

**Μικροσπήλαια:** μικρές, φλασκοειδείς εγκολπώσεις ΠΜ εμπλουτισμένες σε σπηλαιΐνη

**Επίπεδες ΛΣ:** εμπλουτισμένες σε φλοτιλίνη-Νευρώνες

Η σπηλαιΐνη και η φλοτιλίνη προσελκύουν πρωτεΐνες-μεταγωγείς σήματος

**Σηματοδότηση:** προάγεται ή ανακόπτεται



## Πρωτεΐνες ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ

**«Συστατικές/διαμένουσες»:**

GPI

Σπηλαιίνη

Φλοτιλίνη

**Σηματοδοτικές:**

G-proteins, tyrosine kinases, μικρές GTPάσες οικογένειας Ras

**Κυτταροσκελετικές/πρόσφυσης:**

Ακτίνη, μυοσίνη, βινκουλίνη, κοφιλίνη, καδερίνη, εζρίνη

Προσελκύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και αποκλείουν άλλες

# Πρωτεΐνες ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ

## MORFs (Modifiers of Raft Function):

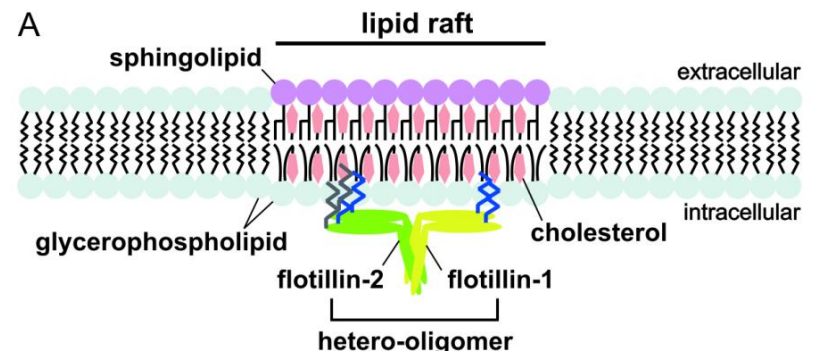
Μεταβάλλουν δομικά/λειτουργικά τις ΛΣχ

Σπηλαΐνη-1 (σε ΛΣχ  $\Rightarrow$  σχηματισμός μικροσπηλαΐου)

Flotillins

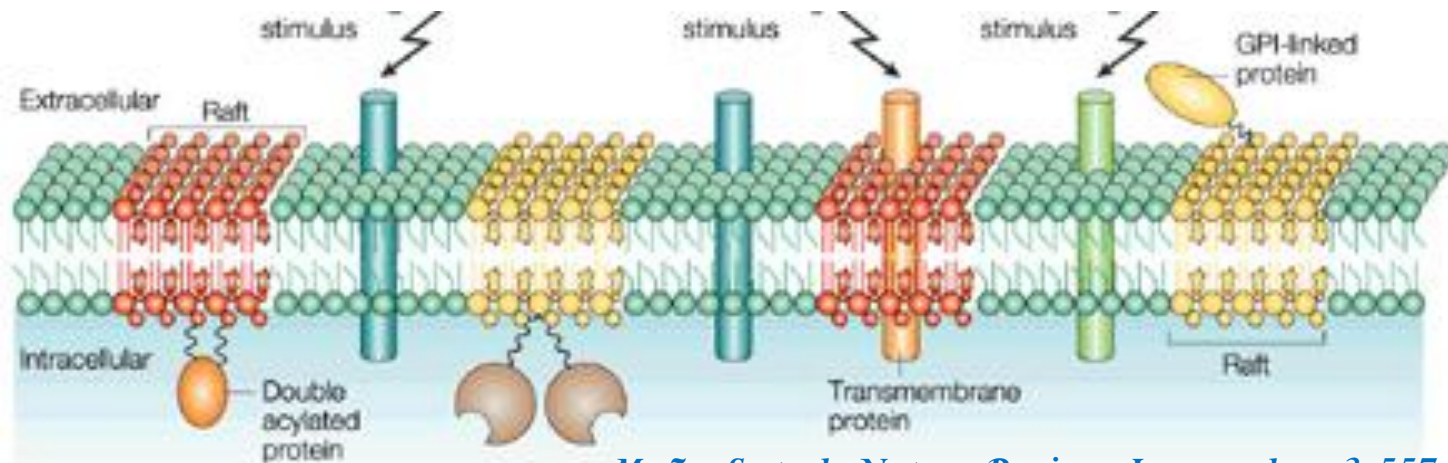
Stomatins

VIP36



Κάθε μία από αυτές μπορεί να είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό **διακριτής ομάδας λιπιδιακών σχεδίων**

## Πρωτεΐνες ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ



*Mañes S et al., Nature Reviews Immunology 3, 557-568; 2003*

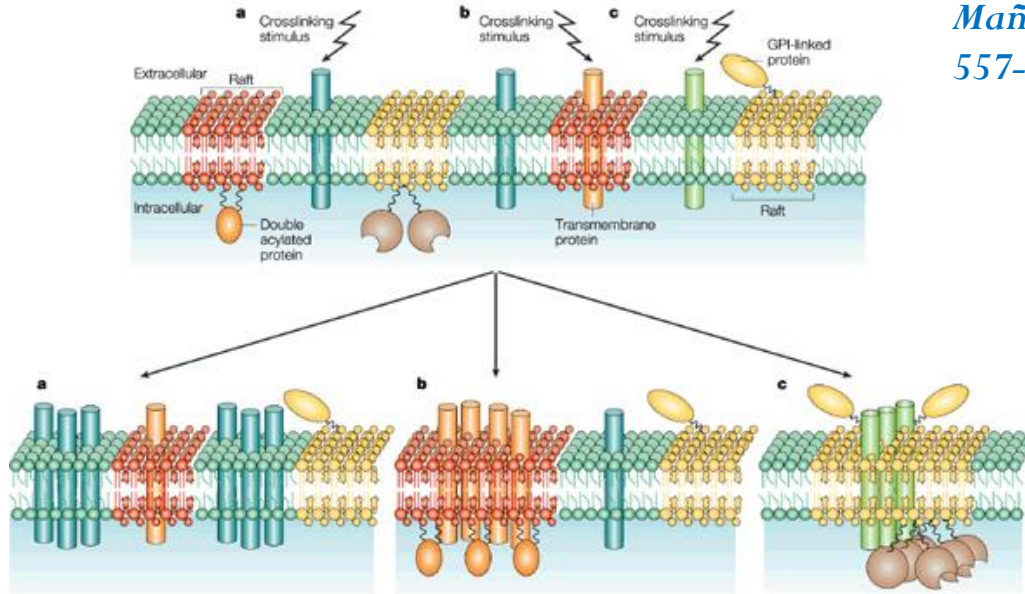
Membrane rafts are **enriched in** specific classes of proteins:  
**glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked proteins** in the **external leaflet** of the bilayer

**acylated proteins** that anchor to the **internal leaflet** and certain **transmembrane proteins**, which might be associated with these domains directly or through raft-associated adaptor proteins.

**distinct raft subtypes** (red and yellow).

# Πρωτεΐνες ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ και Μεταγωγή σήματος

*Mañes S et al., Nature Reviews Immunology 3, 557-568; 2003*



**distinct raft subtypes**  
(red and yellow)

Nature Reviews | Immunology

**hypothetical mechanisms** by which **membrane-phase separation** might regulate **interactions between cell-surface proteins**:

- A)** Stimuli that crosslink a specific non-raft protein would induce the co-clustering of this component only, which would remain segregated from raft elements.
- B)** Stimulation of a specific raft-associated protein would promote raft coalescence and co-clustering of this component with other proteins that are associated with this raft subtype. These clusters remain segregated from non-raft components or proteins that are associated with distinct raft subtypes
- C)** In some cases, proteins that initially partition in non-raft membrane fractions would be recruited to rafts after crosslinking, either by **conformational changes** that enhance their **affinity for rafts** or by **interaction with raft-associated proteins**

# Λιπίδια ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ

Χοληστερόλη

Γλυκοσφιγγολιπίδια, PC

Lipid rafts are thought to form via the aggregation of glycosphingolipids and SM in the **Golgi apparatus** and are then delivered to the **PM** as concentrated **units**

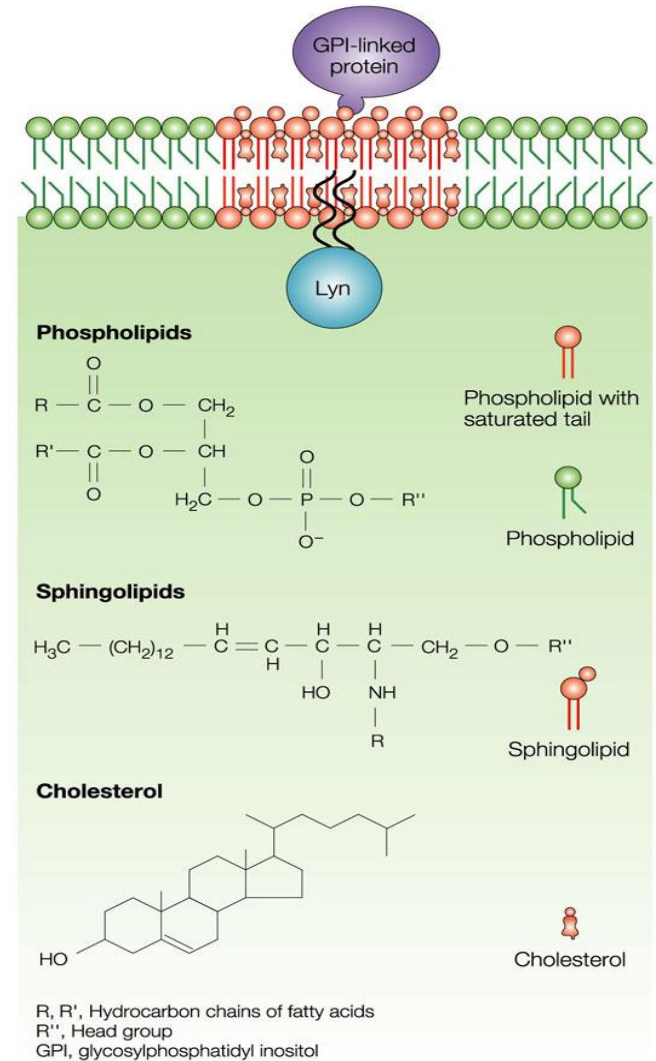
Αλληλεπιδράσεις λιπιδίων-  
λιπιδίων: ασθενείς και παροδικές  
(vs. proteins)

ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ

Πλευρική συγκρότηση

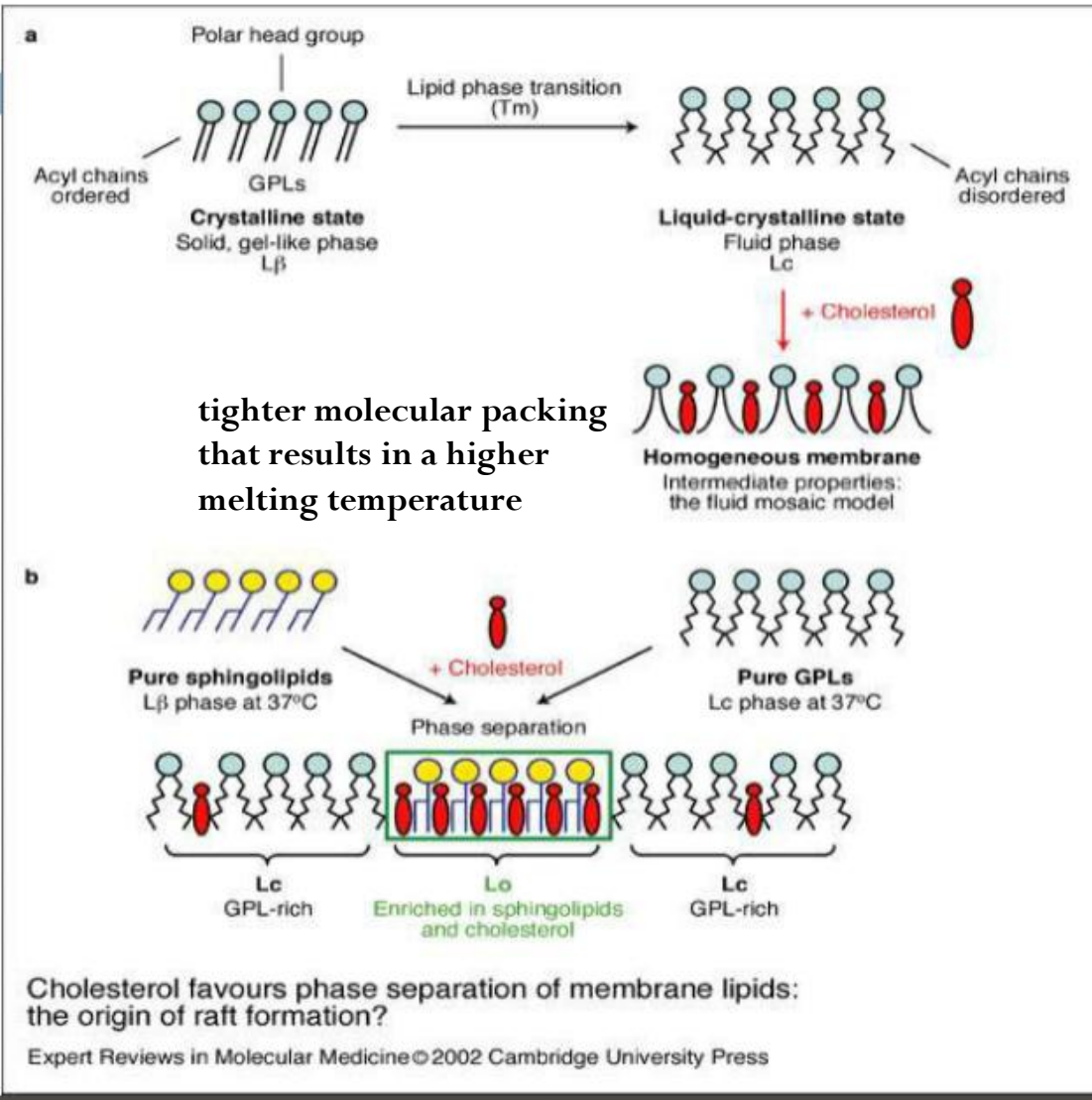
Επιπλέουν στη θάλασσα των GPLs

**Less fluid lipid membrane domains**



Certain lipids (eg. **cholesterol**) change the fluidity, dynamics and lateral structures of cell membranes

