

Received: 2014.10.09
Accepted: 2015.04.30
Published: 2015.07.07

Endocytoza niezależna od klatryny – rola w patomechanizmie chorób i aspekty farmaceutyczne

Clathrin-independent endocytosis – role in disease processes and pharmaceutical aspects

Bogusława Konopska, Krzysztof Gołąb, Jakub Gburek

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Endocytoza niezależna od klatryny (CIE) jest procesem pobierania przez komórki różnych cząstek, w tym również drobnoustrojów chorobotwórczych, bez udziału białka oplaszczającego klatryny. Zachodzi w komórkach ssaków i jest regulowana białkowo-lipidowym składem błon komórkowych. Poznanie różnych szlaków CIE pozwoliło na identyfikację nowych mechanizmów molekularnych uczestniczących w pobieraniu cząsteczek i w sygnalizacji komórkowej oraz wyjaśniło ich rolę w procesach patologicznych. W pracy opisano choroby związane z genetycznymi wadami białek uczestniczących w CIE oraz związek między ich ekspresją a patomechanizmem miażdżycy, hipercholesterolemii, cukrzycy i nowotworzeniem. Przedstawiono również rolę CIE w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych i pierwotniakowych. Opisano możliwości wykorzystania endocytozy niezależnej od klatryny do zwiększenia wchłaniania leków i ich przechodzenia przez błony biologiczne oraz do projektowania swoistych nanonośników, pobieranych selektywnie przez komórki.

Słowa kluczowe: endocytoza patogenów • kaweole • nanocząsteczki

Summary

Clathrin-independent endocytosis (CIE) is the process of cellular uptake of various particles, including pathogens, without the coat protein clathrin. It occurs commonly in mammalian cells and is regulated by protein-lipid composition of the cell membranes. Understanding of different routes of CIE allowed the identification of novel molecular mechanisms involved in uptake of molecules and cell signaling and explained their role in pathological processes. In this paper we characterize diseases associated with genetic defects of proteins involved in CIE and the relationship between expression of these proteins and pathology of atherosclerosis, hypercholesterolemia, diabetes and neoplasia. The role of CIE in bacterial, viral, fungal, and protozoal infections is also presented. In the second part we describe the plausible use of clathrin-independent endocytosis in increasing drug absorption, their penetration through biological membranes, and the design of specific nanocarriers for selective cell uptake.

Keywords: caveolae • endocytosis of pathogens • nanoparticles

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=XXXXXX>

Word count: 6277
Tables: 1
Figures: 1
References: 76

Adres autorki: dr Bogusława Konopska, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław; e-mail: boguslawa.konopska@umed.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AGEs** – końcowe produkty zaawansowanej glikacji (advanced glycation end products); **BBB** – bariera krew-mózg; **CAV1** – kaweolina 1, **CAV2** – kaweolina 2, **CAV3** – kaweolina 3; **CDR** – koliste pofałdowania grzbietowe (circular dorsal ruffles); **CFTR** – błonowy regulator przewodnictwa (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); **CIE** – endocytoza niezależna od klatryny (clathrin-independent endocytosis); **CLIC/GEEC** – przenośnik niezależny od klatryny/wczesny przedział endosomalny bogaty w białko GPI (clathrin-independent carrier/glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored protein enriched early endosomal compartment); **CMKLR1** – receptor chemeryny (chemokine-like receptor 1); **CPMV** – wirus mozaikowości fasolnika chińskiego; **Ctx** – toksyna cholery; **EGFR** – receptor czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor receptor); **ER** – siateczka śródplazmatyczna (endoplasmic reticulum); **ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (extracellular signal-regulated kinase); **GPI** – kotwica glikozylofosfatydilinozytolowa; **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **IAV** – wirus grypy typu A (influenza A virus); **IL-2R** – receptor interleukiny 2; **LDL** – lipoproteiny o małej gęstości (low-density lipoprotein); **LDLR** – receptor lipoprotein LDL; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzący z płytek (platelet-derived growth factor); **PDGFR** – receptor PDGF; **PI3K** – kinaza 3-fosfatydilinozytolu; **RTK** – receptorowa kinaza tyrozynowa; **SIV** – małpi wirus niedoboru odporności (simian immunodeficiency virus); **SPARC** – kwasowe białko wydzielnicze bogate w cysteinę (secreted protein, acidic and rich in cysteine); **Stx** – toksyna Shiga; **SV40** – małpi wirus 40 (simian virus 40); **T3SS** – system sekrecji typu III (type III secretion system); **TFR** – receptor transferyny.

