

Papel de la caveolina-1 en la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. Mecanismos de señalización y función en la regulación de la proliferación hepática

Recibido el 19 de diciembre de 2007

RAFAEL MAYORAL, AMALIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, ROSA ROY, LISARDO BOSCA Y PALOMA MARTÍN-SANZ*
*Instituto de Investigaciones Biológicas «Alberto Sols» (CSIC-UAM)
Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, España.*

RESUMEN

Las caveolas participan en múltiples procesos celulares tales como el transporte vesicular, homeostasis del colesterol, regulación de la señalización intracelular, por integrinas y proliferación celular. Sin embargo, su función en el hígado no está bien establecida. La expresión de caveolina 1 (Cav), la proteína más abundante en las caveolas, está bien descrita en el hígado y en varias líneas de hepatocitos y en hígado cirrótico humano y en carcinoma hepatocelular. Sin embargo, el papel de Cav-1 en la fisiopatología hepática es controvertido, ya que se ha propuesto un

* **Correspondencia:**

Dra. Paloma Martín Sanz.
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Arturo Duperier 4.
28029 Madrid, Spain.
Fax: 34915854401; e-mail: pmartins@iib.uam.es

Dr. Lisardo Bosca.
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Arturo Duperier 4.
28029 Madrid, Spain.
Fax: 34915854401; e-mail: lbosca@iib.uam.es

papel crítico en el proceso de regeneración tras hepatectomía parcial (HP). Contrariamente a esta observación, nuestros datos sugieren que Cav-1 aumenta en el hígado regenerante, con una re-distribución de la proteína desde las caveolas hacia dominios no caveolares. Además, la Cav-1 localizada en estas fracciones está fosforilada en la tirosina 14. A pesar de ello, el gen de la Cav-1 es dispensable para la regeneración hepática tras HP, tal como se deduce de animales que carecen de este gen. En conjunto, estos datos muestran un papel dinámico de la Cav-1 en la proliferación hepática tras HP y en líneas hepáticas en cultivo, pero con mínimas implicaciones en el proceso regenerativo.

Palabras clave: caveolina; hepatocito; hepatectomía; regeneración hepática.

SUMMARY

Role of caveolin 1 on liver regeneration after partial hepatectomy. Mechanisms of signalling and effect on the regulation of hepatocyte proliferation.

Although caveolae participate in many cellular processes such as vesicular transport, cholesterol homeostasis, regulation of signal transduction, integrin signaling and cell growth, their role in liver remains elusive. Expression of caveolin 1 (Cav), the most abundant protein of caveolae, has been reported in liver and in different hepatocyte cell lines, in human cirrhotic liver and in hepatocellular carcinomas. However, the role of Cav-1 in liver pathophysiology remains controversial and a critical role in regeneration after partial hepatectomy (PH) has been reported. Opposite to this observation, our data support the view that Cav-1 increases in liver after PH with a redistribution of the protein from the caveolae enriched domain to the noncaveolar fraction. Moreover, the Cav-1 located in the noncaveolar fraction is phosphorylated in tyrosine 14 (Tyr¹⁴). Even though, the Cav-1 gene is dispensable for liver regeneration after PH as deduced from data obtained with commercially available animals lacking this gene. Taken together these results support a dynamic role for Cav-1 in liver proliferation both *in vivo* after PH, and *in vitro* in cultured hepatic cell lines, but with minimal implications in the liver regeneration process.

Key words: caveolin, hepatocyte, hepatectomy, liver regeneration.

1. CAVEOLAS Y CAVEOLINA

Las caveolas fueron identificadas en los años 50 por microscopía electrónica como invaginaciones de la membrana en la superficie de células epiteliales y endoteliales. Estas vesículas plasmáticas con un

tamaño de 50 a 100 nm se denominaron «caveolae intracellulare» por su similitud con una cueva, o «plasmalemmal vesicles» (1, 2). Cuarenta años después de su descripción se pudo estudiar la naturaleza molecular de las caveolas identificando a una proteína, la caveolina (Cav), como la proteína mayoritaria de estas estructuras (3), pero además las caveolas están enriquecidas en esfingolípidos y en colesterol. Se han identificado tres tipos de Cav (1, 2, y 3) con diferentes patrones de expresión en células diferenciadas. Cav-1 y Cav-2, ambas con dos isoformas (α y β), se encuentran en adipocitos y células endoteliales (4), mientras que Cav-3 solo se expresa en células de tipo muscular (5). Aunque cada vez hay más procesos en los que las caveolas y la caveolina están implicadas, sus papeles fisiológicos son muy diferentes dependiendo del tipo celular y del órgano examinado. En el tejido vascular predominan las funciones endocíticas y vasorreguladoras, mientras que en la musculatura tienen un papel importante en la integridad estructural. Las caveolas participan en diferentes procesos celulares como el transporte de vesículas independiente de clatrina (transcitosis, endocitosis y pinocitosis) (6), la homeostasis del colesterol (7), la regulación de la transducción de señales (8), la señalización a través de integrinas (9) y la supresión de la proliferación celular (10). El desarrollo de los modelos murinos deficientes en caveolina (11-14) han permitido analizar las funciones fisiológicas de la caveolina y las caveolas en mamíferos a nivel celular y sistémico.

1.1. Definición y morfología

La definición inicial de caveola fue una descripción tomada a partir de las imágenes de microscopía electrónica de unas vesículas «lisas» procedentes de invaginaciones de membrana que eran diferentes de las vesículas «densas», que son las vesículas de clatrina. La definición de las caveolas se ha ampliado y ahora también se denomina caveola a los grupos de pequeñas vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática y asociadas de manera similar a racimos de uva, rosetas e incluso se fusionan a modo de tubos o canales transcelulares (Figura 1A). Estas formas no tradicionales de las caveolas se encuentran en diferentes tejidos. Los racimos son muy abundantes en las células musculares, las rosetas en adipocitos,

y los túbulos vesiculares en las células endoteliales (15-17). Estas invaginaciones y vesículas no son estáticas y pueden fusionarse con otras estructuras de membrana y otros orgánulos celulares, dejando de ser estrictamente caveolas.



FIGURA 1. **Caveolas: definición morfológica y plasticidad.** A, Las caveolas tienen diferentes formas que difieren de las tradicionales vesículas, pueden formarse agregados a modo de roseta, o de racimo e incluso formar tubos intracelulares o canales que atraviesan las células, como sucede en el caso de las células endoteliales. B, Fotos de microscopía electrónica en adipocitos y células endoteliales. Las rosetas caveolares se encuentran en adipocitos y en células endoteliales se pueden observar todos los tipos de morfologías caveolares (37).

1.2. Composición y propiedades bioquímicas de las caveolas

La membrana plasmática se ha definido por el modelo del «mosaico fluido» (18) como una estructura casi líquida, donde tanto los lípidos como las proteínas integrales, que están dispuestos en una organización de mosaico, pueden realizar movimientos de traslación dentro de la bicapa. Pero en esta definición hay que introducir un estado de «líquido ordenado», donde la bicapa lipídica no está en un continuo recambio de fosfolípidos (19). Los dos estados de la mem-

brana definidos como «líquido ordenado» y como «líquido desordenado» pueden coexistir en la misma membrana plasmática. En las membranas biológicas existen unas ínsulas rígidas, dentro de un mar de fosfolípidos, formadas por colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomiélin) que se denominaron «lipid rafts» o «balsas de lípidos» (20, 21) (Figura 2). Las caveolas han sido consideradas tradicionalmente como una forma invaginada y vesicular específica de las balsas lipídicas (20, 21), y aunque hay proteínas que están en los dos tipos de estructuras, algunas están solo en las balsas lipídicas o solo en las caveolas (22). Las caveolas y las balsas lipídicas comparten muchas funciones, la diferencia de estos microdominios radica en la localización de la caveolina, por lo tanto, la caveolina es un marcador selectivo de las caveolas y permite hacer un análisis específico de la función caveolar. La composición específica de fosfolípidos de estas estructuras de membrana hace que estos microdominios tengan propiedades bioquímicas diferentes y puedan ser resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos a 4°C, como Tritón X-100, o tengan menor densidad que el resto de las membranas. Estas propiedades son la base de la identificación, purificación y caracterización de las balsas lipídicas y de las caveolas (23, 24).

2. LA FAMILIA DE LAS CAVEOLINAS.

2.1. La caveolina es la proteína que recubre las caveolas.

El descubrimiento de la caveolina se produjo de manera indirecta buscando sustratos fosforilables en fibroblastos transformados con el virus del sarcoma de Rous. De las cuatro proteínas fosforiladas en tirosina que se purificaron, una de 22 kd se la relacionó con la elevada capacidad de transformación del virus y se propuso un papel celular en oncogénesis (25). Los anticuerpos generados frente a esta proteína de 22 kd producían una tinción similar a la de los filamentos que recubren las caveolas y que se habían descrito con anterioridad en estudios estructurales. Estos datos sugerían que esta molécula era la proteína que recubría las caveolas y por eso se la denominó *caveolina*, como el primer marcador de microdominios caveolares (26).