## Λιπίδια ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ



**Χοληστερόλη:** συνεκτικός δεσμός ΛΣχ

**Απομάκρυνση χοληστερόλης:** οι περισσότερες πρωτεΐνες αποχωρίζονται από τις ΛΣ

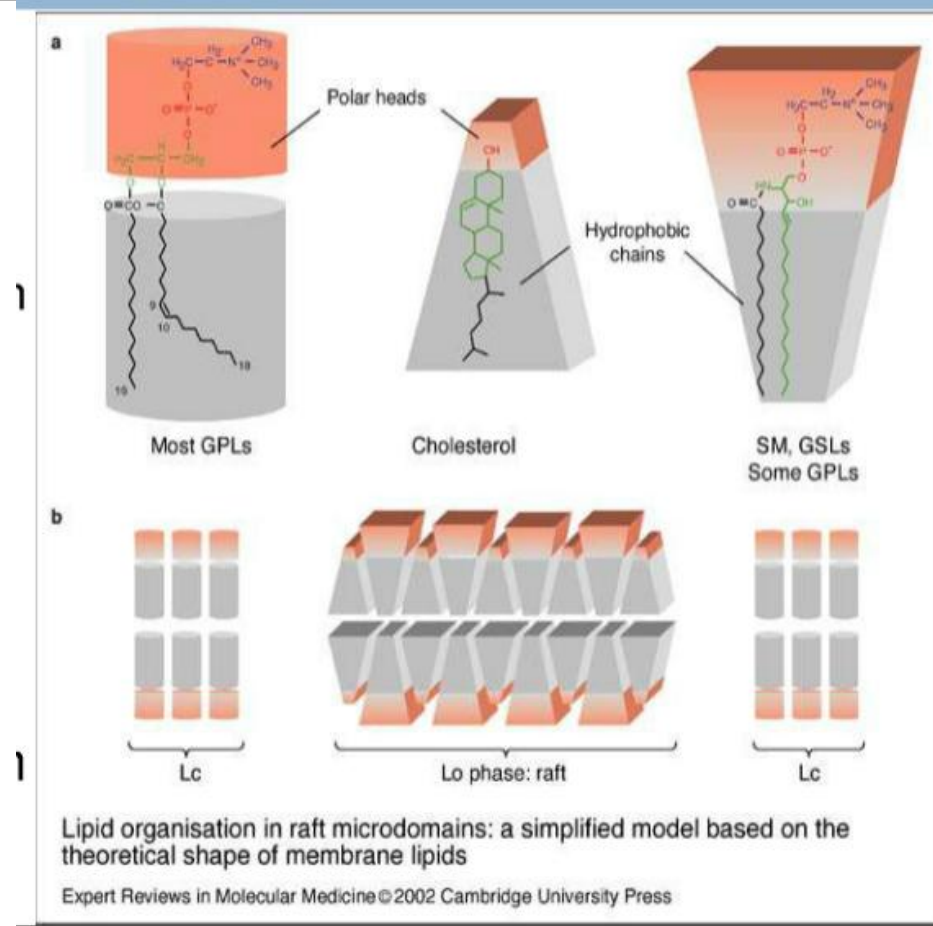
Επίδραση σε μηχανισμό διαλογής και μεταγωγής σήματος πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών



Διαφορετικές βιοφυσικές ιδιότητες γλυκεροφωσφολιπιδίων vs. Σφιγγολιπιδίων

μήκος και βαθμός κορεσμού ακυλικών αλυσίδων  
Αλληλεπιδράσεις van der Waals, υδρογονικοί δεσμοί,

Βαθμός κορεσμού SM: 0.1-0.35 cis διπλούς δεσμούς/μόριο vs. PC με 1.1-1.5 (κόμβοι σε αλυσίδα που αυξάνουν κινητικότητα)



Τα περισσότερα γλυκεροφωσφολιπίδια στις ΜΣ περιέχουν τουλάχιστον μία μονο-ακόρεστη αλυσίδα

SM: συνήθως κορεσμένες αλυσίδες – αλλά όταν ακόρεστες ο διπλός δεσμός βρίσκεται στη θέση C15

Οι σχεδίες ΔΕΝ περιέχουν ΜΟΝΟ φωσφολιπίδια με κορεσμένες ακυλικές αλυσίδες

Protein–lipid interactions within membranes

“hydrophobic matching principle”

**Hydrophobic matching** between the hydrophobic core of the **boundary lipids** in the lipid bilayer and hydrophobic stretches of amino acids in integral **membrane proteins**

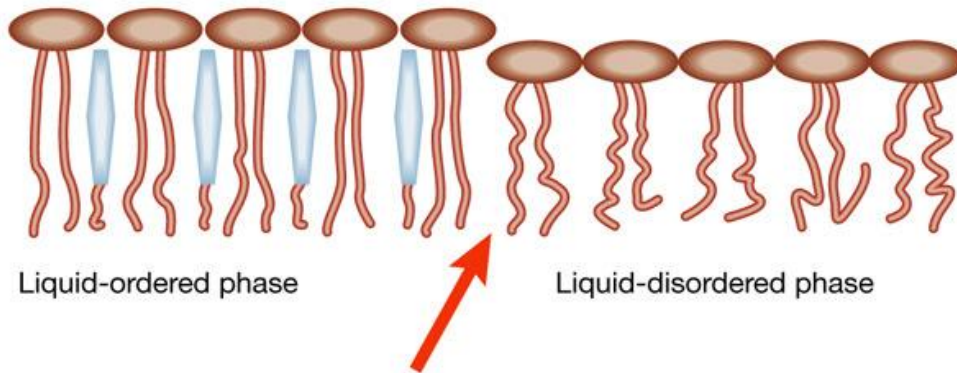
Integral protein's hydrophobic structure must match up with the hydrophobic thickness of the specialized lipid domain to be sequestered into the domain

**Mismatching:** **elastic distortion** of the lipid matrix around the integral membrane Protein-**Energetically unfavorable**

Energy penalty

the integral protein may undergo a **conformational** change or **oligomerization**- This was proposed to potentially cause effects on protein **function**

Οι λιπιδικές σχεδίες είναι **παχύτερες** από άλλες περιοχές της λιπιδικής διπλοστιβάδας (σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη με μακριές και ευθείες αλυσίδες).



Liquid-ordered phase

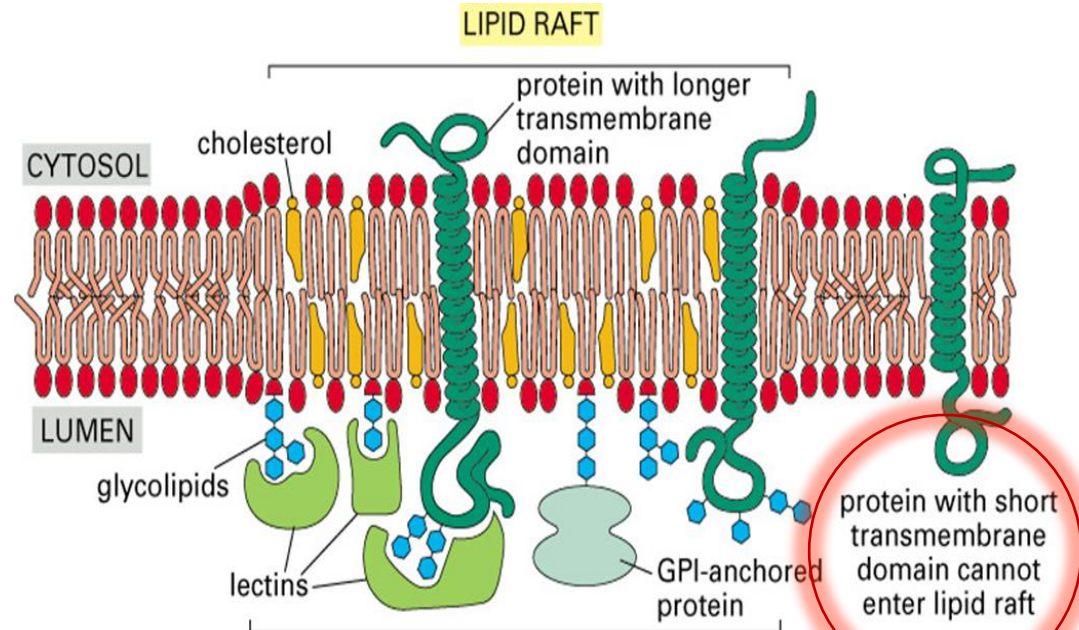
Liquid-disordered phase

Free energy is directly proportional to the boundary length

**Hydrophobic match-sorting** of membrane proteins and lipids in Lipid Rafts

Important role: **cholesterol**

Αυτό το εύρος διευκολύνει τη διευθέτηση μερικών **πρωτεϊνών** οι οποίες και προτιμούν να συγκεντρώνονται εκεί.



LIPID RAFT

CYTOSOL

LUMEN

cholesterol

protein with longer transmembrane domain

glycolipids

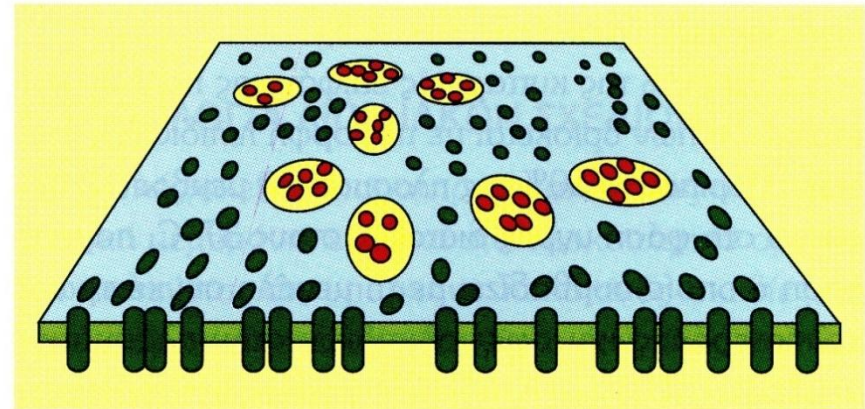
lectins

GPI-anchored protein

protein with short transmembrane domain cannot enter lipid raft

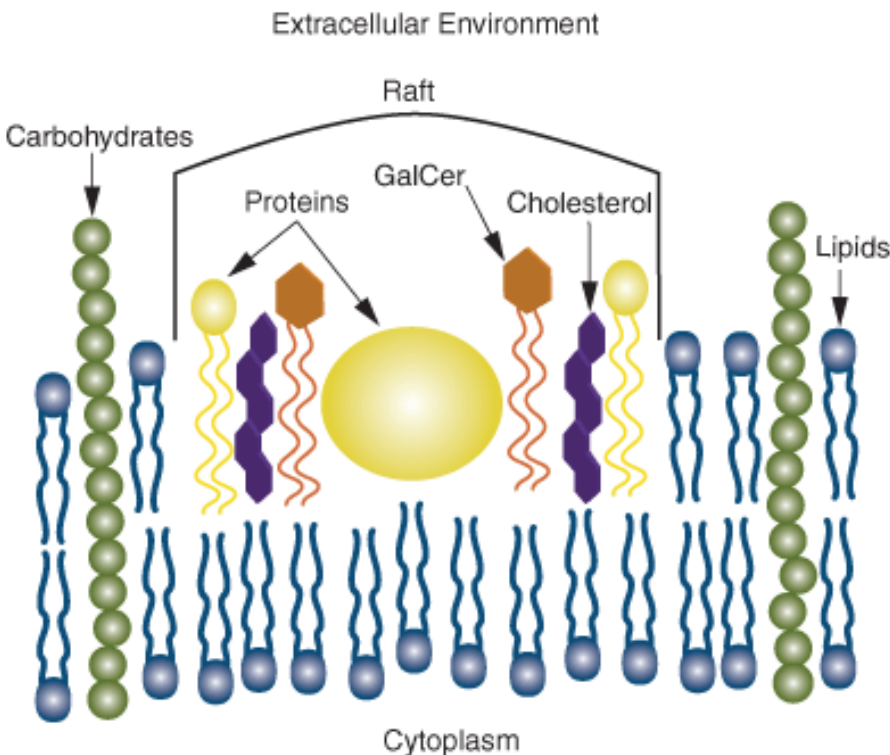
# Integral membrane proteins may be sequestered into lipid rafts

**Εικόνα 2.1.** Οι λιπιδιακές σχεδίες, είναι εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Στις λιπιδιακές σχεδίες υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση ορισμένων πρωτεϊνών (κόκκινες), ενώ ορισμένες άλλες (πράσινες) αποκλείονται από τις περιοχές αυτές. (Από Lee, 2001).