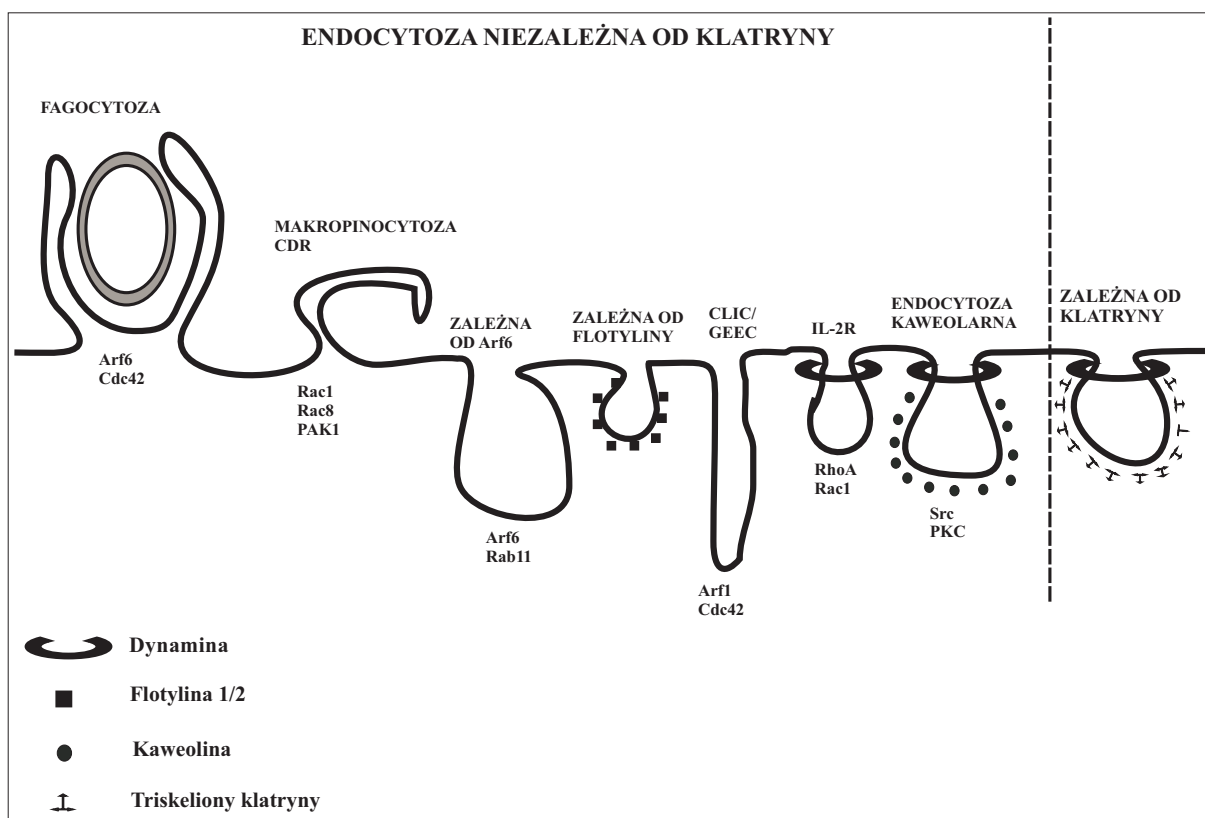
WSTĘP

Endocytoza niezależna od klatryny (CIE – clathrin-independent endocytosis) to proces pobierania przez komórki różnych cząsteczek egzogennych i substancji rozpuszczonych w płynie zewnątrzkomórkowym, który odbywa się bez udziału białka strukturalnego klatryny, a warunkowany jest przez skład lipidowy i białkowy błony komórkowej. Proces zachodzi w obrębie dynamicznych, płaskich domen błonowych zwanych tratwami lipidowymi. Tratwy lipidowe są zbudowane głównie z cholesterolu, sfingolipidów, w tym glikolipidów oraz glicerofosfolipidów wzbogaconych w nasycone kwasy tłuszczowe [64]. Odrębnym typem CIE jest endocytoza z udziałem kaweoli, czyli butelkowatych tworów błony komórkowej o średnicy kilkudziesięciu nm. Kaweole mają taki sam skład lipidowy jak tratwy, ale różnią się obecnością kaweolin. Są to swoiste białka listka wewnętrznego błony komórkowej, które wiążą cholesterol i tworząc oligomeryczny kompleks, warunkują względną stabilność kaweoli [33]. Komórki pochodzące z różnych tkanek różnią się ilością kaweoli. Nawet w obrębie jednej komórki można zaobserwować zróżnicowanie gęstości kaweoli w błonie komórkowej. Na przykład w komórkach migrujących endocytoza zachodząca bez udziału klatryny i kaweoli dominuje w części czo-

łowej komórki, natomiast część tylna komórki obfituje w kaweole [46].