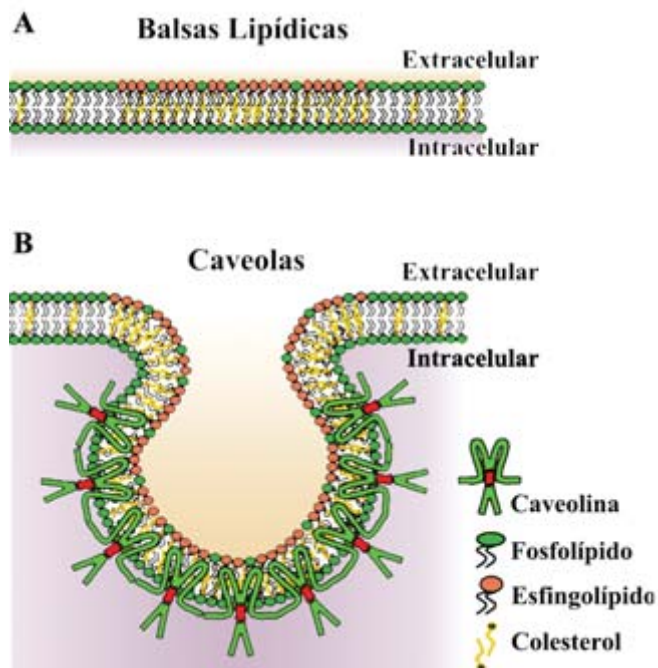


FIGURA 2. **Organización de las balsas lipídicas y caveolas.** **A**, Balsas lipídicas, la «fase ordenada» contiene colesterol y están orientadas al exterior celular. La «fase desordenada» se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina). **B**, Caveolas. Cuando la Cav se inserta en las balsas lipídicas se forman invaginaciones a modo de cueva. La Cav forma homo-oligómeros (simplificados en dímeros y en color verde) que proveen la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. El dominio de oligomerización de Cav-1 se muestra en rojo (37).

2.2. Tres caveolinas diferentes, Cav-1, Cav-2 y Cav-3.

Se han identificado tres miembros de la familia génica de la caveolina (Figura 3). El gen de CAV-1 se compone de tres exones que se encuentran muy conservados en todas las especies y se han descrito dos isoformas, la predominante o Cav-1 α , de 178 residuos, y una isoforma derivada de una iniciación de la traducción interna (met 32) (27) denominada Cav-1 β , de 147 residuos. CAV-2 fue clonado en adipocitos y se compone de tres exones que codifican para una proteína de 162 residuos cuya secuencia es muy similar a la de Cav-1. Cav-2 α representa la secuencia completa de la proteína. Se han

descrito dos isoformas truncadas, Cav-2 β y Cav-2 γ , que no se han caracterizado (28). El gen CAV-3 fue identificado a través de una base de datos que buscaba y analizaba librerías de ADNc para genes homólogos a CAV-1, y está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 residuos (29). Los tres genes están localizados en el cromosoma 6 murino. Cav-1 comparte con Cav-3 una elevada similitud en la secuencia aminoacídica. Los genes homólogos humanos de CAV-1 y CAV-2 se localizan en el cromosoma 7q31.1 cerca del marcador genético D7S522, que es conocido como un sitio frágil o FRAG7G (30). Muchos cánceres epiteliales (mama, próstata, ovarios y renal) tienen deleciones alrededor de este marcador (31-33),

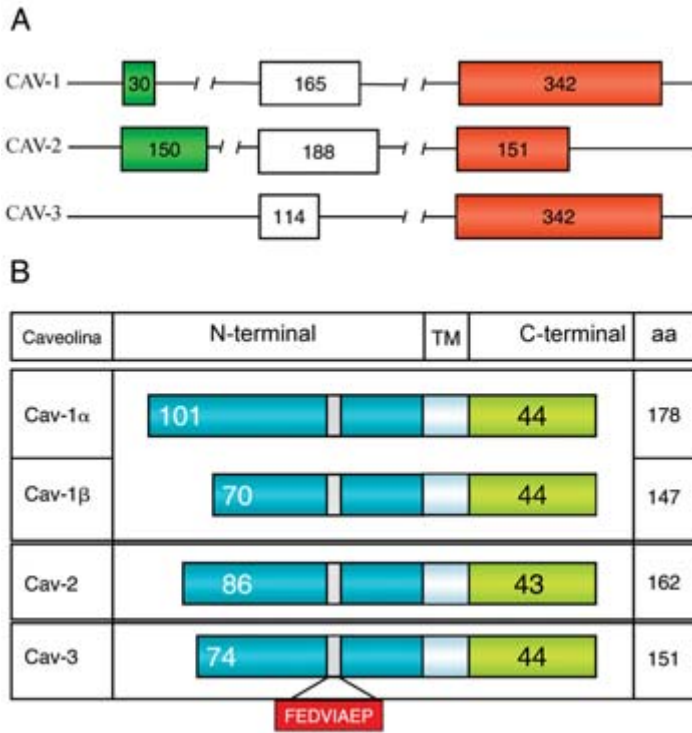


FIGURA 3. **La familia de las caveolinas.** **A,** Secuencia génica de CAV-1, CAV-2 y CAV-3. Los exones se muestran en recuadros y en cada uno está indicado el número de nucleótidos que lo componen. **B,** Estructura de las 3 proteínas (Cav-1, Cav-2 y Cav-3) incluidas las 2 isoformas de Cav-1, tomando como eje central el dominio TM o transmembrana. El motivo firma o «caveolin signature motif» (FEDVIAEP) mediante el cual se caracterizan las caveolinas aparece en el recuadro inferior de color rojo (130).

lo que sugiere que en esa zona existe un gen supresor de tumores. CAV-2 se encuentra localizado a 67 kb por debajo de D7S522 y CAV-1 está 19 kb más abajo que CAV-2 (34). El gen humano de CAV-3 se localiza en 3p25 (35, 36), a unas 7-10 kb del gen del receptor de la oxitocina y cerca del marcador genético D3S18. Las tres proteínas tienen un motivo común llamado «motivo firma» o «caveolin signature motive» (FEDVIAEP) que está muy conservado en mamíferos (Figura 3B) (37).

2.3. Especificidad de tejido

A nivel estructural, las caveolas pueden ser identificadas en la membrana plasmática de muchos tejidos y tipos celulares. La mayoría de las células tienen caveolas, algunas en cantidad elevada, como ocurre en adipocitos, células endoteliales, neumocitos de tipo I, fibroblastos, células de tejido liso muscular y células de músculo estriado (1, 38-41). Pero hay ciertos tipos celulares, como las neuronas y los linfocitos del sistema nervioso central, que no forman este tipo de invaginaciones de membrana (42, 43).

La expresión de Cav-1 y Cav-2 es diferente a la de Cav-3. Los adipocitos, células endoteliales, neumocitos y fibroblastos tienen niveles elevados de Cav-1 y -2, mientras que Cav-3 se expresa en células de tipo muscular como tejido cardíaco, esquelético y células de músculo liso (16, 28, 29). A pesar de las diferencias de secuencia entre Cav-1 y Cav-2, en los tejidos en los que se expresa Cav-1 se puede detectar Cav-2; pero en aquellos tejidos en los cuales se expresa Cav-3 no se detecta Cav-1, lo que indica que aunque Cav-1 y Cav-3 tienen un alto grado de homología, poseen diferentes funciones *in vivo*.

3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CAVEOLAS/ CAVEOLINAS

Desde su descubrimiento en los años 50, se ha especulado mucho sobre la función de las caveolas y se han atribuido muchos papeles a las caveolas y a su principal proteína, la caveolina. La relevancia

fisiológica de las caveolas se puede resumir en varios aspectos, como son: el transporte vesicular, la homeostasis del colesterol celular, mecanismos de transducción de señales y su capacidad como proteína supresora de tumores. Debido a la amplia literatura existente en la que se describen las diferentes funciones de la caveolina solo se van a desarrollar en profundidad aquellas implicaciones de la Cav-1 en las que se ha centrado esta revisión y que incluyen la transducción de señales y la supresión tumoral.

3.1. Mecanismos de transducción de señales.

3.1.1. La caveolina como «señalosoma»: señalización compartimentalizada

Las caveolas pueden servir como plataforma para la agregación y/o concentración de otras proteínas. Usando la propiedad de insolubilidad de las caveolas en detergentes suaves y su capacidad de flotar en un gradiente discontinuo de sacarosa Lisanti y colaboradores (24) fueron capaces de obtener una fracción caveolar y determinar las diferentes proteínas que se concentran en ella. La mayoría de las proteínas que se identificaron de esta manera fueron moléculas de transducción de señales que se encontraban a concentraciones mayores que en la membrana plasmática (24, 44). Esta observación permitió formular la hipótesis de la «señalización a través de caveolinas y de balsas lipídicas» (45). Actualmente, con la ayuda de la proteómica, se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en las caveolas, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos, proteínas adaptadoras y proteínas estructurales. Las proteínas que se asocian a caveolina mejor descritas son H-Ras, la familia de tirosinas quinasas Src, la subunidad α de proteínas G heterotriméricas, y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), todas tienen una o varias miristilaciones, palmitoilaciones o grupos prenilo (46-51). Dado que las caveolas están implicadas en la compartimentalización de varias vías de señalización, pueden ser consideradas como organelas especializadas en señalización, o más apropiadamente «señalosomas».

3.1.2. Las caveolinas como moduladores de la señalización

Una de las cuestiones que no hay que descuidar es el significado funcional de la caveolina; son solamente proteínas estructurales que forman las caveolas, o pueden tener un papel activo en la retención o modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales.