By **modifying the thickness of the hydrophobic cores of membranes** certain integral proteins may be partitioned away from certain cellular membranes into other cellular membranes. (eg. Golgi-PM)

This may be aided by the **differential partitioning of cholesterol**, which tends to segregate away from phospholipids with unsaturated acyl chains **into membrane domains containing phospholipids with saturated acyl chains** where it can form more transient, stable complexes



# Lipid-linked peripheral proteins can also be caught up in Lipid Rafts

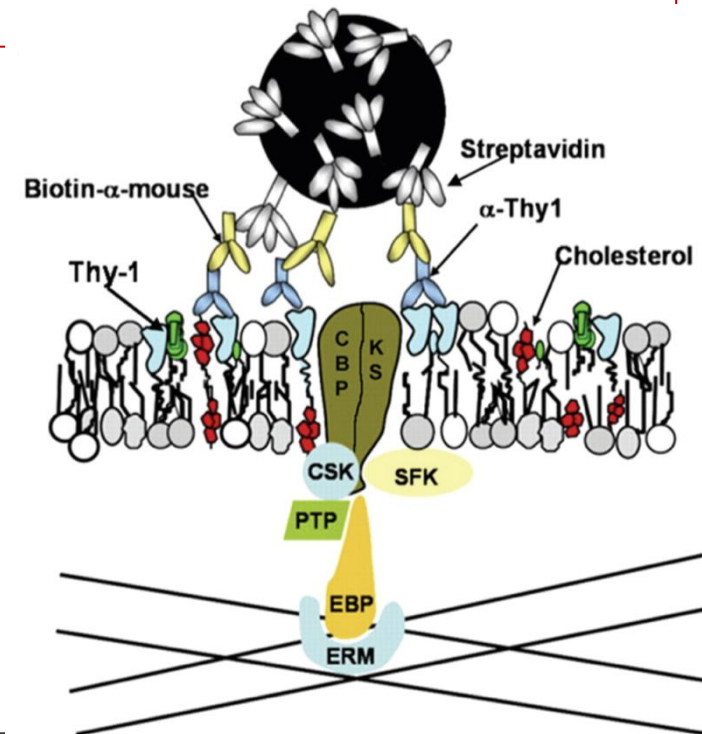
**GPI-anchored proteins** in the PM can be incorporated into **lipid rafts**

active process involving **actin-containing cytoskeletal elements** that draw small **nano-sized** clusters of **GPI-anchored proteins** (of 4 molecules or even less) into larger lipid domains of **<450 nm**

Once in the larger domains, the GPI-anchored proteins can undergo further **diffusion** (“hop diffusion”) between other actin-regulated domains **with an average dwell time per domain of 1–3 ms**

In the case of the **Thy-1** GPI-anchored protein/lipid raft, a complex of the **trans-membrane Src kinase**, along with another **integral membrane protein** (carboxyl-terminal Src kinase-binding protein) appears to be the trans-membrane **link to the actin-cytoskeleton**

*Chen et al.,: The transmembrane protein CBP plays a role in transiently anchoring small clusters of Thy-1, a GPI-anchored protein, to the cytoskeleton. J Cell Sci 2009, 122:3966-72.*



Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών μορίων και η **σταθερότητα των ΛΣχ** επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες

➤ Συγγένεια σύνδεσης

➤ **Ca<sup>++</sup>**: πρωτεΐνες με domains C2, PH

➤ Πρόσδεση **συνδεδεμένων με λιπίδια πρωτεϊνών**: σταθεροποίηση προσχηματισμένων περιοχών, υποδοχή cyt πρωτεϊνών (PL, kinases, skeletal proteins)

➤ **Υπομεμβρανικό δίκτυο ακτίνης**: περιορίζει πλευρική κινητικότητα ΛΣχ-Αυξάνει σταθερότητα

❖ **Αννεξίνες**: προάγουν σχηματισμό συμπλόκων μεμβράνης-Sk ⇒ ελέγχουν συγκρότηση ΛΣχ

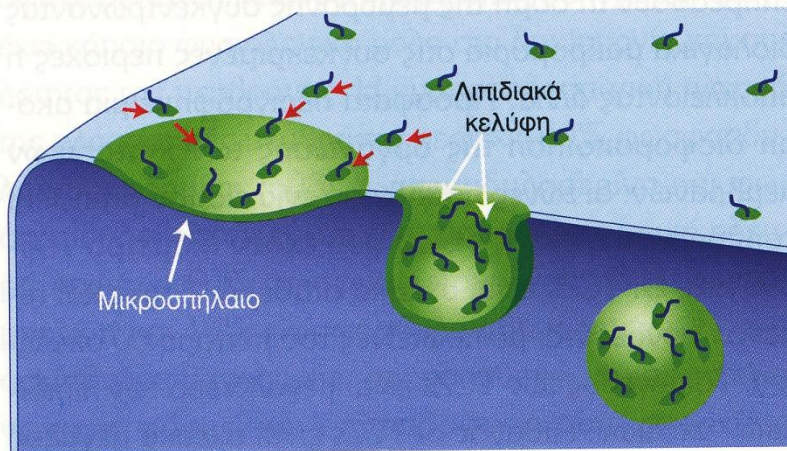
❖ **Ακτίνη**: συμμετέχει άμεσα σε ενδοκυτταρική μετακίνηση μεταφορικών κυστιδίων που περιέχουν ΛΣχ

➤ Σχηματισμός περιοχών διαμέσου **ενζυματικής κατάλυσης λιπιδίων** (πχ. PLC to DAG ⇒ PKC\*)

## Υπόθεση θεωρητική: οι Λιπιδιακές Σχεδίες σχηματίζονται **από Λιπιδιακά Κελύφη**

Μικρές, δυναμικές, θερμοδυναμικά σταθερές, πλευρικά κινούμενες, εκλεκτικές συγκροτήσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες και συγκεκριμένα λιπίδια

Κατευθύνουν την πρωτεΐνη που περιβάλλουν σε προϋπάρχουσες ΛΣχ ή μικροσπήλαια



**Εικόνα 1.9.** Τα λιπιδιακά κελύφη (πράσινα) περιβάλλουν συγκεκριμένη πρωτεΐνη (μπλε) και συμβάλλουν στη διαλογή και τη μετακίνησή της σε συγκεκριμένες μεμβρανικές περιοχές, όπως π.χ. στα μικροσπήλαια. (Από Anderson και Jacobson, 2002).

## Two models for membrane microdomains

**MODEL 1  
RAFT INTERACTION**  
Proteins drawn together by lipid-protein interaction



**MODEL 2  
PROTEIN INTERACTION**  
Proteins drawn together by protein-protein interaction



### Experimental Results

	Lat mutant (protein)	Lat mutant (lipid)	LcK	LcK mutant (protein)
Rafts	✓	x	✓	✓
P-P interact	x	✓	✓	x
Cluster	x	✓	✓	x



## Μέγεθος λιπιδιακών σχεδίων

10-200nm , μέση διάμετρος 50-60nm

52nm: 3,500 μόρια λιπιδίων, δυνητικά 50-60 πρωτεΐνες (λίγες μόνο, GPI)

**Σε ηρεμία:** Μικρές (10nm)/ασταθείς ΛΣχ (διάρκεια ζωής 10-20msec)



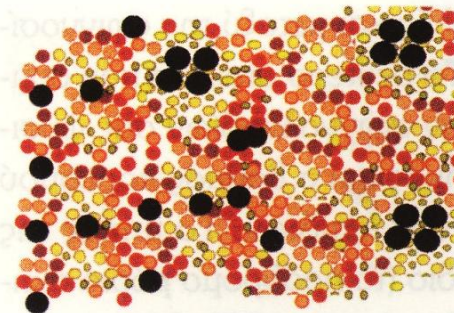
**Κυτταρική διέγερση:** Ενεργοποίηση και συσσωμάτωση υποδοχέων σε ΛΣχ  $\Rightarrow$  αύξηση **μεγέθους** (70-300nm) και **σταθερότητας** ΛΣχ (λίγα λεπτά) - **LIPID PLATFORMS**

**Larger Signaling Rafts-Clustering and stabilization of raft molecules**

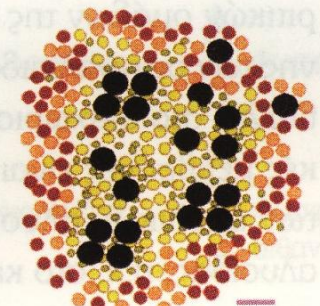
©Dennis Holmes Designs \* illustrationsOf.com/65510

**Εικόνα 2.3.** Τα δομικά συστατικά των λιπιδιακών σχεδίων προϋπάρχουν ως μικρά, δυναμικά, συσσωματώματα λιπιδίων μαζί με μονομερή και σχηματίζουν μεγαλύτερες, λειτουργικές λιπιδιακές σχεδίες μόνο μετά από επαγωγή. Οι μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τις GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι κόκκινοι και ροζ κύκλοι τα γλυκεροφωσfolιπίδια, οι κίτρινοι κύκλοι τα λιπίδια της λιπιδιακής σχεδίας και οι πράσινοι κύκλοι τη χοληστερόλη. (Από Mayor και Rao, 2004).