CIE jest złożonym zjawiskiem, regulowanym przez niskocząsteczkowe białka błonowe o aktywności GTP-az: RhoA, Cdc42, Rac1, Arf6, Rab8 oraz kinazy i fosfolipazy błonowe. CIE można również podzielić na różne typy w oparciu o morfologię fragmentów pączkującej błony, rodzaj transportowanego materiału, mechanizmy molekularne regulujące dany proces oraz wrażliwość na inhibitory [24]. Endocytoza CIE może angażować duże obszary błonowe (fagocytoza, makropinocytoza, koliste pofałdowania grzbietowe, entozoa) lub polegać na tworzeniu mikrodołków o różnym kształcie. W tym drugim przypadku wymienia się endocytozę kaweolarną, endocytozę typu CLIC/GEEC (clathrin-independent carriers/glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored protein enriched early endosomal compartment), endocytozę charakterystyczną dla receptora interleukiny 2 (IL-2R), endocytozę zależną od białka Arf6 i endocytozę zależną od flotyliny (ryc. 1). Dokładną charakterystykę znanych typów CIE oraz ich fizjologiczne znaczenie szczegółowo omówiono w artykułach przeglądowych [14,28,32]. W pracy uwagę skupiono na roli CIE w patofizjologii chorób oraz na potencjalnym wykorzystaniu swoistych szlaków CIE do ukierunkowanego dostarczenia leków.





Ryc. 1. Szlaki endocytozy w komórkach eukariotycznych. CIE dzieli się na endocytozę kaweolarną i inne typy endocytozy. Wśród pozostałych typów wyróżnia się jeszcze endocytozę zachodzącą z udziałem dynaminy oraz bez udziału dynaminy. Odmienne szlaki endocytozy różnią się morfologią struktur pączkujących z błony, zależnością od małych błonowych GTP-az (Arf1, Arf6, Cdc 42, Rab11, Rac1, Rac8, RhoA) oraz od kinaz błonowych (PAK1, PKC, Src)

CIE W PATOGENEZIE CHOROÓB

Kaweole i choroby z nimi związane

Kaweole są butelkowatymi lub rzadziej kubkowatymi wgłębieniami błony komórkowej, zawierającymi swoiste palmitoilowane białka wiążące cholesterol zwane kaweolinami. Występują powszechnie w komórkach nabłonkowych, śródbłonkowych, adipocytach, fibroblastach i pneumocytach typu I. Kaweole, oprócz uczestniczenia w endocytozie, odbierają bodźce mechaniczne i pełnią funkcję platform sygnalizacyjnych. Ta druga rola jest szczególnie wyrażona w komórkach śródbłonka, w których kaweole gromadzą wiele białek receptorowych i regulatorowych, m.in. receptory kinazy tyrozynowe, receptory sprzężone z białkami G, receptory czynników wzrostu oraz śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS) [33,47,66]. Charakterystyczną cechą kaweoli, oprócz występowania kaweolin, jest obecność znacznych ilości cholesterolu i sfingolipidów. U ssaków zidentyfikowano trzy kaweoliny: kaweolinę 1 (CAV1), 2 (CAV2) i 3 (CAV3). Pierwsze dwa białka ulegają ekspresji we wszystkich tkankach organizmu i odpowiadają za formowanie się kaweoli, natomiast CAV3 jest swoista dla mięśni poprzecznie prążkowanych oraz mięśnia sercowego [46]. Kaweoliny 1 i 3 mogą występować w błonie komórkowej poza obrębem kaweoli, uczestnicząc w ujemnej regula-

cji CIE. Wykazano, że CAV1 przez wiązanie cholesterolu wpływa na przemieszczanie się w błonie białek z rodziny małych GTP-az, niezbędnych m.in. do aktywacji szlaku CLIC/GEEC. Podobnie CAV3 hamuje różne szlaki endocytozy, w tym również endocytozę z udziałem klatryny [6].