El concepto de «proteína andamio» o «proteína de anclaje» (scaffolding proteins) no es nuevo y la literatura está llena de descripciones de este tipo de proteínas que actúan restringiendo, organizando y/o regulando la distribución subcelular de otras moléculas de señalización (52). La Cav-1 tiene una región de 20 aminoácidos (82-101) denominada «dominio de anclaje de la caveolina» o «caveolin scaffolding domain» (CSD) (Figura 4) que es capaz de inhibir la hidrólisis de GTP por proteínas G heterotriméricas (49) y regula a otras proteínas como la familia de tirosinas quinasas Src, isoformas de

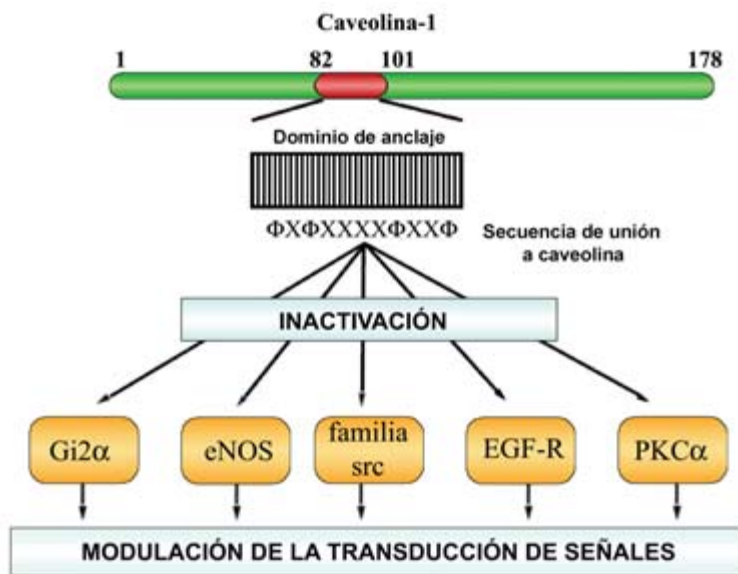


FIGURA 4. **Interacciones de los dominios de anclaje (CSD) y de unión a caveolina (CBD).** Secuencia del dominio de anclaje y de unión a caveolina con varias moléculas de señalización, entre las que destacan: la subunidad $Gi2\alpha$ de proteínas G heterotriméricas, eNOS, la familia Src quinasas en tirosina, EGF-R, e isoformas de PKC ($PKC\alpha$). En la mayoría de los casos la interacción de las diferentes proteínas de señalización con la caveolina produce un efecto de inhibición y modulación negativa de las vías de transducción de señales (37).

PKC, y H-Ras (8, 53, 54). Además, con excepción de algunas moléculas de señalización, la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (55), con *c-neu* (56) y con eNOS (37), que ha sido una de las interacciones con caveolina más estudiada (57-60).

Los motivos encontrados en las moléculas que interaccionan con la caveolina se denominan «dominio de unión a caveolina» o «caveolin binding domain» (CBD) (Figura 4), aunque la presencia de este motivo no implica la interacción directa de la proteína que lo posea con la caveolina. Debido a que las secuencias de CSD y CBD están enriquecidas en aminoácidos aromáticos (61), se ha sugerido que estas interacciones se pueden producir por yuxtaposición de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas.

De manera adicional, Cav-1 es un potente inhibidor de las vías de proliferación como las mediadas por EGFR y varios miembros de las cascadas de quinasas MAP, Ras-p42/p44 (62). La progresión del ciclo celular a través de una vía dependiente de p53/p21 (63) y la expresión de varias oncoproteínas están reguladas negativamente por Cav-1 (10). Las caveolas concentran diferentes proteínas que tienen un papel en adhesión, migración e invasión celular, como las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\beta 1$ (64) y algunas metaloproteasas como MMP-2 (65) y MT1-MMP (64). Existe una relación dinámica entre los receptores acoplados a proteínas G y las caveolas, se ha demostrado que hay receptores β -adrenérgicos que colocalizan con caveolas (66-68).

La Cav-1 fue identificada como sustrato de la quinasa Src, que la fosforila en la tirosina 14 (Y^{14}) (Figura 5). Cav-1 puede ser fosforilada en respuesta a la estimulación por EGF o insulina; sin embargo, no está claro el significado funcional de la fosforilación en Y^{14} . Se ha propuesto que esta fosforilación puede servir como sitio de anclaje de proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar cascadas de señalización (69, 70). Trabajos recientes han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y^{14} de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (71). También se ha descrito que la fosforilación en Y^{14} regula la apoptosis mediada por drogas anti-

tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (72). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y¹⁴ a través de la activación de p38MAPK y c-Src (73). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas.

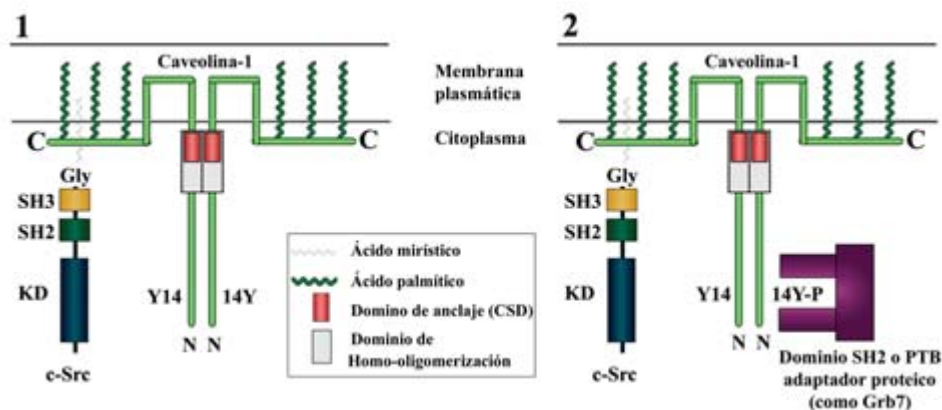


FIGURA 5. *Diagrama esquemático de la fosforilación de la tirosina 14 de la Cav-1 por parte de la quinasa Src. En el primer paso, es necesaria una modificación post-traduccional tanto de c-Src como de Cav-1 para mantener la proximidad. En el segundo paso, c-Src fosforila a la Cav-1 en la tirosina 14. Cav-1 forma una masa de homo-oligómeros de aproximadamente 350 kDa que contiene 14-16 monómeros de caveolina. La fosforilación en la tirosina 14 podría funcionar como un sitio de anclaje para proteínas con dominios SH2 o PTB (phosphotyrosine binding), como Grb7 (69).*

3.2. Oncogénesis y tumorogénesis

3.2.1. Las caveolas/caveolinas como diana de los oncogenes

La transformación celular es un proceso en el que se produce la activación de proto-oncogenes y en el que están implicadas funciones de crecimiento y supervivencia. La hipótesis que refiere a Cav-1 como una diana de los oncogenes fue demostrada cuando se transformaron células NIH 3T3 con una forma activa de H-Ras y se observó a una regulación negativa a nivel transcripcional de Cav-1, mientras que el tratamiento de estas células con un inhibidor de la cascada de la quinasa Ras-p42/44 MAPK restituyó la expresión de Cav-1 hasta alcanzar los niveles normales (74).

Hay más oncogenes implicados en la regulación negativa de Cav-1 a nivel transcripcional como v-abl, mTAg, bcr-abl, crk1, c-src, c-neu, HPV E6. En casi todos los casos, el mecanismo de esta inhibición no se ha descrito, las excepciones incluyen la represión por c-Myc y por la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano. La activación de c-Myc reprime la expresión de Cav-1 a nivel transcripcional (75), y la oncoproteína E6 disminuye la expresión de Cav-1 a través de la inhibición de p53, porque en la secuencia del promotor de Cav-1 hay elementos de respuesta a p53 (76, 77).

3.2.2. *Las caveolinas como supresoras de tumores*

La decisión de sobrevivir y proliferar o ir a la muerte celular programada, o apoptosis, es esencial para el desarrollo, para mantener la homeostasis tisular y para proteger de un daño celular o genómico. Las caveolas/caveolinas pueden estar implicadas en la modificación del balance entre señales anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Debido a la capacidad de unión y modulación de la caveolina a diferentes proteínas de vías de señalización, también podría regular, de manera similar, la acción de ciertos proto-oncogenes u oncogenes activados.

Basándose en la capacidad de la Cav-1 de inhibir la actividad de varios proto-oncogenes, se la ha propuesto como una proteína supresora de tumores (9, 78-81). Se ha descrito una regulación negativa de la transcripción de Cav-1 en células derivadas de tumores y carcinomas primarios (56, 77, 82).

Los experimentos de sobreexpresión de Cav-1 indican que es un potente inhibidor de vías proliferativas. Cav-1 puede interactuar e inhibir moléculas implicadas en supervivencia y proliferación, puede suprimir la función del receptor de EGF (55), de varios miembros de la cascada de quinasas Ras-p42/MAPK (83), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (84-86). Además Cav-1 es capaz de sensibilizar a las células hacia estímulos apoptóticos y muerte celular inducida por acumulación de ceramida, a través de un mecanismo dependiente de PI3K (86), debido a que en las caveolas se acumula esfingomielina y la enzima que transforma la esfingomielina en ceramida, la esfingomielinasa (87).

También se ha descrito que el silenciamiento de Cav-1 por ARN de interferencia en *Caenorhabditis elegans* conduce a la hiperactivación del ciclo meiótico, que es un fenotipo similar a la señalización descontrolada de Ras (88).

El 60% de los cánceres humanos de mama examinados (carcinomas invasivos) tienen mutaciones en CAV-1 (89). La mutación específica P132L produce una proteína que actúa a modo de dominante negativo y es suficiente para transformar fibroblastos murinos (NIH 3T3) *in vitro* (32, 89). Además las regiones del promotor de CAV-1 enriquecidas en GC están hipermetiladas en las líneas de cáncer de mama y muestras de tumores de próstata, lo que sugiere un silenciamiento transcripcional (30, 90); aunque hay casos en los que no hay cambios en los estados de metilación del promotor de CAV-1 en células tumorales humanas (91).