## Submicro- or nano-sized domains



Προϋπάρχουσα οργάνωση

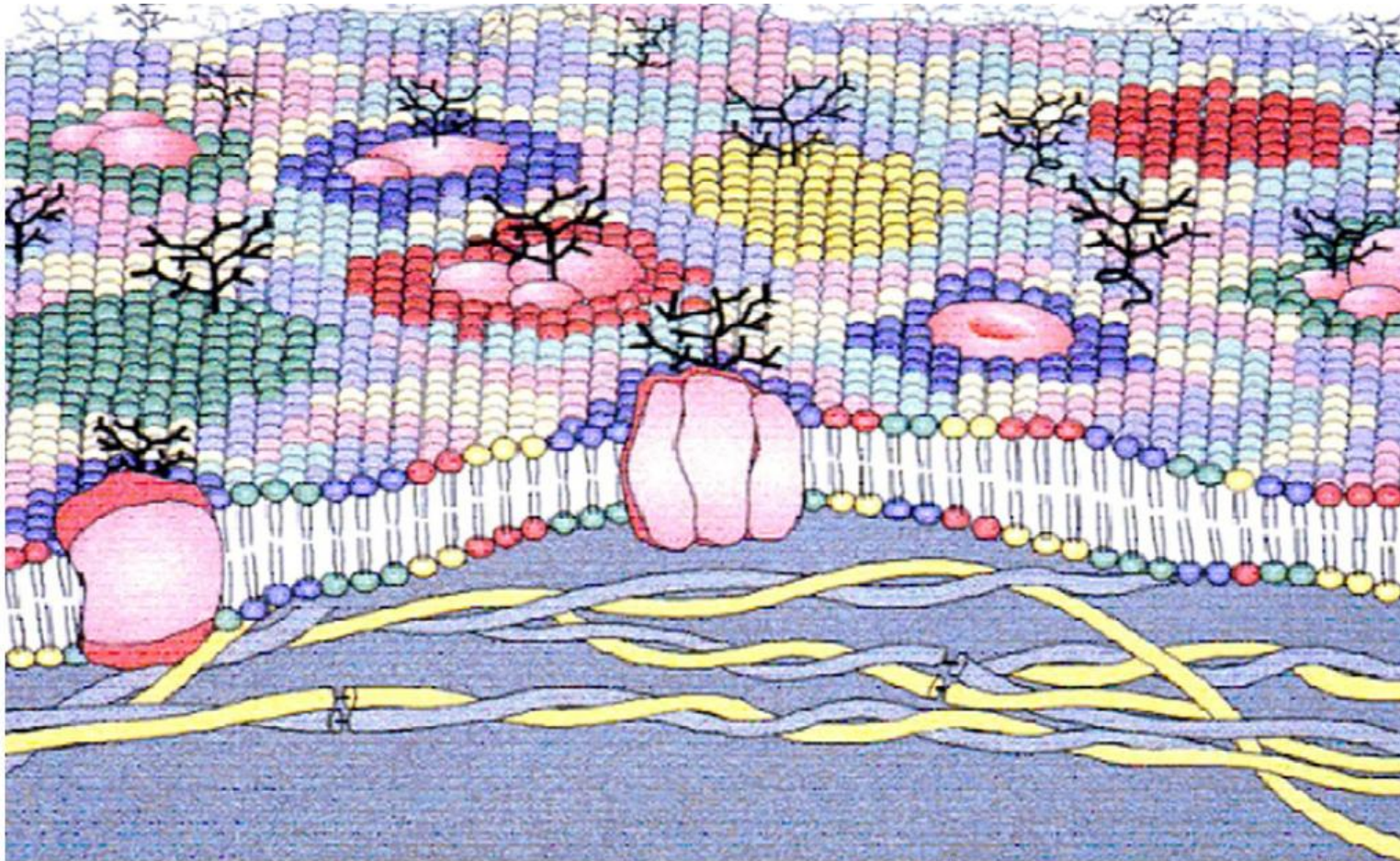


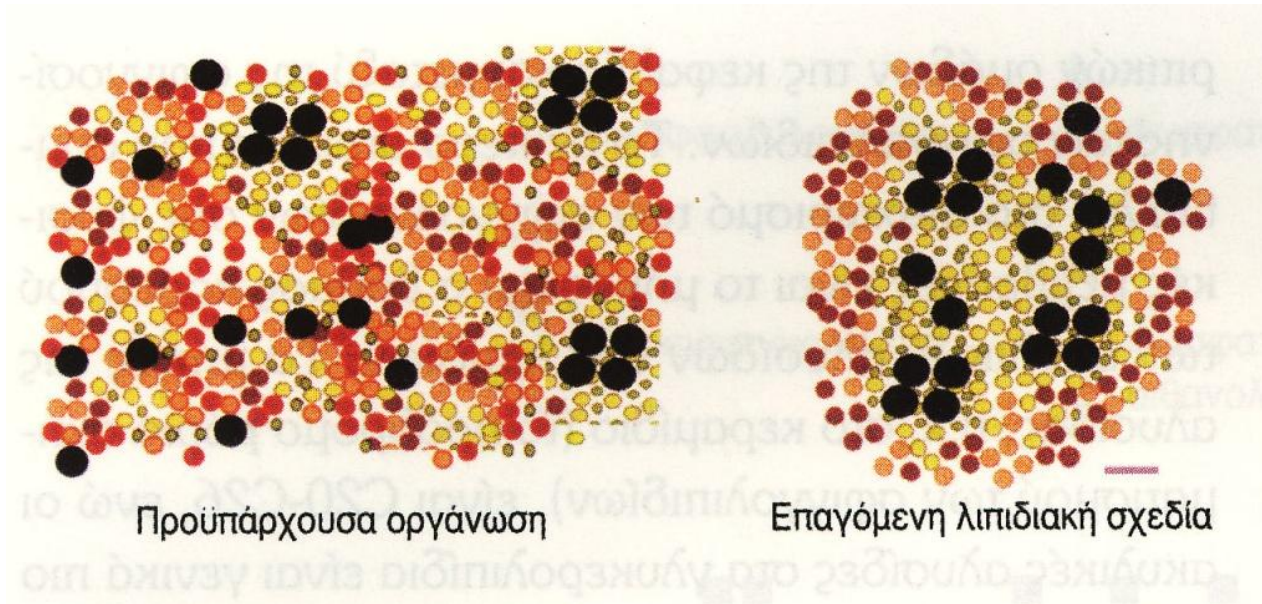
Επαγόμενη λιπιδιακή σχεδία

schematic illustration of a **modification of the Fluid—Mosaic Membrane Model**

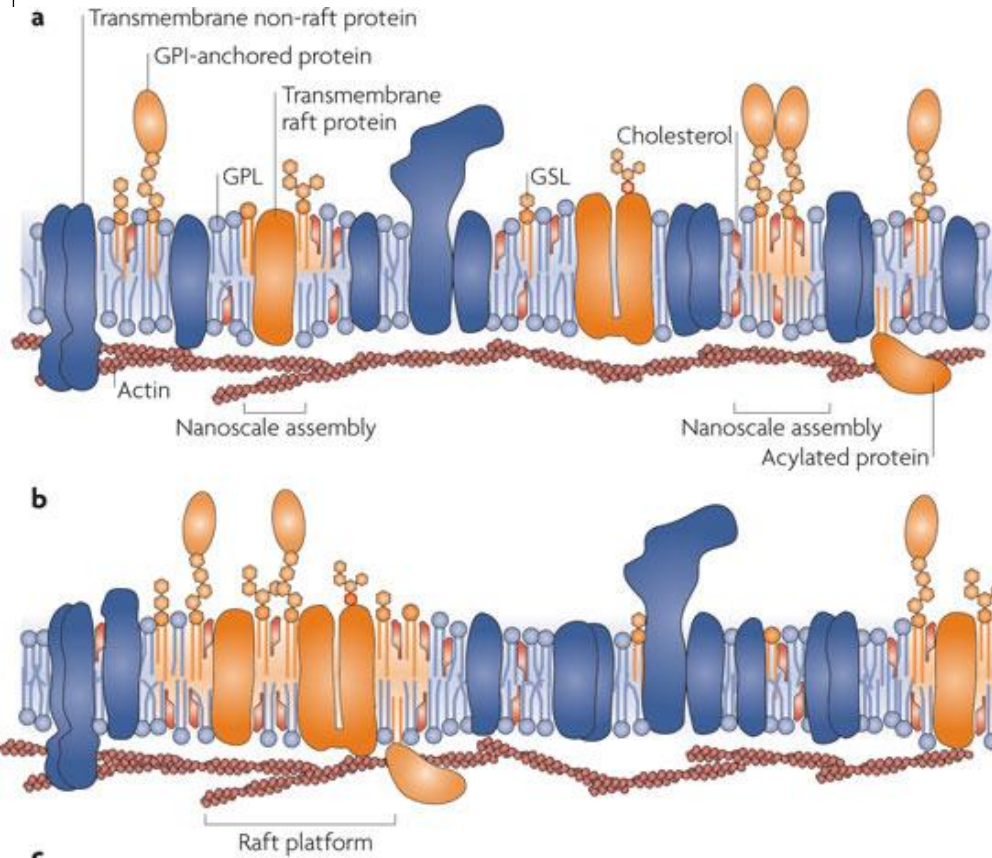
**Lipids form specialized domains** around integral membrane **proteins** and glycoproteins and are **asymmetrically distributed** across the membrane

*molecules in biological membranes exist as **non-uniform, non-random** cooperative elements in **thermodynamic equilibrium phases** with compositional fluctuations. Membrane molecules can exist in **domains** of small-scale **nano-sized** structures to domains of **micrometer size** or more in the membrane plane.*





- A) «**Αποθεματικές**»: μικρές και με σύντομη διάρκεια ζωής  
Ταχεία διάχυση συστατικών μορίων  $\Rightarrow$  γρήγορη επίτευξη σωστού εντοπισμού για μεταγωγή σήματος
- B) «**Receptor-cluster rafts**»: μεγάλο μέγεθος και χρόνο ημιζωής, σταθεροποιημένες  
Διευκολύνουν ενσωμάτωση διαφορετικών βασικών σηματοδοτικών μορίων



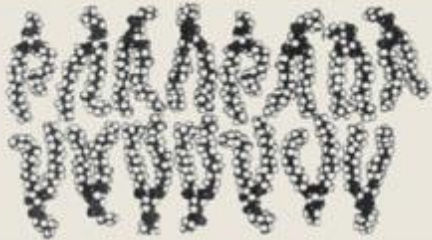
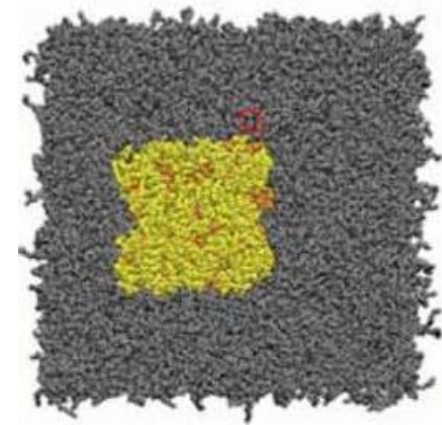
**a | Nanoscale assemblies** of sterols such as **cholesterol**, sphingolipids such as **SM** and glycosphingolipids (**GSLs**), and **proteins** in the PM fluctuate in composition. **GPI-anchored proteins**, **transmembrane raft proteins** and **acylated cytosolic proteins** are postulated constituents of these assemblies, which can be modulated by **actin filaments**. Not much is known about the state of nanoscale assemblies in the cytosolic leaflet of the membrane.

*Transmembrane non-raft proteins are excluded from these assemblies.*

**b | In response to external signals** or the initiation of membrane trafficking events, **raft platforms** are formed from fluctuating assemblies through **lipid–lipid**, **lipid–protein** and **protein–protein** oligomerizing interactions. (membrane signalling and membrane trafficking).

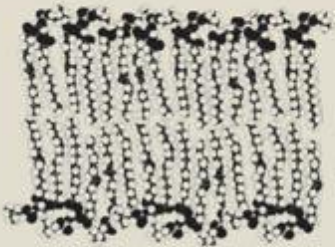
# Πού βρίσκονται?

Κυρίως στην ΠΜ (και στα οργανίδια-Διαφορετικές)



Liquid-crystalline,  
liquid-disordered  
 $l_d$  ( $L_d$  or  $L_{\alpha}$ )

$S$  = Low  
 $D_T$  = Fast ( $\sim 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )



Solid gel  
 $s_o$  (or  $L_{\beta}$ )

$S$  = High  
 $D_T$  = Slow ( $10^{-3} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )



Liquid-ordered,  
'raft'  
 $l_o$  (or  $L_o$ )

$S$  = High  
 $D_T$  = Fast ( $\sim 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )

Το **70-80%** της **κυτταρικής επιφάνειας** πολλών κυτταρικών τύπων βρίσκεται με τη μορφή των ΛΣΧ

**50%** της ΠΜ βρίσκεται σε φάση υγρής διάταξης στους 37°C

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

## Πού βρίσκονται?

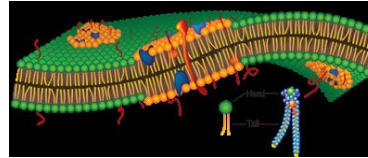
- Ενδοσώματα ανακύκλωσης (πλούσια σε SM/χοληστερόλη)
- Τελικά ενδοσώματα/Lys: λιγότερες, λόγω διαφορετικής σύστασης (ουδέτερα λιπίδια)
- Μικρολάχνες εντεροκυττάρων:
  - A) επιφάνεια μικρολαχνών οργανώνεται με τη μορφή ιδιόρρυθμων ΛΣχ: σταθερές δομές, γλυκολιπίδια και δισθενής λεκτίνη γαλεκτίνη-4.
  - B) Πλευρική μεμβράνη μικρολαχνών: κύριο συστατικό χοληστερόλη.

Διαφορετική σύσταση  $\Rightarrow$  διαφορετικές λειτουργίες  
(πολυδυναμικές μικροπεριοχές, προσαρμοζόμενες κατά μέγεθος/σχήμα/σύσταση ανάλογα με την κυτταρική λειτουργία)

## ΛΣχ υπάρχουν στην ΕΞ και στη ΕΣ λιπιδιακή μονοστιβάδα

Διαφορετικό μέγεθος, σύσταση, χρόνο ημιζωής

**ΕΞ:** μικρές/ασταθείς σχεδίες, ελάχιστες πρωτεΐνες, ελάχιστη διάρκεια ζωής-Αλλάζουν σε μέγεθος κ σταθερότητα με **ενεργοποίηση** υποδοχέων κ ολιγομερισμό (λίγα λεπτά)

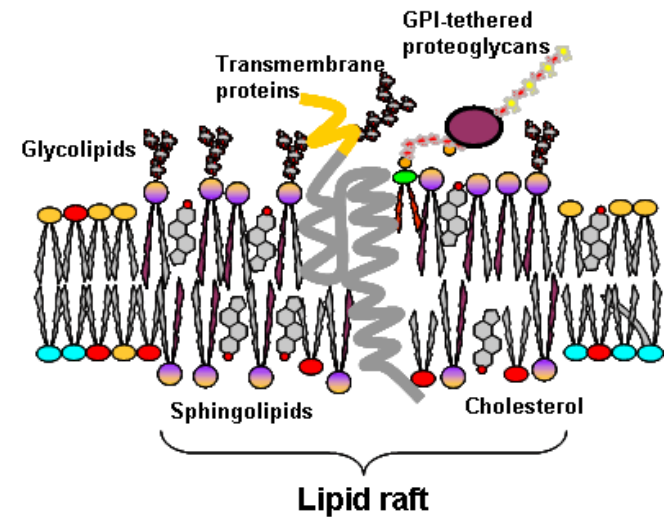
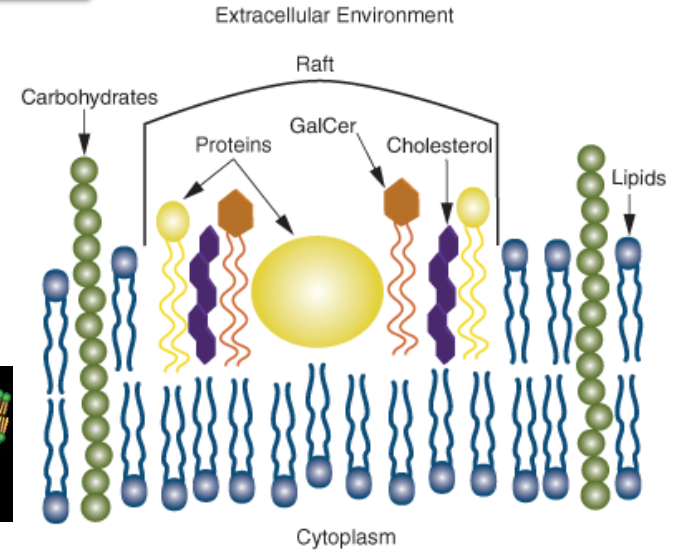


**ΕΣ:** **μόνο** μικρές/ασταθείς/πολύ μικρή διάρκεια ημιζωής/με ένα μόνο μόριο τελεστή μονοπατιού

Δομική/λειτουργική αλληλεπίδραση: **σύντομη**

**Συνένωση:** **παροδική** και εξαρτώμενη από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Όταν δεν ταιριάζουν απόλυτα: **Καμπυλότητα** μεμβράνης



## Λσχ υπάρχουν στην ΕΞ και στη ΕΣ λιπιδιακή μονοστιβάδα

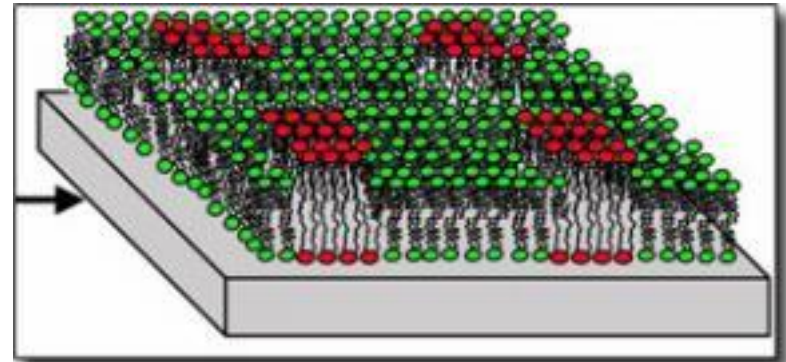
Δομική/λειτουργική αλληλεπίδραση αλλά **δεν «καθρεφτίζονται»**