El marcador genético D3S18 (cerca del que se encuentra CAV-3) es conocido por dos enfermedades, el síndrome de von Hippel-Lindau y el síndrome 3p; en este último se produce una delección hemicigótica de 3pter-p25, que se caracteriza por un retraso en el crecimiento con deformaciones craneofaciales, retraso mental y defectos en el septo cardíaco (92). Muchas de las mutaciones que se han identificado en el gen de CAV-3 conducen a una distrofia muscular.

3.2.3. *La caveolina en progresión tumoral.*

En muchos artículos científicos se ha descrito una regulación negativa de Cav-1 en diferentes tipos de cánceres y por ello se ha propuesto a Cav-1 como un gen supresor de tumores, pero existen evidencias en las cuales la expresión de Cav-1 está incrementada en diferentes tipos de cáncer. La sobreexpresión de Cav-1 ha sido descrita en las formas más agresivas de cáncer de vejiga, en adenocarcinomas de colon generados experimentalmente en ratones y en células de cáncer de colon humanas, en modelos murinos de cáncer de próstata y en tumores de la familia del Sarcoma de Ewing's (ESFT) (93-96). Además la progestina y su análogo químico MPA, inducen la expresión de Cav-1 en cáncer de mama y en proliferación celular (97). La expresión combinada de c-Myc y Cav-1 se ha propuesto como un marcador de carcinoma de próstata en humanos (98).

4. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LAS CAVEOLAS Y LA CAVEOLINA

Aunque el interés por las caveolas y las caveolinas ha crecido fuertemente en los últimos 10 años, la mayoría de las investigaciones han estado limitadas a los experimentos en líneas celulares o a análisis bioquímicos. A pesar de el éxito de estas aproximaciones en las funciones de las caveolas/caveolinas en endocitosis, tráfico de colesterol, transducción de señales, tumorigénesis y otros procesos, era necesario un modelo *in vivo* para esclarecer las relevancias fisiológicas de las funciones de las caveolas/caveolinas. La caracterización inicial de ratones deficientes en Cav-1 se produjo en 2001 por dos grupos a la vez (11, 13). La mayor sorpresa apareció cuando no se encontraron anormalidades fenotípicas, aunque un análisis funcional e histológico detallado puso de manifiesto una serie de anormalidades interesantes resumidas en la Tabla 1.

Existen ratones deficientes en Cav-1, Cav-2 y Cav-3 (11-14), pero solo en los ratones doble deficientes en Cav-1 y Cav-3, y no para Cav-2, se produce la pérdida de las estructuras caveolares en los tejidos que expresan los diferentes tipos de caveolinas.

A pesar de que las caveolas participan en las numerosas funciones descritas anteriormente, es sorprendente que los distintos modelos murinos que no expresan alguna de las caveolinas sean viables y fértiles. Sin embargo, la pérdida combinada de Cav-1 y Cav-3 produce efectos perjudiciales en la función y la estructura cardiaca (99). Los ratones deficientes en Cav-1 desarrollan lesiones tumorales mamarias (100), y están sensibilizados frente a tumores epiteliales de piel inducidos por carcinógenos (78).

TABLA I. *Análisis fenotípico de los ratones deficientes en caveolina.*

Cav-1 -/-	Cav-2 -/-	Cav-3 -/-
Ausencia de caveolas fibroblastos, endotelio y adipocitos	Presencia de caveolas	Ausencia de caveolas
Reducida expresión de Cav-2 recuperada con la expresión de Cav-1	Reducción parcial de expresión de Cav-1 en ciertos tejidos	Cambios miopáticos Variabilidad en el tamaño de la fibra muscular
MEFs Defectuosa endocitosis caveolar Fenotipo hiperproliferativo Disminución la fase G0/G1		Complejas distrofina-glicoproteína Deslocalizados No colocalización con balsas lipídicas
Anormalidades pulmonares Hiper celularidad Septo alveolar reducido Intolerancia al ejercicio Defectuosa endocitosis caveolar	Anormalidades pulmonares (idénticas a Cav-1 -/-) Septo alveolar reducido Intolerancia al ejercicio	Anormalidades del Túbulo-T Deslocalización de marcadores Receptor de Rianodina DHPR-1 α Túbulos-T (tinción de ferrocianato) dilatado/hinchado orientado longitudinalmente funcionan en direcciones irregulares
Disminución del tono vasculante Posterior a la activación de eNOS		
Anormalidades en adipocitos/lípidos Resistencia a la dicta inducida Obesidad Acúmulos grasos atróficos Reducción del diámetro de células adiposas Hiper celularidad diferenciada Hipertrigliceridemia		
Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Cáncer Mutación negativa dominante en cáncer de mama (P132L) en humanos (esporádica) Obesidad, hiperlipidemia diabetes	Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Importante modelo de estudio Cav-1 -/- y Vav-2 -/-	Relevancia clínica Distrofia muscular Mutación negativa dominante LGMD-1C en humanos Cav-3 (P104L) y otras (autosómica dpminente)

5. CAVEOLINA E HÍGADO

La distribución subcelular de la caveolina y los mecanismos que regulan su expresión en el hígado no se conocen en profundidad. La presencia de las caveolas/caveolina ha sido descrita en el hígado por Northern y Western blot (101-103), microscopía electrónica (104, 105) y experimentos de internalización de la toxina colérica o de la proteína de unión a retinol (RBP) (103, 106). El hígado está formado por células parenquimales, hepatocitos (80% de la masa hepática), y células no parenquimales (20%), que incluyen principalmente endotelio, células de Kuppfer y células de Ito. Aunque varios estudios han

descrito que la caveolina, en condiciones normales, tiene bajos niveles de expresión en el hígado (107, 108), no queda claro cual es su distribución celular en el tejido. Varios estudios han sugerido la presencia de la caveolina en las células endoteliales hepáticas (108, 109), sin embargo, otros trabajos describen que la caveolina se encuentra en los hepatocitos y no en las células endoteliales hepáticas que están enriquecidas en vesículas recubiertas de clatrina (110). También se ha descrito que las células de Ito y las células de Kupffer tienen caveolas (111, 112). El estudio de Ogi (113) caracterizó la localización ultraestructural de la caveolina en células endoteliales sinusoidales y células de Ito. Mediante microscopía electrónica e inmunotinción con oro describió que la Cav-1 estaba presente en ambos tipos celulares tanto en el aparato de Golgi, como en la membrana plasmática.

Las caveolas/caveolina están implicadas en potocitosis, endocitosis, transcitosis, tráfico de membrana y transducción de señales (114), pero en el hígado, las funciones en las que la caveolina está implicada no están bien definidas. En líneas celulares hepáticas, se ha descrito que la Cav-1 participa en la absorción de ácidos grasos de cadena larga (115) y en modelos *in vivo* se ha descrito que Cav-1 regula la secreción de sales biliares (116), el transporte reverso de colesterol (7), la internalización de ligandos específicos a través de caveolas (104), así como la actividad de eNOS inhibiéndola (117). Diversos trabajos sugieren un papel para Cav-1 como reguladora de señales mitogénicas en el hígado (37, 118).

Nuestros resultados en las líneas celulares hepáticas demuestran claramente que las células no tumorales y el cultivo primario de hepatocitos expresan una cantidad significativa de Cav-1 en concordancia con su estado de diferenciación, mientras que la Cav-1 no se detectó en las líneas celulares de hepatoma HepG2 y HuH-7. Demostramos que en células hepáticas no tumorales los estímulos proinflamatorios inducen la fosforilación de Cav-1 y la translocación de la proteína fosforilada a la fracción no caveolar. Además, la tirosina quinasa c-Src, que fosforila a Cav-1 en la Y¹⁴, se activó por factores de crecimiento y por estímulos pro-inflamatorios.

Diversos trabajos muestran que la Y¹⁴ de la Cav-1 puede ser rápidamente fosforilada en respuesta a estrés oxidativo (73, 119) y a

factores de crecimiento (120, 121). Estudios recientes sugieren que la fosforilación de Cav-1 sirve de anclaje para factores de crecimiento celular. Se ha propuesto que esta fosforilación permite la interacción con proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar vías de señalización (69, 70). En sentido opuesto, otros trabajos han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y¹⁴ de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (71). También se ha descrito que la fosforilación en Y¹⁴ regula la apoptosis mediada por fármacos anti-tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (72). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y¹⁴ a través de la activación de p38MAPK y c-Src (73). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas, uno de ellos es el «dominio de anclaje a caveolina» (CSD) por el que ejerce sus efectos inhibitorios y el otro sería la región N-terminal, donde se encuentra la Y¹⁴, que estaría promoviendo señales de proliferación (Figura 6).

Sin embargo, la localización precisa de Y¹⁴-P-Cav-1 es controvertida. Se ha propuesto que la Y¹⁴-P-Cav-1 se localiza en adhesiones focales, colocalizando con paxilina, en vesículas de fusión derivadas de caveolas, etc. (122) y también que Y¹⁴-P-Cav-1 se internaliza hacia la zona perinuclear después de estrés oxidativo (123). Los estudios en fibroblastos, líneas celulares endoteliales y de riñón han descrito que la fosforilación de la Cav-1 es necesaria para su internalización (9, 122, 124). Nuestros resultados con la línea celular CHL demuestran que los estímulos pro-inflamatorios inducen la translocación e internalización de la Cav-1 a la fracción no caveolar, estando implicada en este dinamismo la quinasa c-Src. Cuando se trató a las células con un inhibidor farmacológico de c-Src (PP2) se impidió la translocación mediada por estímulos pro-inflamatorios de la Cav-1 desde la FEC a la FNC. Estos resultados se confirmaron por microscopía confocal cuando las células CHL se transfectaron con un vector de expresión de la proteína de fusión Cav-1-GFP, donde se pudo observar que después del tratamiento de las células con estímulos pro-inflamatorios, tanto la Cav-1 endógena, como la Cav-1-GFP se encontraban en dominios citosólicos y que el tratamiento de las células con PP2 inhibía este movimiento. Además, mediante la utili-

zación de un mutante no fosforilable en la Y¹⁴ (Y14F-Cav-1) demostramos que la fosforilación de la Y¹⁴ de Cav-1 es necesaria para su internalización en células hepáticas, debido a que después del tratamiento con estímulos pro-inflamatorios solo la Cav-1 endógena aparecía en los dominios citosólicos, mientras que Y14F-Cav-1, en las diferentes condiciones experimentales, siempre se detectó en la membrana plasmática.

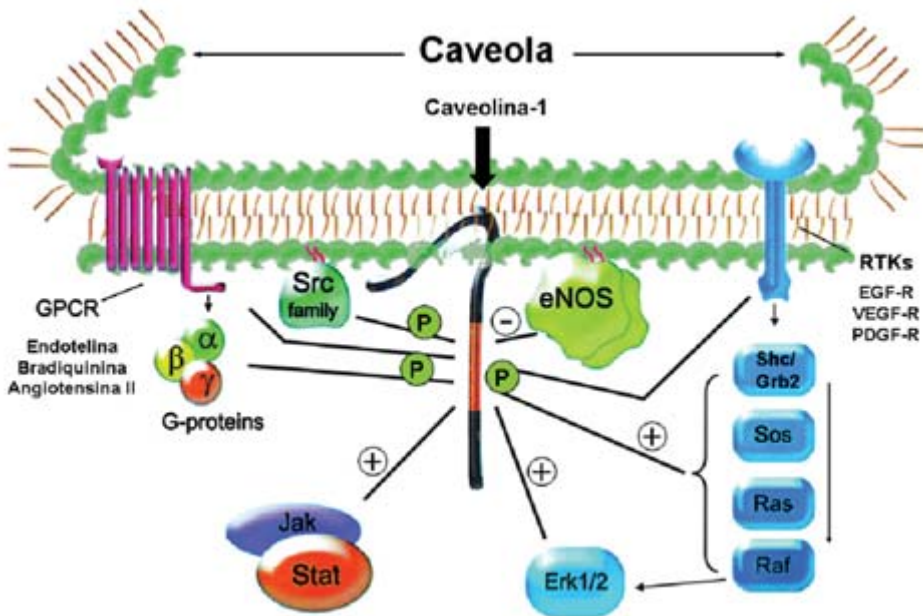


FIGURA 6. **Señalización a través de caveolas.** Las caveolas concentran gran cantidad de receptores de membrana y de proteínas transductoras de señales. Esta figura es una simplificación de la denominación de «señaloma» que reciben las caveolas. Cav-1 puede interactuar con diferentes proteínas a través de su dominio CSD e inhibir su señalización, como en el caso de eNOS. Pero además, Cav-1 puede ser fosforilada por quinasas de la familia de Src, en respuesta a la activación de receptores tirosina quinasa (RTKs) o receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) y transducir diferentes vías de proliferación (131).

En relación con la patología hepática, la sobre-expresión de Cav-1 ha sido descrita en cirrosis y carcinoma hepatocelular. Mediante análisis por microarrays de nódulos macro-regenerativos y displásicos (MDNS), que son lesiones precursoras de carcinoma hepatoce-

lular, se identificó una expresión anormal de Cav-1 y tromboespondina-1; sin embargo, los análisis histológicos revelaron una función para la caveolina a través de un incremento en las células endoteliales sinusoidales. Esta expresión alterada de Cav-1 probablemente no esté relacionada directamente con la transformación maligna de los hepatocitos y más bien esté implicada en el aporte vascular que llega a la lesión hepática (125). En hígado cirrótico humano se ha establecido una relación entre la sobre-expresión de Cav-1 y la reducción significativa de la actividad catalítica del óxido nítrico. El incremento de Cav-1 en las células perisinusoidales promueve su unión con la óxido nítrico endotelial, lo que conduce a su inhibición, reducción en la producción de óxido nítrico e incremento en el tono microvascular hepático (126, 127).

Debido a que a Cav-1 se le ha atribuido una función como una proteína supresora de tumores (9, 78-81), y que los fenómenos que hemos descrito hasta ahora indicaban que la Cav-1 y la fosforilación de su Y¹⁴ podían tener un papel importante en vías de proliferación, decidimos analizar cual era la expresión y distribución celular de la Cav-1 en un modelo *in vivo* de proliferación hepática como es el modelo de la regeneración que ocurre después de una hepatectomía parcial (128).

Pol y colaboradores (129) describieron un incremento y redistribución importante de Cav-1, en regeneración hepática después de HP, desde la superficie celular a los cuerpos lipídicos de nueva generación. Los autores sugieren que la asociación de Cav-1 con cuerpos lipídicos se produce junto con la movilización de los lípidos y la parada de la endocitosis y el tráfico de membrana que ocurre en el hígado regenerante. Nuestros resultados demuestran que después de una HP del 70% se produce un aumento significativo de la Cav-1, tanto de ARNm como de proteína, en el hígado regenerante y además se produce una translocación de la proteína desde la fracción enriquecida en caveolas a la fracción no caveolar formada principalmente por retículo endoplásmico y membrana plasmática, según indicaron los marcadores específicos. Al mismo tiempo, parte de la Cav-1 que es internalizada se encuentra fosforilada en Y¹⁴ (Figura 7), y conjuntamente los niveles de la quinasa c-Src activa se encontraron aumentados de manera significativa durante los primeros días de regeneración.

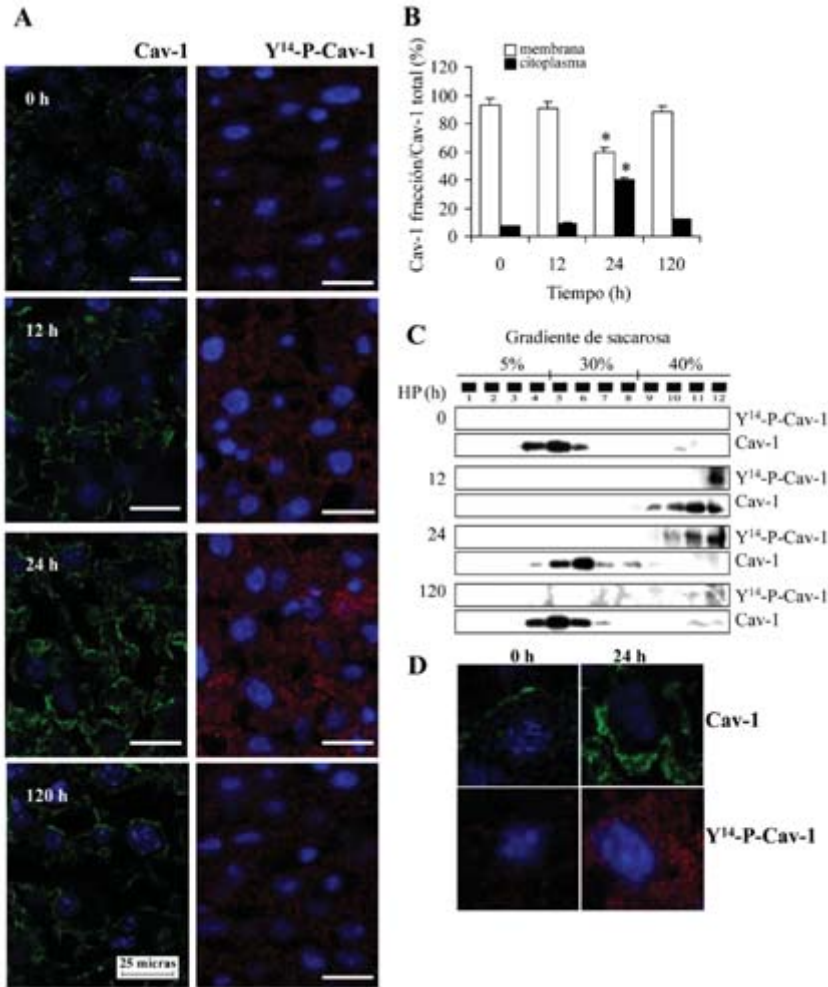


FIGURA 7. *Cav-1 se fosforila e internaliza en el hígado regenerante después de HP.* (A) Inmunohistoquímica representativa realizada sobre 7 secciones fijadas del hígado regenerante a 0, 12, 24, y 120 horas después de HP. Cav-1 fue marcada en verde, Y¹⁴-P-Cav-1 fue marcada en rojo y los núcleos fueron marcados en azul con Hoechst 33258. (B) Cuantificación de la Cav-1 de la Fig. 7A. Los resultados son expresados como el porcentaje de la fluorescencia de cada fracción vs. la fluorescencia total. (C) Análisis por Western blot de la distribución de Cav-1 y de Y¹⁴-P-Cav-1 en gradientes discontinuos de sacarosa. Los resultados muestran un Western blot representativo del gradiente de sacarosa para cada tiempo de regeneración. (D) Ampliación de las fotos de 7A a 0 y 24 horas. Los datos representan la media ± D.E. de cuatro experimentos independientes. *P<0,01 vs. el valor correspondiente a tiempo 0.