### Ασυμμετρία:

**ΕΞ μονοστιβάδα:** πλούσιες σε **SM** και **χοληστερόλη**

**ΕΣ μονοστιβάδα:** πλούσιες σε **PC** και **χοληστερόλη** ή **PE** και **χοληστερόλη**

λιγότερο σταθερές, **40nm**, **20-30%** της επιφάνειας

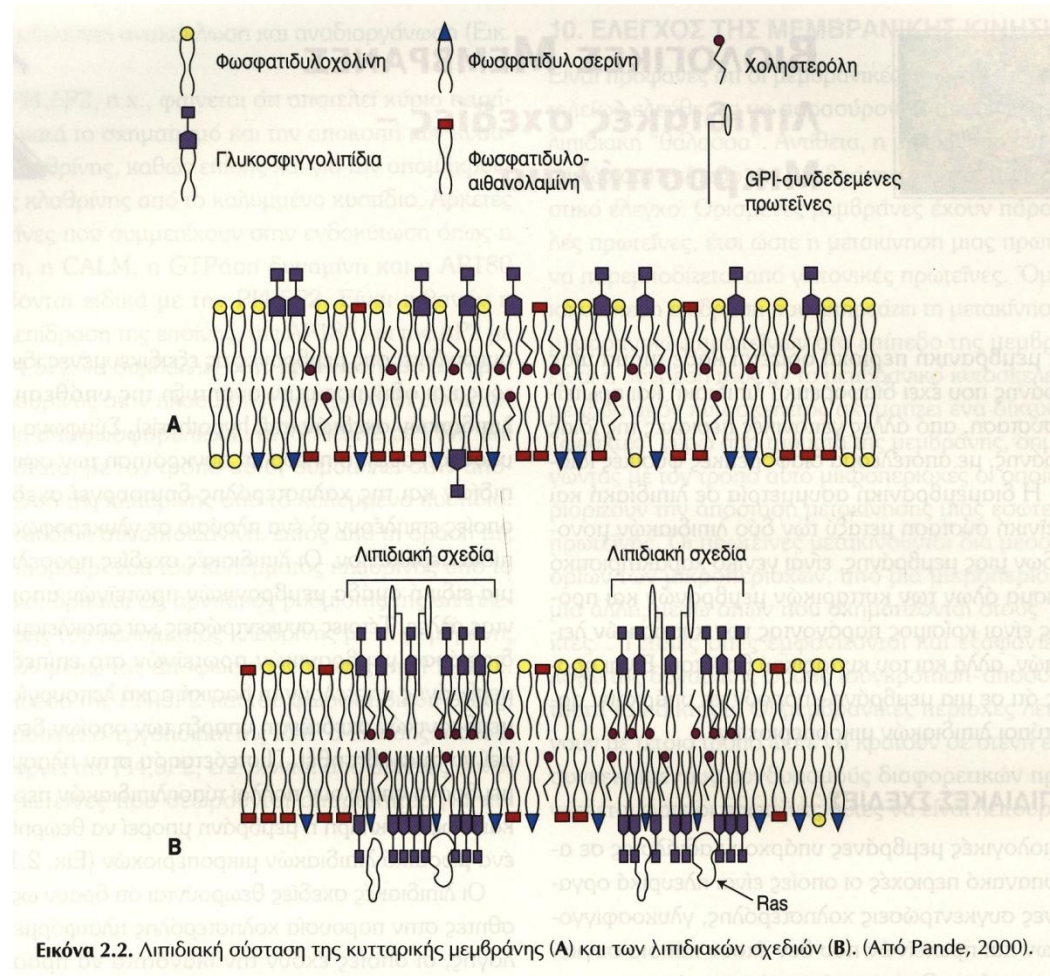




## Κατεύθυνση πρωτεϊνών σε ΛΣχ

**1) Τροποποίηση λιπιδίων:** Μικρές **GTPάσες** της οικογένειας **Ras** συνδέονται με λιπίδια **Rafts ΕΣ** μονοστιβάδας μετά από δομικές τροποποιήσεις λιπιδίων

**2) Τροποποιήσεις πρωτεϊνών:** προσθήκη **μυριστικών** και **παλμιτικών** ομάδων στην υπομονάδα **Gα** των ετεροτριμερών **G πρωτεϊνών** είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή της πρωτεΐνης στις ΛΣχ



## Μέθοδοι μελέτης

**Μικρό μέγεθος** (κάτω από το όριο ανάλυσης οπτικού μικροσκοπίου, οπτικής διάθλασης 250nm)

Δύσκολη η μελέτη τους σε άθικτα κύτταρα

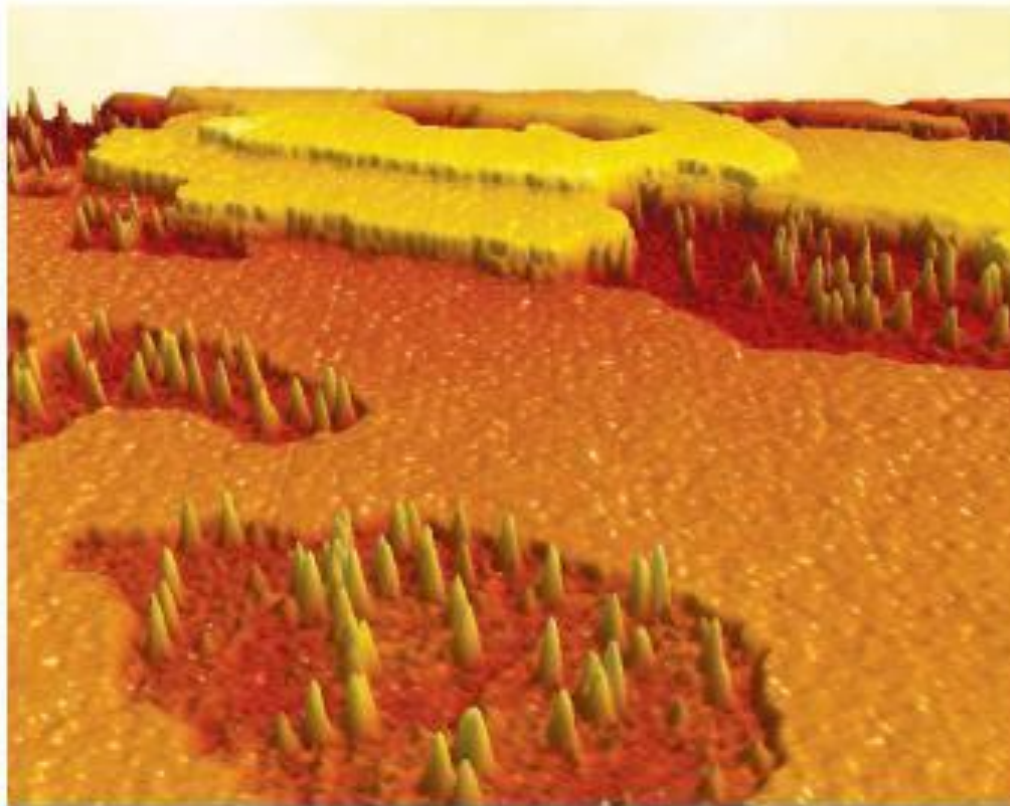
**Απομόνωση DRM:** ΛΣχ αδιάλυτες σε μη-ιοντικά απορρυπαντικά (Triton X-100)

**Ηλεκτρονική Μικροσκοπία:** τοπολογία συστατικών, συσσωματώματα πρωτεϊνών

**FRET:** καθορίζει χωροταξική απόσταση, αλληλεπιδράσεις 2 συστατικών (fluorescence resonance energy transfer )

**FRAP:** ανιχνευτής (probe) συσχέτισης πρωτεϊνών σε ΛΣχ και μελέτη διάχυσης σε αυτές (Fluorescence Recovery After Photobleaching, epifluorescence microscope)

+/\_ **χοληστερόλη** στο πειραματικό σύστημα



**Where's the raft?** An atomic force microscope image traces lipids and proteins (spikes) in a plasma membrane.

# Λειτουργίες Λιπιδιακών Σχεδιών

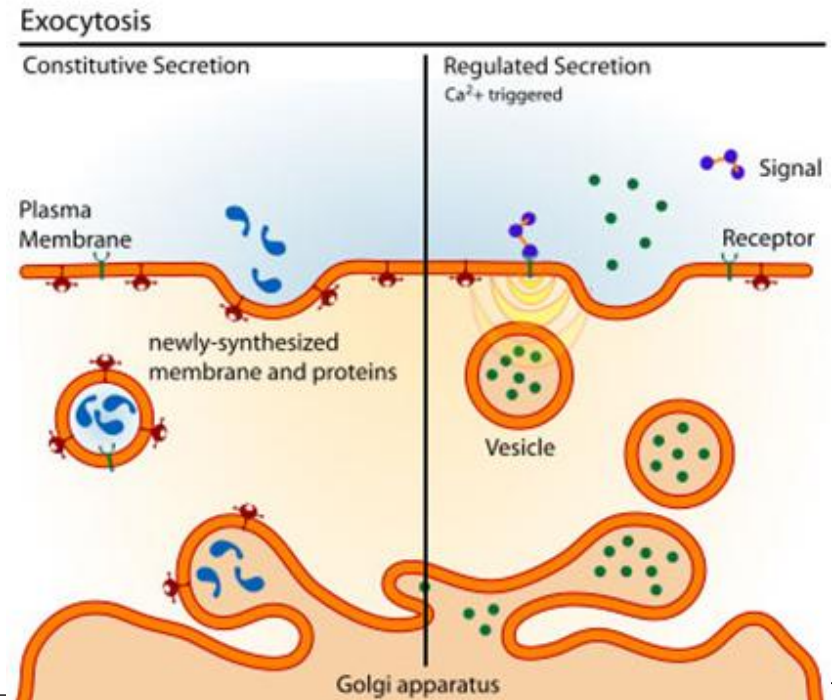
## 1. Διαχωρισμός/Διαλογή και μετακίνηση πρωτεϊνών στο εκκριτικό και ενδοκυτικό μονοπάτι

✓ Συνεχής (κυστίδια) και η ρυθμιζόμενη (εκκριτικά κοκκία) έκκριση φορτίου από TNG σε ΠΜ: χρήση ΛΣχ

Διαχωρισμός νεοσχηματιζόμενων πρωτεϊνών, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, κοκκία ζυμογόνου (πάγκρεας), έκκριση αμυλάσης κλπ (χοληστερόλη/σφιγγολιπίδια)

✓ Κυκλοφορία από τα ενδοσώματα στη συσκευή Golgi: επηρεάζεται από αριθμό ΛΣχ

✓ Ενδοκύτωση που δεν εξαρτάται από την κλαθρίνη

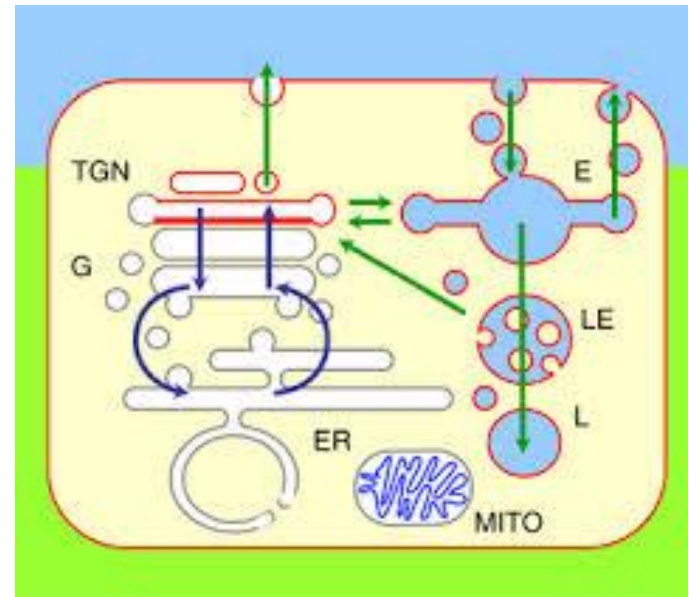


## Διαλογή-Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ)

**Διαλογή GPI-proteins** στο ΕΔ και σύνδεσή τους με ΛΣχ ΕΔ ([σακχαρομύκητας vs. mammalian](#))

Εξέρχονται από το ΕΔ με διαφορετικά/**εξειδικευμένα κυστίδια** (άλλες εκκριτικές/μεμβρανικές)

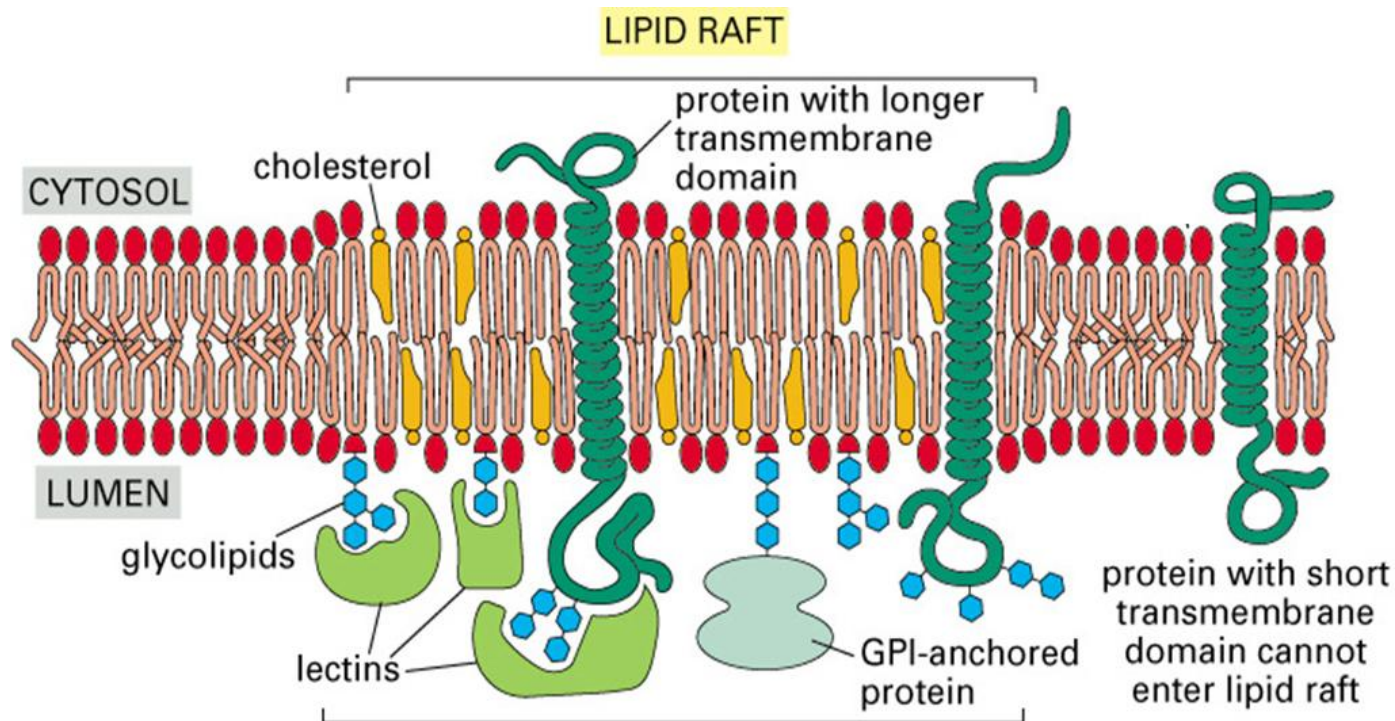
Μεταφορά ΕΔ → Golgi: σύνθεση **κεραμιδίου**



## Διαλογή- Συσκευή Golgi

Σε επιθηλιακά και μη κύτταρα:

**GPI-proteins:** ενώνονται με **ΛΣχ** καθώς διέρχονται τους σάκους της συσκευής (χοληστερόλη/σφιγγολιπίδια και μετακίνηση GPI-proteins)

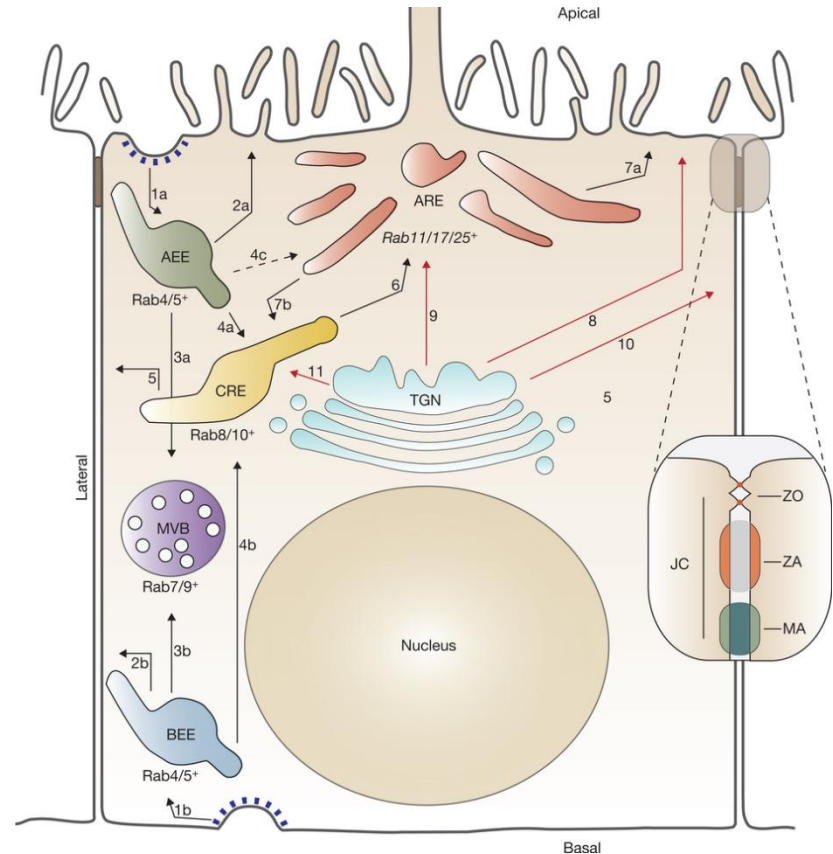


**Εικόνα 2.4.** Στις λιπιδιακές σχεδίες του TGN ενώνονται οι GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Μembrανικές πρωτεΐνες με μεγάλα διαμεμβρανικά τμήματα επίσης μπορεί να ενσωματωθούν στις λιπιδιακές σχεδίες. Λεκτίνες που βρίσκονται στον αγωγό του TGN πιθανόν βοηθούν στη σταθεροποίηση της λιπιδιακής σχεδίας και τη διαλογή πρωτεϊνών. (Από Alberts και συν., 2002).

## Διαλογή- Συσκευή Golgi

Διαλογή και στόχευση (σε κορυφαίο τμήμα **επιθηλιακών κυττάρων** ή σε βασικο-πλευρική περιοχή) σε 2 στάδια/συνθήκες:

1. Ένωση GPI-proteins σε ΛΣχ Golgi (στόχευση και στις δύο περιοχές)
2. Ολιγομερισμός σε μεγαλύτερα σύμπλοκα (στόχευση σε κορυφαία περιοχή, καλύτερη σταθεροποίηση σε ΛΣχ (συνένωση μικρών ΛΣχ))



## Διαλογή-ΠΜ, ενδοσώματα, Λυσοσώματα

### ΠΜ: εσωτερίκευση και στόχευση γλυκοσφιγγολιπιδίων (GSLs)

Εσωτερίκευση διαμέσου μικροσπηλαίων – σύντηξη κυστιδίων με αρχικά ενδοσώματα και μετά στόχευση (χοληστερόλη):

- A) τελικά ενδοσώματα → Golgi (είτε)
- B) ενδοσώματα ανακύκλωσης → ΠΜ

### ΠΜ: εσωτερίκευση και ανακύκλωση GPI-proteins. 2models:

1. Συσσωμάτωση (αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνη- πρωτεΐνη) → εσωτερίκευση διαμέσου μικροσπηλαίων
2. Ένωση με πρωτεΐνες ΠΜ που φέρουν σήμα εσωτερίκευσης με το μηχανισμό της κλαθρίνης (πχ. CD14) → εσωτερίκευση διαμέσου καλυμμένων εσοχών

Στην πλειονότητα: αρχικά ενδοσώματα → ενδοσώματα ανακύκλωσης → ΠΜ (x3-4 rate)

(διαλογή για ανακύκλωση και ταχύτητα εξαρτάται από ποσά χοληστερόλης /σφιγγολιπιδίων)



## Διαλογή-ΠΜ, ενδοσώματα, Λυσοσώματα

### ΠΜ: εσωτερίκευση, διαλογή και στόχευση GPI-proteins σε τελικά ενδοσώματα

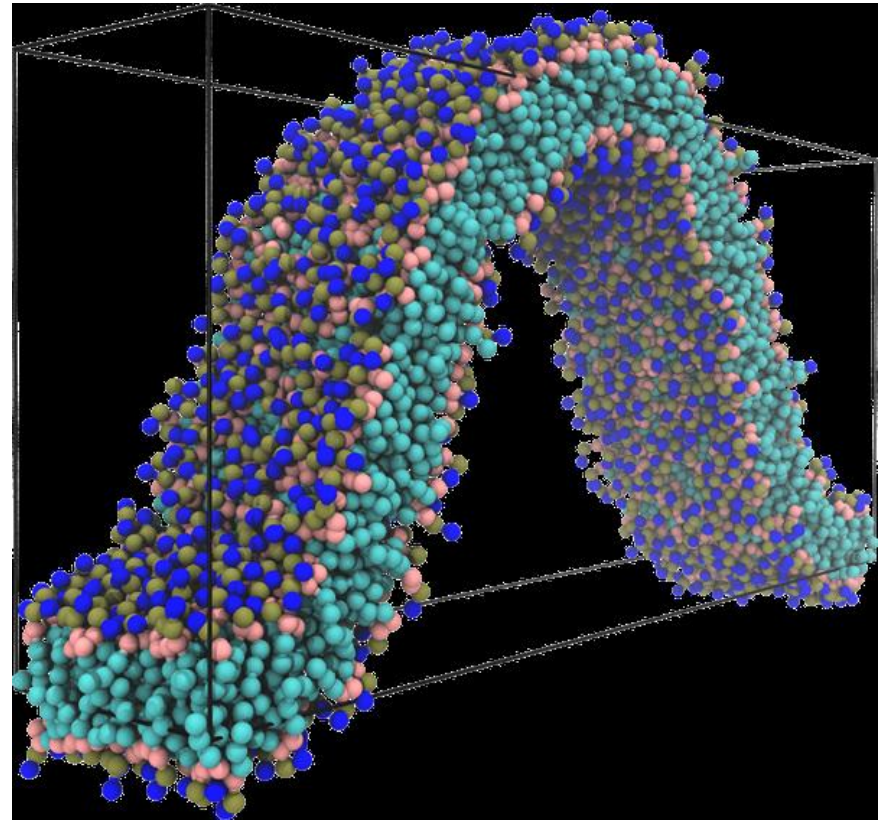
- ❑ Ο ολιγομερισμός των GPI-proteins είναι κριτήριο διαλογής για στόχευση σε ενδοσώματα ανακύκλωσης ή τελικά ενδοσώματα
- ❑ MDCK κύτταρα: τα ενδοσώματα ανακύκλωσης είναι εμπλουτισμένα σε SM/χοληστερόλη ενώ δεν υπάρχουν ΛΣχ στο μονοπάτι που οδηγεί στα Lys

## Ενδοκυτταρική κυκλοφορία

Λιπιδιακές σχεδίες: τμήμα μηχανισμού εξασφάλισης **σωστής ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας** πρωτεϊνών και λιπιδίων - **Εξω- ενδοκύτωση**

### 1. Σχηματισμός μεμβρανικών μεταφορικών κυστιδίων

- (1α. προσθήκη λιπιδίων στη μονοστιβάδα ⇒ **καμπυλότητα διπλοστιβάδας** ⇒ αναδίπλωση μεμβράνης  
1β. Αλλαγή σε καμπυλότητα μονοστιβάδας ⇒ αλλαγή σε καμπυλότητα διπλοστιβάδας προς την ίδια κατεύθυνση)

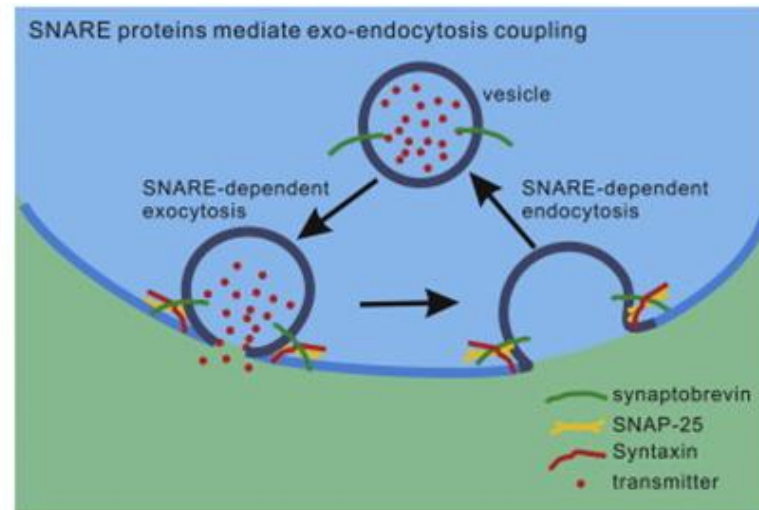
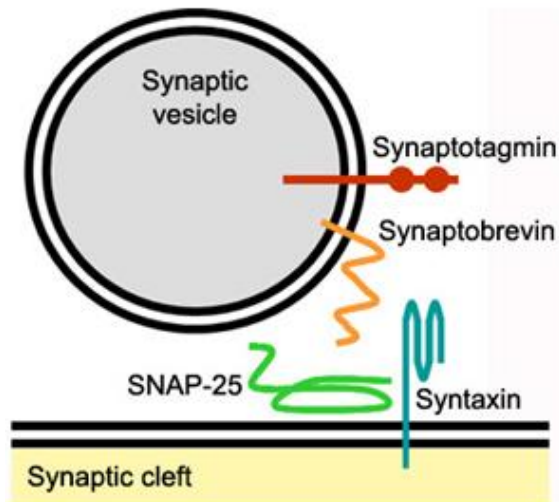


## Ενδοκυτταρική κυκλοφορία

Λιπιδιακές σχεδίες: τμήμα μηχανισμού εξασφάλισης **σωστής ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας** πρωτεϊνών και λιπιδίων - **Εξω- ενδοκύτωση**

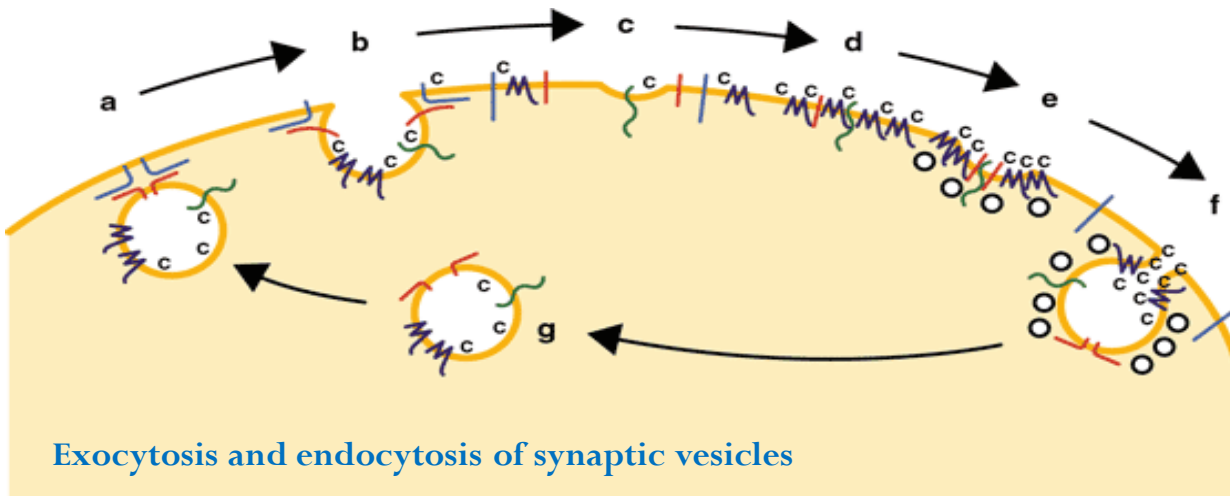
### 2. Συγκέντρωση συστατικών που προάγουν αποτελεσματική μεμβρανική σύντηξη

(πχ. οι **πρωτεΐνες SNARE** συνταξίνη 1A και SNAP-25 συγκεντρώνονται στις ΛΣχ)



## Ενδοκυτταρική κυκλοφορία

Οι πρωτεΐνες SNARE συσσωματώνονται στην ΠΜ με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία χοληστερόλης



*Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation*  
*T.F.J. Martin*  
*Nature Cell Biology 2, E9 - E11; 2000*

- Exocytosis and endocytosis of synaptic vesicles
- c Cholesterol W Synaptophysin — VAMP — Syntaxin ~ Synaptotagmin O Adaptins, coats
- (a) The **synaptic vesicle** engaging in SNARE-protein-mediated **exocytosis**
  - (b) the **fusion pore** then **dilates**
  - (c) the **vesicle collapses** fully into the **presynaptic membrane**, with dispersal of lipid and protein constituents (involving SNARE-complex disassembly).
  - (d) **Reassembly of synaptic-vesicle** constituents in the merged membrane may involve lateral associations between **cholesterol** with **SM**, **synaptophysin** and **synaptotagmin**, between **synaptophysin** and VAMP, and other **protein-protein interactions**.
  - (e) **Recruitment of adaptins** (such as AP-2) to cyt domains of synaptotagmin and other synaptic-vesicle proteins, and the recruitment of **clathrin** coat proteins
  - (f) leads to **invagination** and budding of a **new synaptic vesicle** (g).