Como se ha descrito previamente, Cav-1 es considerada como una proteína supresora de tumores, sobretudo por su acción inhibitoria sobre vías pro-proliferativas y anti-apoptóticas. Cuando se analizó el crecimiento de fibroblastos embrionarios (MEFs) del ratón deficiente en Cav-1 (MEFs Cav-1^{-/-}) (13), se observó un incremento en la fase S del ciclo celular del 30% en comparación con su correspondiente control y además sobre un periodo de crecimiento en cultivo de 10 días, los MEFs de Cav-1^{-/-} crecen 3 veces más rápido que los Cav-1^{+/+}. Pero el ratón deficiente en Cav-1 no manifiesta ningún desarrollo acelerado de tumores en comparación con el ratón Cav-1^{+/+}. Es posible que la pérdida conjunta de Cav-1 y de otro gen supresor de tumores tenga un efecto sinérgico. Aún así, el ratón Cav-1^{-/-} es viable y fértil, pero tiene problemas de hiperproliferación celular y anomalías vasculares.

Con estos datos precedentes, con nuestros resultados *in vitro*, con las líneas celulares, y los resultados *in vivo*, con el modelo de regeneración hepática después de HP, supusimos que la Cav-1 debería tener un papel importante en las primeras etapas de la regeneración hepática, por ello analizamos en los ratones deficientes para Cav-1 el proceso de la regeneración hepática. Los resultados obtenidos en el ratón KO de Cav-1 demuestran que el proceso de regeneración después de HP no se afectó por la ausencia del gen de Cav-1 (Figura 8), por lo tanto, Cav-1 no es un gen esencial para la regeneración hepática.

Nuestros resultados demuestran que la Cav-1 en el curso de la regeneración hepática y en líneas celulares bajo estímulos pro-inflamatorios, incrementa su expresión, se transloca a las fracciones no caveolares (FNC) y en dichas fracciones se encuentra fosforilada en la Y¹⁴. Sin embargo, en el ratón Cav^{tm1Mls/J} la Cav-1 no es esencial para el proceso de regeneración hepática, ya que los ratones deficientes para Cav-1 sobreviven a la HP y la función y el tamaño del hígado se recuperan totalmente después de HP.

Por lo tanto la funcionalidad de Cav-1 consistiría en un mecanismo complementario a las diferentes señales de inhibición que se producen durante la regeneración hepática. Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y los que describen la relación de Cav-1 con el receptor de IL-6 y con los receptores del TGF- β , trabajos futuros

permitirán profundizar en la implicación de Cav-1 en estas dos vías de señalización durante los procesos proliferativos que tienen lugar en la regeneración hepática después de hepatectomía parcial.

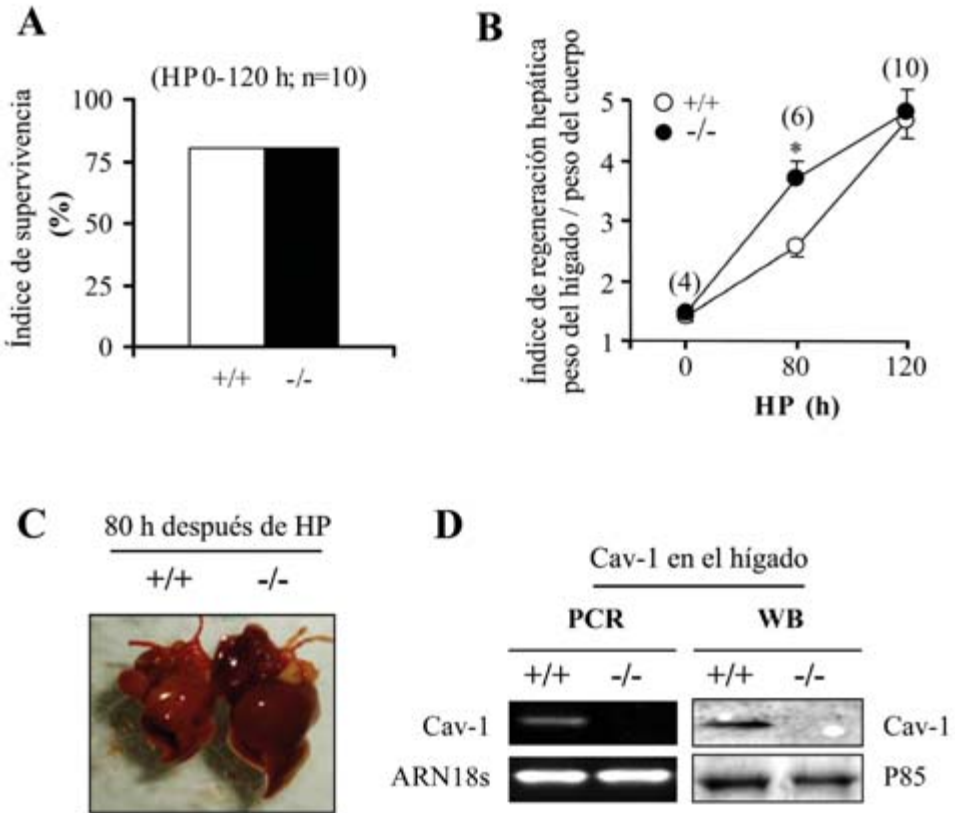


FIGURA 8. **Regeneración hepática después de HP en ratones Cav-1^{-/-} y Cav-1^{+/+}.** (A) Índice de supervivencia en ratones Cav-1^{+/+} y Cav-1^{-/-} después de 120 horas de la HP. (B) Índice de recuperación de la masa hepática a los tiempos indicados en la gráfica. El número de animales para cada tiempo se muestra entre paréntesis. (C) Foto representativa en la que se muestra la recuperación hepática a las 80 horas después de la HP. (D) Determinación de los niveles de ARNm, por PCR y de proteína por Western blot de Cav-1 en ratones Cav-1^{+/+} y Cav-1^{-/-}. La normalización del ARNm se realizó con 18S ARN para la PCR y con la subunidad p85 de la PI3K para el Western blot. Los resultados muestran un Western blot representativo de tres experimentos independientes. Los resultados son las medias \pm D.E. del número de ratones indicado. *P < 0.01 vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1^{+/+}.

REFERENCIAS

- (1) PALADE, G. E. (1953) Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Physics*. 24: 368-384.
- (2) YAMADA, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 445-458.
- (3) KURZCHALIA, T. V. AND PARTON, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 424-431.
- (4) SCHERER, P. E., LEWIS, R. Y., VOLONTE, D., ENGELMAN, J. A., GALBIATI, F., COUET, J., KOHTZ, D. S., VAN DONSELAAR, E., PETERS, P. AND LISANTI, M. P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272: 29337-29346.
- (5) SONG, K. S., SCHERER, P. E., TANG, Z., OKAMOTO, T., LI, S., CHAFEL, M., CHU, C., KOHTZ, D. S. AND LISANTI, M. P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271: 15160-15165.
- (6) SCHNITZER, J. E. (2001) Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49: 265-280.
- (7) FU, Y., HOANG, A., ESCHER, G., PARTON, R. G., KROZOWSKI, Z. AND SVIRIDOV, D. (2004) Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 279: 14140-14146.
- (8) OKAMOTO, T., SCHLEGEL, A., SCHERER, P. E. AND LISANTI, M. P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing «preassembled signaling complexes» at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 5419-5422.
- (9) DEL POZO, M. A., BALASUBRAMANIAN, N., ALDERSON, N. B., KIOSSES, W. B., GRANDE-GARCIA, A., ANDERSON, R. G. AND SCHWARTZ, M. A. (2005) Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7: 901-908.
- (10) WILLIAMS, T. M. AND LISANTI, M. P. (2005) Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288: C494-506.
- (11) DRAB, M., VERKADE, P., ELGER, M., KASPER, M., LOHN, M., LAUTERBACH, B., MENNE, J., LINDSCHAU, C., MENDE, F., LUFT, F. C., ET AL. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.
- (12) GALBIATI, F., ENGELMAN, J. A., VOLONTE, D., ZHANG, X. L., MINETTI, C., LI, M., HOU, H., JR., KNEITZ, B., EDELMANN, W. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 21425-21433.
- (13) RAZANI, B., ENGELMAN, J. A., WANG, X. B., SCHUBERT, W., ZHANG, X. L., MARKS, C. B., MACALUSO, F., RUSSELL, R. G., LI, M., PESTELL, R. G., ET AL. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 38121-38138.

- (14) RAZANI, B., WANG, X. B., ENGELMAN, J. A., BATTISTA, M., LAGAUD, G., ZHANG, X. L., KNEITZ, B., HOU, H., JR., CHRIST, G. J., EDELMANN, W. AND LISANTI, M. P. (2002) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2329-2344.
- (15) PARTON, R. G., WAY, M., ZORZI, N. AND STANG, E. (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 136: 137-154.
- (16) SCHERER, P. E., LISANTI, M. P., BALDINI, G., SARGIACOMO, M., MASTICK, C. C. AND LODISH, H. F. (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell. Biol.* 127: 1233-1243.
- (17) SIMIONESCU, M., SIMIONESCU, M. AND PALADE, G. E. (1975) Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell. Biol.* 64: 586-607.
- (18) SINGER, S. J. AND NICOLSON, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731.
- (19) VEREB, G., SZOLLOSI, J., MATKO, J., NAGY, P., FARKAS, T., VIGH, L., MATYUS, L., WALDMANN, T. A. AND DAMJANOVICH, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 8053-8058.
- (20) BROWN, D. A. AND LONDON, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 111-136.
- (21) SIMONS, K. AND TOOMRE, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 31-39.
- (22) LIU, J., OH, P., HORNER, T., ROGERS, R. A. AND SCHNITZER, J. E. (1997) Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J. Biol. Chem.* 272: 7211-7222.
- (23) BROWN, D. A. AND ROSE, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68: 533-544.
- (24) LISANTI, M. P., SCHERER, P. E., VIDUGIRIENE, J., TANG, Z., HERMANOWSKI-VOSATKA, A., TU, Y. H., COOK, R. F. AND SARGIACOMO, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell. Biol.* 126: 111-126.
- (25) GLENNEY, J. R. J. AND ZOKAS, L. (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 108: 2401-2408.
- (26) ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. AND ANDERSON, R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68: 673-682.
- (27) SCHERER, P. E., TANG, Z., CHUN, M., SARGIACOMO, M., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270: 16395-16401.
- (28) SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1996) Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 131-135.

- (29) TANG, Z., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., SONG, K., CHU, C., KOHTZ, D. S., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271: 2255-2261.
- (30) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L. AND LISANTI, M. P. (1998) Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett.* 436: 403-410.
- (31) JENKINS, R. B., QIAN, J., LEE, H. K., HUANG, H., HIRASAWA, K., BOSTWICK, D. G., PROFFITT, J., WILBER, K., LIEBER, M. M., LIU, W., AND SMITH, D. I. (1998). A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res* 58, 759-766.
- (32) LEE, H., PARK, D. S., RAZANI, B., RUSSELL, R. G., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2002) Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 161: 1357-1369.
- (33) SHRIDHAR, V., SUN, Q. C., MILLER, O. J., KALEMKERIAN, G. P., PETROS, J. AND SMITH, D. I. (1997) Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene.* 15: 2727-2733.
- (34) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L. AND LISANTI, M. P. (1999) Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett.* 448: 221-230.
- (35) McNALLY, E. M., DE SA MOREIRA, E., DUGGAN, D. J., BONNEMANN, C. G., LISANTI, M. P., LIDOV, H. G., VAINZOF, M., PASSOS-BUENO, M. R., HOFFMAN, E. P., ZATZ, M. AND KUNKEL, L. M. (1998) Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 7: 871-877.
- (36) MINETTI, C., SOTGIA, F., BRUNO, C., SCARTEZZINI, P., BRODA, P., BADO, M., MASETTI, E., MAZZOCCO, M., EGEO, A., DONATI, M. A., ET AL. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18: 365-368.
- (37) RAZANI, B., WOODMAN, S. E. AND LISANTI, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54: 431-467.
- (38) GABELLA, G. (1976). Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell. Tissue Res.* 170: 161-186.
- (39) GIL, J. (1983) Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed. Proc.* 42: 2414-2418.
- (40) MOBLEY, B. A. AND EISENBERG, B. R. (1975) Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.* 66: 31-45.
- (41) NAPOLITANO, L. (1963) The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study. *J. Cell. Biol.* 18: 663-679.
- (42) CAMERON, P. L., RUFFIN, J. W., BOLLAG, R., RASMUSSEN, H. AND CAMERON, R. S. (1997). Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J. Neurosci.* 17: 9520-9535.

- (43) FRA, A. M., WILLIAMSON, E., SIMONS, K. AND PARTON, R. G. (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem.* 269: 30745-30748.
- (44) SARGIACOMO, M., SUDOL, M., TANG, Z.-L. AND LISANTI, M. P. (1993) Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin- rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 122: 789-807.
- (45) LISANTI, M. P., SCHERER, P., TANG, Z.-L. AND SARGIACOMO, M. (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: A signalling hypothesis. *Trends Cell. Biol.* 4: 231-235.
- (46) FERON, O., BELHHASSEN, L., KOBZIK, L., SMITH, T. W., KELLY, R. A. AND MICHEL, T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 22810-22814.
- (47) GARCIA-CARDENA, G., OH, P., LIU, J., SCHNITZER, J. E. AND SESSA, W. C. (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for caveolae localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6448-6453.
- (48) LI, S., COUET, J. AND LISANTI, M. P. (1996) Src tyrosine kinases, G alpha subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 29182-29190.
- (49) LI, S., OKAMOTO, T., CHUN, M., SARGIACOMO, M., CASANOVA, J. E., HANSEN, S. H., NISHIMOTO, I. AND LISANTI, M. P. (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270: 15693-15701.
- (50) SONG, K. S., LI, S., OKAMOTO, T., QUILLIAM, L., SARGIACOMO, M. AND LISANTI, M. P. (1996) Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes. *J. Biol. Chem.* 271: 9690-9697.
- (51) SONG, K. S., SARGIACOMO, M., GALBIATI, F., PARENTI, M. AND LISANTI, M. P. (1997) Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* 43: 293-303.
- (52) PAWSON, T. AND SCOTT, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science.* 278: 2075-2080.
- (53) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L., GALBIATI, F., VOLONTE, D., SOTGIA, F., PESTELL, R. G., MINETTI, C., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. AND LISANTI, M. P. (1998) Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer's disease and muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genetics.* 63: 1578-1587.
- (54) SMART, E. J., GRAF, G. A., MCVIVEN, M. A., SESSA, W. C., ENGELMAN, J. A., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. AND P., L. M. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7289-7304.
- (55) COUET, J., SARGIACOMO, M. AND LISANTI, M. P. (1997) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* 30429-30438.

- (56) ENGELMAN, J. A., LEE, R. J., KARNEZIS, A., BEARSS, D. J., WEBSTER, M., SIEGEL, P., MULLER, W. J., WINDLE, J. J., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (1998) Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J. Biol. Chem.* 20448-20455.
- (57) GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D., LIU, J. AND SESSA, W. C. (1996) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 271: 27237-27240.
- (58) LIU, J., GARCIA, G. AND SESSA, W. C. (1996) Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry.* 35: 13277-13281.
- (59) MICHEL, J. B., FERON, O., SACKS, D. AND MICHEL, T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272: 15583-15586.
- (60) SOWA, G., PYPAERT, M. AND SESSA, W. C. (2001) Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14072-14077.
- (61) COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., IKEZU, T. AND LISANTI, M. P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272. 6525-6533.
- (62) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L., RAZANI, B., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (1999) p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J. Biol. Chem.* 32333-32341.
- (63) GALBIATI, F., VOLONTE, D., LIU, J., CAPOZZA, F., FRANK, P. G., ZHU, L., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol. Cell.* 2229-2244.
- (64) GALVEZ, B. G., MATIAS-ROMAN, S., YANEZ-MO, M., VICENTE-MANZANARES, M., SANCHEZ-MADRID, F. AND ARROYO, A. G. (2004) Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 678-687.
- (65) PUYRAIMOND, A., FRIDMAN, R., LEMESLE, M., ARBEILLE, B. AND MENASHI, S. (2001) MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* 28-36.
- (66) OSTROM, R. S., VIOLIN, J. D., COLEMAN, S. AND INSEL, P. A. (2000) Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol. Rev.* 57: 1075-1079.
- (67) RYBIN, V. O., XU, X., LISANTI, M. P. AND STEINBERG, S. F. (2000) Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 41447-41457.

- (68) SCHWENCKE, C., OKUMURA, S., YAMAMOTO, M., GENG, Y. J. AND ISHIKAWA, Y. (1999) Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J. Cell. Biochem.* 75: 64-72.
- (69) LEE, H., VOLONTE, D., GALBIATI, F., IYENGAR, P., LUBLIN, D. M., BREGMAN, D. B., WILSON, M. T., CAMPOS-GONZALEZ, R., BOUZAHZAH, B., PESTELL, R. G., *ET AL.* (2000) Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol.* 14: 1750-1775.
- (70) ORLICHENKO, L., HUANG, B., KRUEGER, E. AND MCVIVEN, M. A. (2006) Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 281: 4570-4579.
- (71) DEL POZO, M. A. AND SCHWARTZ, M. A. (2007) Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell. Biol.* 17 : 246-250.
- (72) SHAJAHAN, A. N., WANG, A., DECKER, M., MINSHALL, R. D., LIU, M. C. AND CLARKE, R. (2007) Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 282: 5934-5943.
- (73) VOLONTE, D., GALBIATI, F., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 276: 8094-8103.
- (74) ENGELMAN, J. A., WYCOFF, C. C., YASUHARA, S., SONG, K. S., OKAMOTO, T. AND LISANTI, M. P. (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272: 16374-16381.
- (75) PARK, D. S., RAZANI, B., LASORELLA, A., SCHREIBER-AGUS, N., PESTELL, R. G., IAVARONE, A. AND LISANTI, M. P. (2001) Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry.* 40: 3354-3362.
- (76) BIST, A., FIELDING, P. E. AND FIELDING, C. J. (1997) Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10693-10698.
- (77) RAZANI, B., ALTSCHULER, Y., ZHU, L., PESTELL, R. G., MOSTOV, K. E. AND LISANTI, M. P. (2000) Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry.* 39: 13916-13924.
- (78) CAPOZZA, F., WILLIAMS, T. M., SCHUBERT, W., MCCLAIN, S., BOUZAHZAH, B., SOTGIA, F. AND LISANTI, M. P. (2003) Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am. J. Pathol.* 162: 2029-2039.
- (79) FIUCCI, G., RAVID, D., REICH, R. AND LISCOVITCH, M. (2002) Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene.* 21: 2365-2375.