## Ενδοκυτταρική κυκλοφορία

Το ποσό των SNAREs στις ΛΣχ εξαρτάται από τις ειδικές ισομορφές τους και τον κυτταρικό τύπο

PC12 cells	20% of SNAP-25 in lipid rafts
Λιποκύτταρα, ιστιοκύτταρα	70% of SNAP-23
Ιστιοκύτταρα	Συνταξίνη-2: αποκλείεται από τις ΛΣχ Συνταξίνη-4: σε ΛΣχ και εκτός ΛΣχ Συνταξίνη-3: σε μεγάλες ποσότητες σε ΛΣχ

Η προσθήκη παλμιτικής ομάδας καθοδηγεί τις πρωτεΐνες στις ΛΣχ

50% πρωτεϊνών ΛΣχ σε MDCK cells, SNAP-25, SNAP-23

Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με χοληστερόλη

πχ. συνταξίνη1A

Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών μεταξύ τους

πχ. συνταξίνη1A με SNAP-25

# Λειτουργίες Λιπιδιακών Σχεδίων

## 2. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

### A) πρωτεΐνες μεταγωγείς βρίσκονται στις ΛΣχ

Πρωτεΐνες G, Ras-σχετιζόμενες GTPάσες, PKC κλπ

Συσσωμάτωση υποδοχέων μεταγωγής  $\Rightarrow$  αύξηση συγγένειας σύνδεσης με ΛΣχ (σταθερότητα)

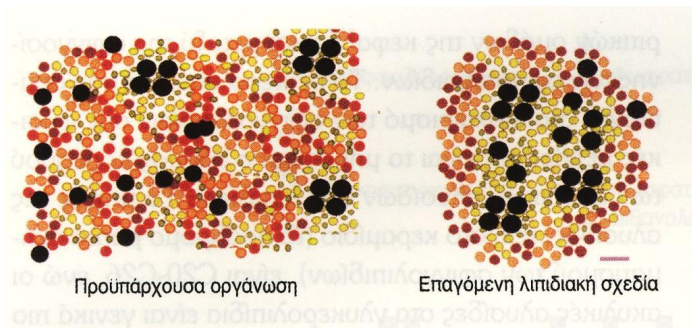
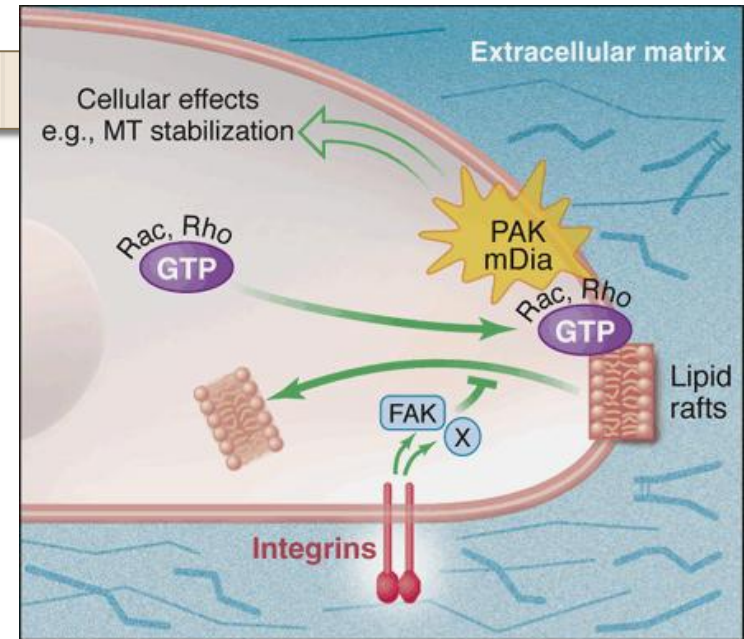
Νέο μικροπεριβάλλον:

a) +/- φωσφορυλίωση, kinases ή προστασία από φωσφατάσες

b) +/- αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά μονοπατιού: σταδιακή ενσωμάτωση διάφορων συστατικών μονοπατιού, απαίτηση υποδοχέων για αλληλεπιδράσεις διασύνδεσης ή αύξηση τοπικής συγκέντρωσης

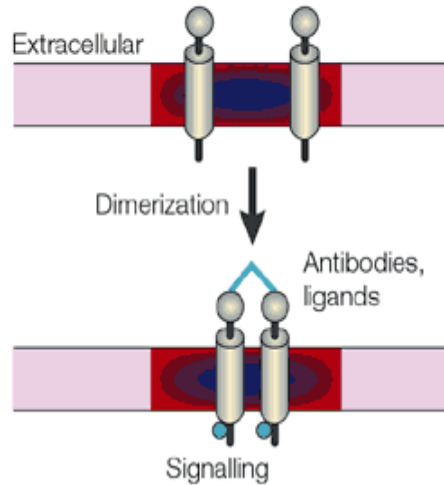
### B) Η συσσωμάτωση των ΛΣχ ενισχύει το σήμα

πχ. μικροσπήλαια (σταθερότερα)

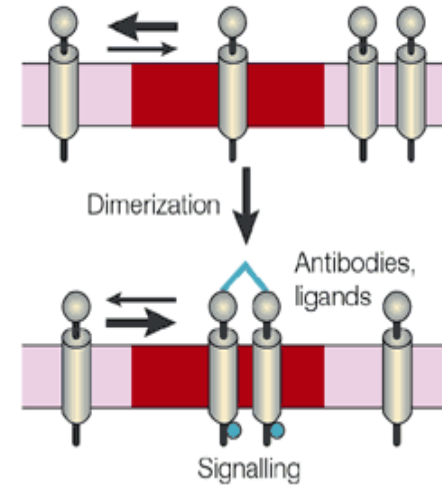


## A Model 1

### a Activation in a raft



### b Altered partitioning



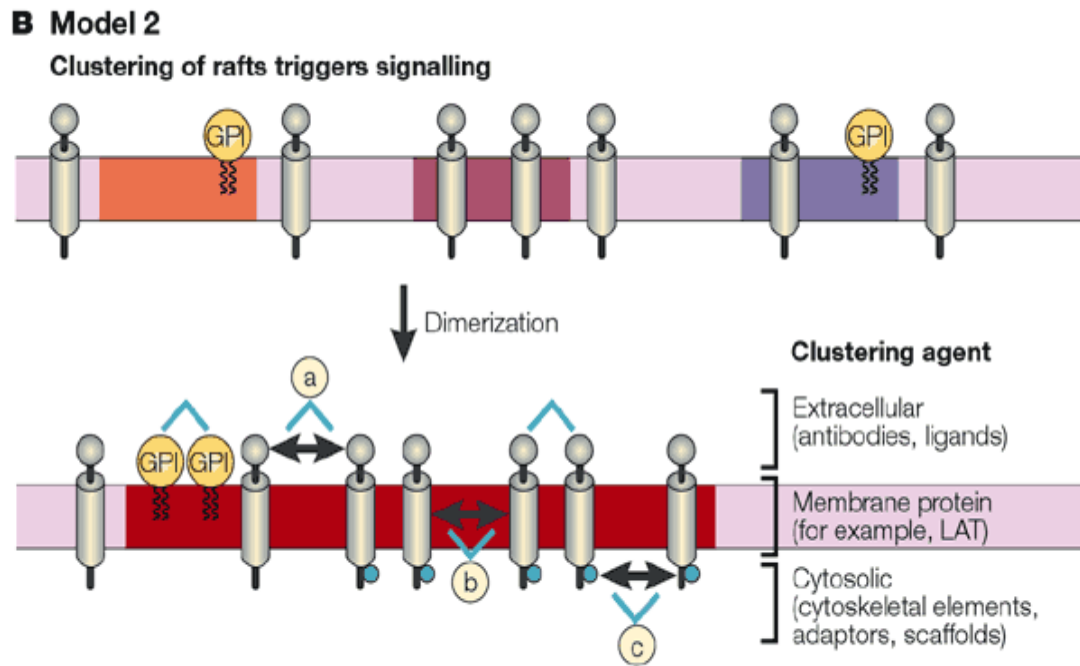
*Lipid rafts and signal transduction* Simons K & Toomre D *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 31-39;2000

**Signalling** occurs in either **single rafts** (Model 1) or **clustered rafts** (Model 2).

### Model 1

Following **dimerization** (or oligomerization) the protein becomes **phosphorylated** (blue circle) in rafts.

In single rafts this can occur by activation (a) **within** the raft, or (b) by altering the **partitioning dynamics** of the protein.



## Model 2

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

there are **several rafts** in the membrane, which differ in **protein composition** (orange, purple or blue).

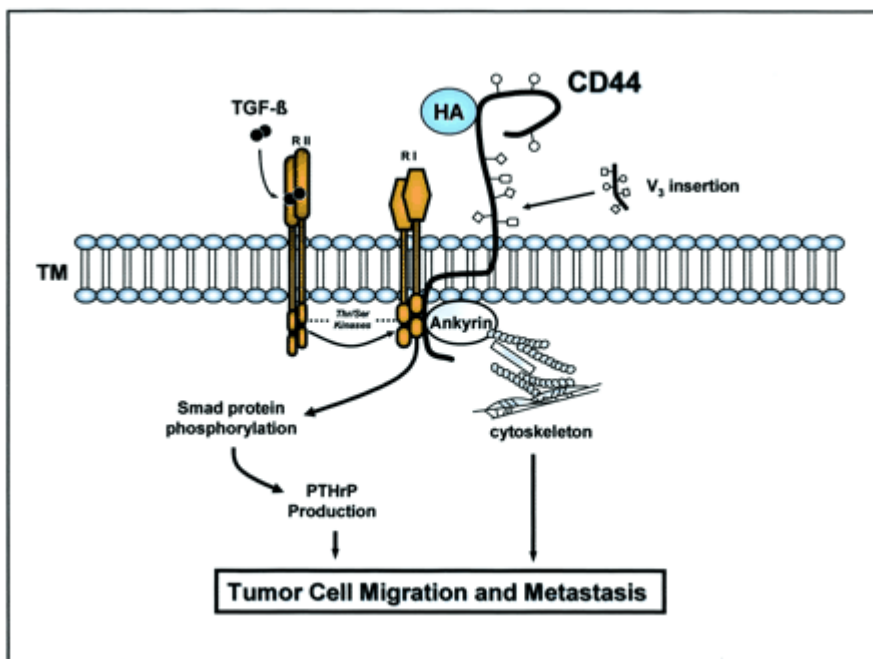
**Clustering** would **coalesce** rafts (**red**), so that they would now contain a **new mixture of molecules**, such as crosslinkers and enzymes. Clustering could occur either **extracellularly**, within the **membrane**, or in the **cytosol** (a–c, respectively). Raft clustering could also occur **through GPI-anchored proteins** (yellow), either as a primary or co-stimulatory response.

**Notably, models 1 and 2 are not mutually exclusive.** For instance, **extracellular signals** could increase a **protein's raft affinity** therefore drawing **more of the protein into the raft** where it can be **activated** and **recruit other proteins**, such as **LAT**, which would **crosslink several rafts**.



## Γ) Η σύνδεση ορισμένων τύπων ΛΣχ με τον κυτταρικό σκελετό επηρεάζει τη μεταγωγή του σήματος

Διαμεμβρανική CD44: με ΛΣχ (διαμεμβρανικό τμήμα) και Σκελετός (cyt τμήμα Ezrin-Radixin-Moesin to actin network)



*Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells.*

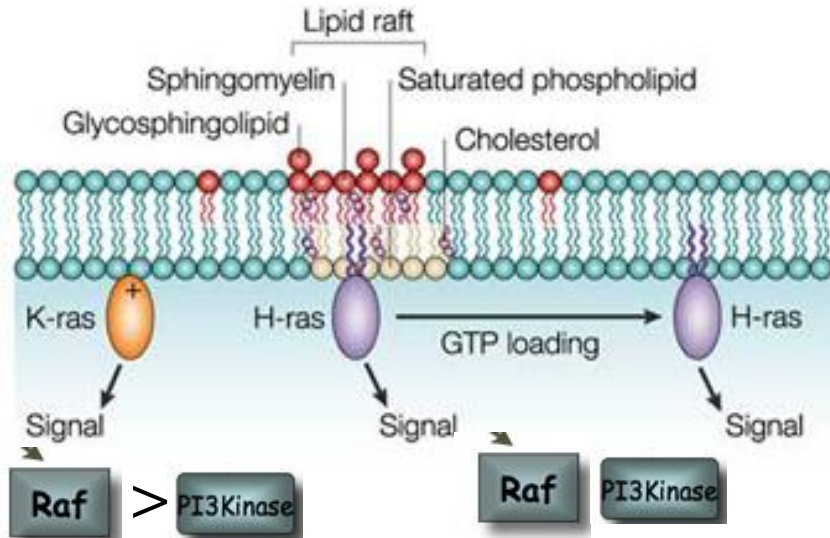
*Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B  
The Journal of biological chemistry. 2002 Oct 18*

Δ) Επικοινωνία δύο μονοστιβάδων σε περίπτωση μονοπατιών στα οποία δε συμμετέχει κάποια διαμεμβρανική πρωτεΐνη

ΕΞ GPI-proteins: σύνδεση με εσωτερικές πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος

# Λειτουργίες Λιπιδιακών Σχεδιών

## 2. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Βρίσκονται σε διαφορετικά membrane domains  $\Rightarrow$  **ίδιοι τελεστές**-διαφορετικές αλληλεπιδράσεις  $\Rightarrow$  **διαφορετική δράση** – αποτέλεσμα στη μεταγωγή σήματος

**H-ras signalling requires access to lipid rafts.**

H-ras and K-ras **membrane proteins** are highly mobile in the PM

**K-ras** is associated predominantly with **non-raft** PM, irrespective of its activation state

**H-ras** is distributed approximately **equally** between raft and non-raft PM, but **GTP loading** increases the fraction of H-ras in **non-raft** membrane.