- (80) WIECHEN, K. (2001). Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol.* 159: 1635-1643.
- (81) WILLIAMS, T. M. (2004) Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J. Biol. Chem.* 279: 51630-51646.
- (82) LEE, S. W., REIMER, C. L., OH, P., CAMPBELL, D. B. AND SCHNITZER, J. E. (1998) Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene.* 16: 1391-1397.
- (83) ENGELMAN, J. A., CHU, C., LIN, A., JO, H., IKEZU, T., OKAMOTO, T., KOHTZ, D. S. AND LISANTI, M. P. (1998) Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett.* 428: 205-211.
- (84) LIU, P., YING, Y., KO, Y. G., AND ANDERSON, R. G. (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol. Chem.* 271: 10299-10303.
- (85) YAMAMOTO, M., TOYA, Y., JENSEN, R. A. AND ISHIKAWA, Y. (1999) Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp. Cell. Res.* 247: 380-388.
- (86) ZUNDEL, W., SWIERSZ, L. M. AND GIACCIA, A. (2000) Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1507-1514.
- (87) LIU, P. AND ANDERSON, R. G. (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 270: 27179-27185.
- (88) SCHEEL, J., SRINIVASAN, J., HONNERT, U., HENSKE, A. AND KURZCHALIA, T. V. (1999) Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* 1: 127-129.
- (89) HAYASHI, K., MATSUDA, S., MACHIDA, K., YAMAMOTO, T., FUKUDA, Y., NIMURA, Y., HAYAKAWA, T. AND HAMAGUCHI, M. (2001) Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res.* 61: 2361-2364.
- (90) CUI, J., ROHR, L. R., SWANSON, G., SPEIGHTS, V. O., MAXWELL, T. AND BROTHMAN, A. R. (2001) Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate.* 46: 249-256.
- (91) HURLSTONE, A. F., REID, G., REEVES, J. R., FRASER, J., STRATHDEE, G., RAHILLY, M., PARKINSON, E. K. AND BLACK, D. M. (1999) Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene.* 18: 1881-1890.
- (92) DRUMHELLER, T., MCGILLIVRAY, B. C., BEHRNER, D., MACLEOD, P., MCFADDEN, D. E., ROBERSON, J., VENDITTI, C., CHORNEY, K., CHORNEY, M. AND SMITH, D. I. (1996) Precise localisation of 3p25 breakpoints in four patients with the 3p-syndrome. *J. Med. Genet.* 33: 842-847.
- (93) PATLOLLA, J. M., SWAMY, M. V., RAJU, J. AND RAO, C. V. (2004). Overexpression of caveolin-1 in experimental colon adenocarcinomas and human colon cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 11: 957-963.

- (94) RAJJAYABUN, P. H., GARG, S., DURKAN, G. C., CHARLTON, R., ROBINSON, M. C. AND MELLON, J. K. (2001) Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer. *Urology*. 58: 811-814.
- (95) TIRADO, O. M., MATEO-LOZANO, S., VILLAR, J., DETTIN, L. E., LLORT, A., GALLEGRO, S., BAN, J., KOVAR, H. AND NOTARIO, V. (2006) Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 66: 9937-9947.
- (96) WILLIAMS, T. M., HASSAN, G. S., LI, J., COHEN, A. W., MEDINA, F., FRANK, P. G., PESTELL, R. G., DI VIZIO, D., LODA, M. AND LISANTI, M. P. (2005) Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J. Biol. Chem*. 280: 25134-25145.
- (97) SALATINO, M., BEGUELIN, W., PETERS, M. G., CARNEVALE, R., PROIETTI, C. J., GALIGNIANA, M. D., VEDOY, C. G., SCHILLACI, R., CHARREAU, E. H., SOGAYAR, M. C. AND ELIZALDE, P. V. (2006) Progesterin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 25: 7723-7739.
- (98) YANG, G., TIMME, T. L., FROLOV, A., WHEELER, T. M. AND THOMPSON, T. C. (2005) Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer*. 103: 1186-1194.
- (99) RAZANI, B. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest*. 108: 1553-1561.
- (100) WILLIAMS, T. M., CHEUNG, M. W., PARK, D. S., RAZANI, B., COHEN, A. W., MULLER, W. J., DI VIZIO, D., CHOPRA, N. G., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2003) Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol. Biol. Cell*. 14. 1027-1042.
- (101) GLENNEY, J. R., JR. (1992) The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett*. 314: 45-48.
- (102) HENLEY, J. R., KRUEGER, E. W., OSWALD, B. J. AND MCNIVEN, M. A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol*. 141: 85-99.
- (103) MALABA, L., SMELAND, S., SENOO, H., NORUM, K. R., BERG, T., BLOMHOFF, R. AND KINDBERG, G. M. (1995) Retinol-binding protein and asialo-orosomucoid are taken up by different pathways in liver cells. *J. Biol. Chem*. 15686-15692.
- (104) JANICOT, M., FOUQUE, F. AND DESBUQUOIS, B. (1991) Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *J. Biol. Chem*. 266: 12858-12865.
- (105) MONTESANO, R., ROTH, J., ROBERT, A. AND ORCI, L. (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature (Lond)*. 296: 651-653.
- (106) JANICOT, M., CLOT, J. P. AND DESBUQUOIS, B. (1988) Interactions of cholera toxin with isolated hepatocytes. Effects of low pH, chloroquine and monensin on toxin internalization, processing and action. *Biochem. J*. 253: 735-743.
- (107) OH, P., MCINTOSH, D. P. AND SCHNITZER, J. E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven

- fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell. Biol.* 141: 101-114.
- (108) SHAH, V., TORUNER, M., HADDAD, F., CADELINA, G., PAPAPETROPOULOS, A., CHOO, K., SESSA, W. C. AND GROSZMANN, R. J. (1999) Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*. 117: 1222-1228.
- (109) GARVER, W. S., ERICKSON, R. P., WILSON, J. M., COLTON, T. L., HOSSAIN, G. S., KOZLOSKI, M. A. AND HEIDENREICH, R. A. (1997) Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C. *Biochim. Biophys. Acta*. 1361: 272-280.
- (110) CALVO, M., TEBAR, F., LOPEZ-IGLESIAS, C. AND ENRICH, C. (2001). Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology*. 33: 1259-1269.
- (111) OHATA, M. AND ITO, T. (1986) Experimental study on the fine structure of chicken liver parenchyme with special references to extrasinusoidal macrophages and sinusoidal blood cells. Part 1. Sinusoidal cells and macrophages in the normal and India ink-perfused livers. *Arch. Histol. Jpn.* 49: 83-103.
- (112) TANUMA, Y., OHATA, M. AND ITO, T. (1983). Electron microscopic studies on the sinusoidal cells in the monkey liver. *Arch. Histol. Jpn.* 46: 401-426.
- (113) OGI, M., YOKOMORI, H., ODA, M., YOSHIMURA, K., NOMURA, M., OHSHIMA, S., AKITA, M., TODA, K. AND ISHII, H. (2003) Distribution and localization of caveolin-1 in sinusoidal cells in rat liver. *Med. Electron. Microsc.* 36: 33-40.
- (114) PARTON, R. G. AND SIMONS, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 185-194.
- (115) POHL, J., RING, A. AND STREMMEL, W. (2002) Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res.* 43: 1390-1399.
- (116) MORENO, M., MOLINA, H., AMIGO, L., ZANLUNGO, S., ARRESE, M., RIGOTTI, A. AND MIQUEL, J. F. (2003) Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice. *Hepatology*. 38: 1477-1488.
- (117) SHAH, V., CAO, S., HENDRICKSON, H., YAO, J. AND KATUSIC, Z. S. (2001) Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G1209-1216.
- (118) MORA, R. C., BONILHA, V. L., SHIN, B. C., HU, J., COHEN-GOULD, L., BOK, D. AND RODRIGUEZ-BOULAN, E. (2006) Bipolar assembly of caveolae in retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290: C832-843.
- (119) SANGUINETTI, A. R. AND MASTICK, C. C. (2003) c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell. Signal.* 15: 289-298.
- (120) FIELDING, P. E., CHAU, P., LIU, D., SPENCER, T. A. AND FIELDING, C. J. (2004) Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. *Biochemistry*. 43: 2578-2586.
- (121) KIM, Y. N., WIEPZ, G. J., GUADARRAMA, A. G. AND BERTICS, P. J. (2000) Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. En-

- hanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. *J. Biol. Chem.* 275: 7481-7491.
- (122) AOKI, T., NOMURA, R. AND FUJIMOTO, T. (1999) Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp. Cell Res.* 253: 629-636.
- (123) CHEN, D. B., LI, S. M., QIAN, X. X., MOON, C. AND ZHENG, J. (2005) Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells. *Biol. Reprod.* 73: 761-772.
- (124) PARTON, R. G., JOGGERST, B. AND SIMONS, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol.* 127: 1199-1215.
- (125) YERIAN, L. M., ANDERS, R. A., TRETIAKOVA, M. AND HART, J. (2004) Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 28: 357-364.
- (126) YOKOMORI, H., ODA, M., OGI, M., SAKAI, K. AND ISHII, H. (2002) Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver.* 22: 150-158.
- (127) YOKOMORI, H., ODA, M., YOSHIMURA, K., NOMURA, M., WAKABAYASHI, G., KITAJIMA, M. AND ISHII, H. (2003) Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. *J. Gastroenterol.* 38: 854-860.
- (128) FAUSTO, N., CAMPBELL, J. S. AND RIEHLE, K. J. (2006) Liver regeneration. *Hepatology.* 43: S45-53.
- (129) POL, A., MARTIN, S., FERNANDEZ, M. A., FERGUSON, C., CAROZZI, A., LUETTERFORST, R., ENRICH, C. AND PARTON, R. G. (2004) Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell.* 15: 99-110.
- (130) HNASKO, R. AND LISANTI, M. P. (2003) The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv.* 3: 445-464.
- (131) GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P. AND SESSA, W. C. (2004) Caveolae and Caveolins in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 94: 1408-1417.