**GDP-H-ras** has affinity for raft and non-raft membrane, exchanges constantly between, and has **equal** residence time in, both sites

**GTP-H-ras** has a higher affinity for, and therefore a greater residence time in, **non-raft membrane**

**GTP-H-ras** initiates **Raf-1 activation** within lipid rafts, but completes the process **outside**.

*Ras proteins: different signals from different locations*

*John F. Hancock*

*Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 373-385; 2003*

# Λειτουργίες Λιπιδιακών Σχεδιών

## 2. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

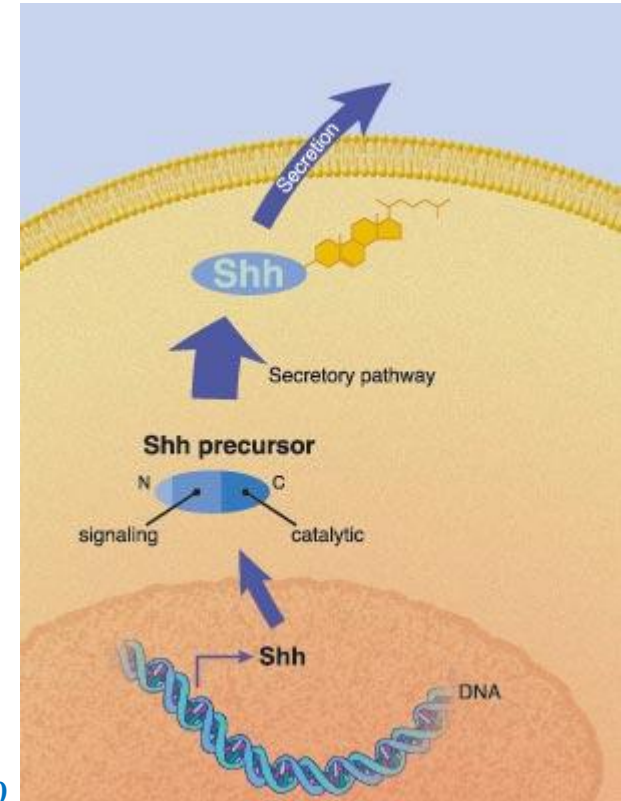
ΛΣχ: απαραίτητες για τη **μεταγωγή σήματος Hedgehog** κατά την ανάπτυξη

**Απελευθέρωση** από κύτταρο προέλευσης συνδέτη **Shh** είναι εφικτή μόνο όταν αγκυροβολήσει στις ΛΣχ μέσω της ομάδας **χοληστερόλης** που περιέχει

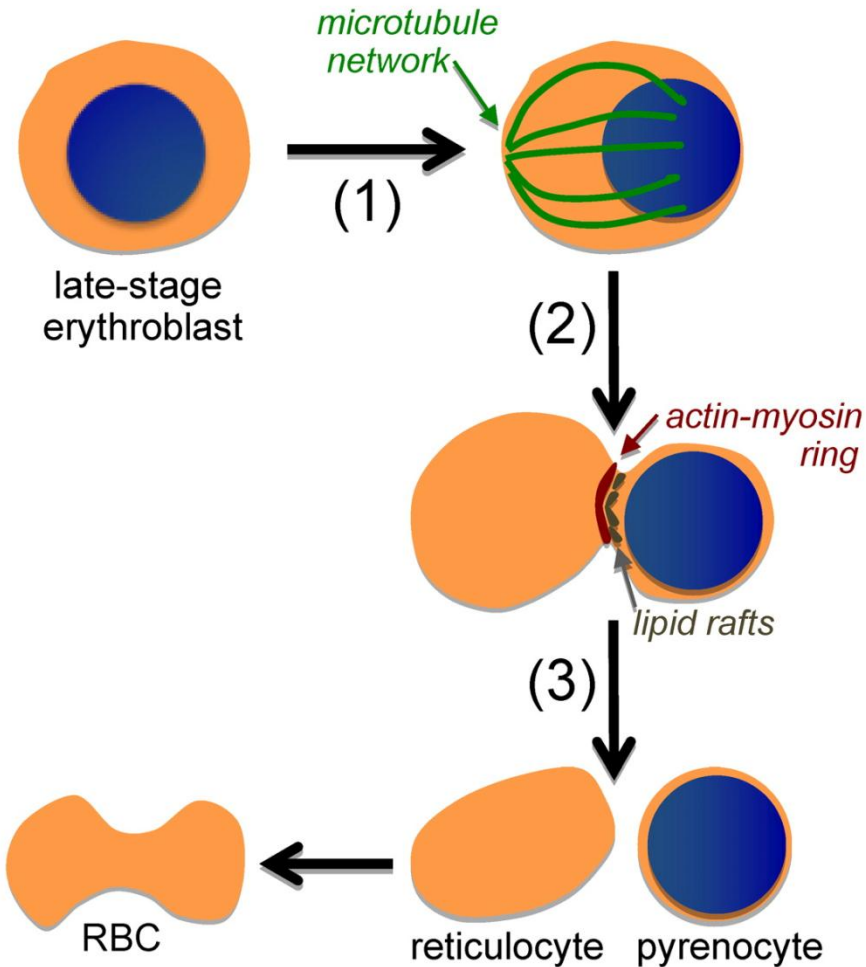
Υποδοχείς Τα-κυττάρων, αντιγονικός υποδοχέας B-κυττάρων (λεμφοκύτταρα), IgE υποδοχείς (βασεόφιλα κύτταρα-αλλεργική απόκριση) κλπ

*McMahon AP. Cell 100:185; 2000*

**Shh** undergoes **autocatalytic processing** prior to secretion. The Shh precursor protein is cleaved to yield an ~20 kDa N-terminal domain (**signaling domain**) and an ~25 kDa C-terminal domain (**catalytic domain**). **Cholesterol modification is important for secretion and activity of the Shh protein.**



## RBC formation in mammals requires the **enucleation** of late-stage erythroblasts



- (1) eccentric positioning of the nucleus** associated with a **microtubule network**
- (2) pinching of the erythroblast** associated with a localized **actin-myosin ring** and **lipid rafts**, as well as endocytic vesicle formation (not shown)
- (3) the formation of 2 cells:** a **pyrenocyte** that is rapidly engulfed by macrophage cells and a **reticulocyte** that continues to mature into a biconcave **RBC**

# ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

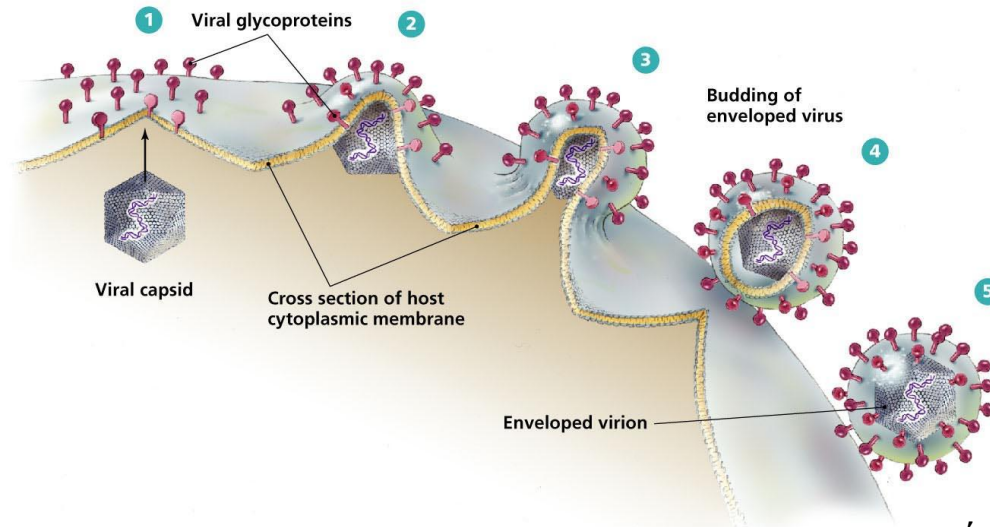
HIV

Ιός Γρίπης (πρωτεΐνες φακέλου που προσδένονται σε σχεδίες)

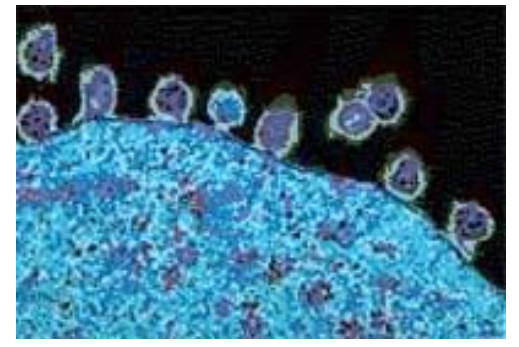
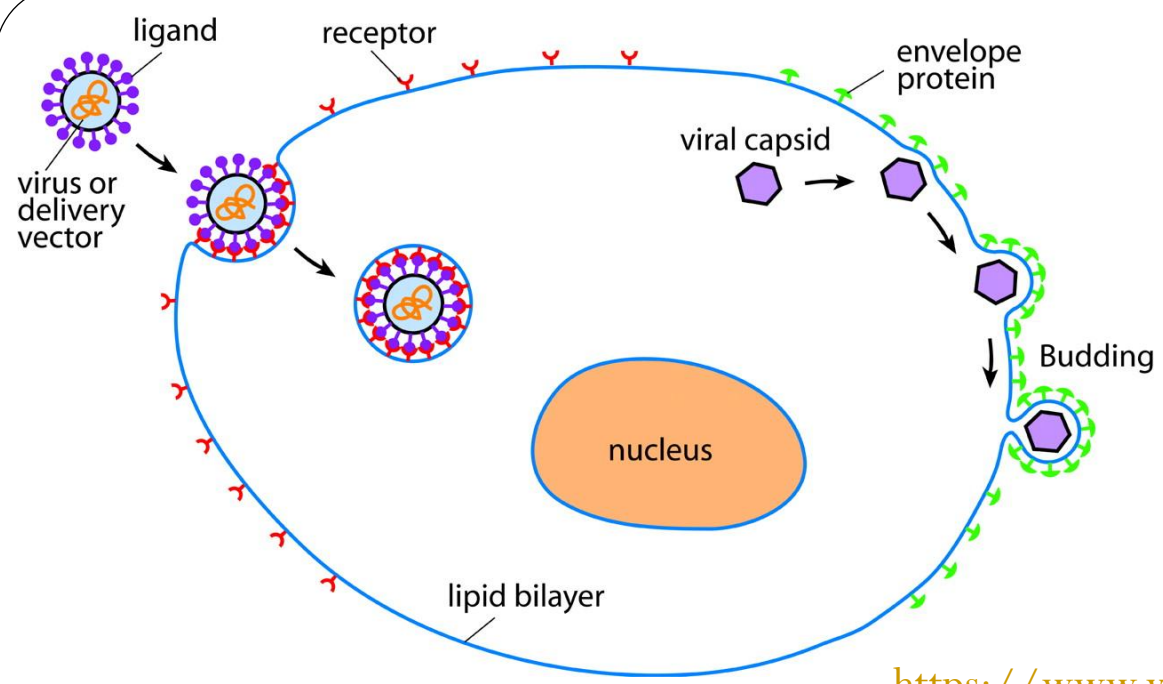
Θεραπευτική ικανότητα αντικαταθλιπτικών (υποδοχείς νευροδιαβιβαστών σε ΛΣχ)

AD: πλατφόρμες για παραγωγή β-αμυλοειδών

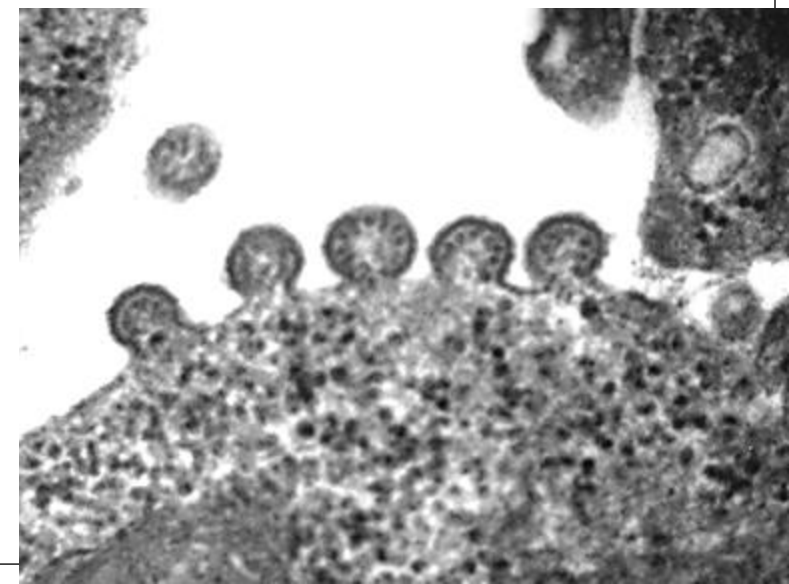
Prions: η φυσιολογική πρωτεΐνη PrP<sup>c</sup> μετατρέπεται σε παθολογικές πρωτεΐνες στις ΛΣχ (απαιτείται αγκύρωση GPI)



The lipid envelope of influenza and HIV is enriched in raft-like lipids, leading to the notion that these viruses bud from lipid microdomains in the PM



<https://www.youtube.com/watch?v=2as2bsFhoqk>



## ΣΥΝΟΨΗ

<https://www.youtube.com/watch?v=73ghXv3nVKA>

1. **Εξειδικευμένες περιοχές** στη φυσιολογική κυτταρική μεμβράνη
2. **Detergent resistant**
3. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **χοληστερόλη**
4. Υψηλή θερμοκρασία «**τήξης**»
5. **Αποθεματικές** ή **λειτουργικές πλατφόρμες**
6. **Δυναμικότητα-Λειτουργικό δυναμικό-βιολογικά ενεργές μεμβρανικές περιοχές**
7. **Διαμερισματοποίηση** δομής και λειτουργίας
8. Κέντρα **αλληλεπίδρασης-αποκλεισμού**
9. Πλατφόρμες **διαλογής πρωτεϊνών**
10. **Ενδοκυττάρια κυκλοφορία**
11. **Μεταγωγή σήματος**
12. **Ασθένειες-Θεραπείες**