Mimo że CAV3 jest białkiem charakterystycznym dla kardiomiocytów, to niedobór CAV1 jest wiązany z hipertrofią i następczą niewydolnością mięśnia sercowego. Dotyczy to kaweoliny umiejscowionej w komórkach śródbłonka naczyń wieńcowych, biorących udział w regulacji angiogenezy [52]. Angiogenetyczne działanie CAV1 zostało początkowo wykazane w wielu badaniach *in vitro*, najczęściej opartych na liniach komórkowych śródbłonka naczyniowego oraz *in vivo* u myszy z nokautem genu kaweoliny 1. Udowodniono, że CAV1 jest niezbędna do migracji komórek stymulowanych czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF). Badania zgadzają się z obserwacjami klinicznymi, wiążącymi zwiększoną ekspresję CAV1 z bogatszym ukrwieniem tkanek nowotworowych w raku nerki, stercza, wątroby i oponiaku [66]. Istnieją również doniesienia literaturowe o antyproliferacyjnym działaniu CAV1 na śródbłonek naczyniowy [13,34]. To dwukierunkowe działanie CAV1 w regulacji angiogenezy, szczególnie w przypadku naczyniotworzenia indukowanego zmianą nowotworową, wynika prawdopodobnie ze złożoności procesu,

zależnego od dostępności czynników stymulujących bądź hamujących. W nieobecności lub przy małych stężeniach czynników proangiogennych CAV1 działa hamująco na angiogenezę. Przekroczenie krytycznego stężenia tych czynników może aktywować angiogennicne działanie CAV1 [66].

CAV3 bierze udział w patogenezie dystrofii mięśniowej Duchenne'a, będącej skutkiem mutacji w genie kodującym białko dystrofinę. W przebiegu tej choroby obserwuje się zwiększoną ekspresję CAV3 i nieprawidłowe, olbrzymie kaweole. Udowodniono, że dystrofina w błonie komórek mięśniowych jest stabilizowana przez tworzenie kompleksów z CAV3. Patologiczną rolę CAV3 w dystrofii mięśniowej potwierdziły badania transgenicznych myszy z nadekspresją genu CAV3, u których obserwowano zanik mięśni szkieletowych z niemal całkowitym brakiem ekspresji dystrofiny oraz zastępowanie martwych włókien mięśniowych przez tkankę łączną, tzw. zwłóknienie mięśni [20]. Ponadto zwierzęta z nokautem CAV3 mają cechy charakterystyczne dla wrodzonych dystrofii kończynowo-obrzęzowych, a niektóre mutacje punktowe w genie CAV3 przejawiają się fenotypowo jako miopatie z patologiczną kurczliwością mięśni [61].

Jak wcześniej wspomniano, CAV3 jest charakterystycznym białkiem strukturalnym kaweoli kardiomiocytów i zaburzenie jej funkcjonowania jest podstawą uszkodzenia mięśnia sercowego w następstwie niedokrwiennej reperfuzji [56]. W badaniach na zwierzętach tzw. hartowanie niedokrwieniem (ischemic preconditioning), czyli naprzemienne cykle okluzji i reperfuzji udrażnianej tętnicy zmniejszające obszary niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia sercowego, było związane ze zwiększeniem ekspresji CAV3 w kardiomiocytach. Temu zjawisku towarzyszyło również zwiększenie aktywności serynowo-treoninowej kinazy białkowej Akt i kinazy syntazy glikogenu GSK3 β , które spełniają istotną funkcję w zwiększeniu oporności komórek na niedokrwienie [70]. Nadekspresję CAV3 można uzyskać w prosty sposób transfekując kardiomiocyty za pomocą adenowirusów. Mimo pozytywnych wyników uzyskiwanych na modelach zwierzęcych, wprowadzenie technik inżynierii genetycznej do zapobiegania uszkodzeniu mięśnia sercowego w następstwie niedokrwienia u ludzi wymaga jeszcze wielu badań i pokonania kontrowersji związanych z wykorzystaniem adenowirusów jako wektorów DNA [63].

Ekspresja CAV2 zależy od tworzenia kaweoli, które powstają tylko w obecności CAV1 lub CAV3. Niedobór jednej z tych kaweolin powoduje destrukcję CAV2 i dlatego trudno jest powiązać CAV2 z konkretnym schorzeniem. U myszy z wybiórczym wyłączeniem genu CAV2 obserwowano nadmierny rozrost komórek śródbłonna naczyń włosowatych. Dalsze badania tego zjawiska wykazały, że CAV2 reguluje proliferację komórek nabłonka w odpowiedzi na nadmierną stymulację czynnikami pro- bądź antyproliferacyjnymi [66].

Niedawno odkryto, że ekspresja kaweolin i tworzenie kaweoli zależy od obecności białek adaptorowych zwanych kawinami. Dotychczas zidentyfikowano cztery takie białka: kawinę 1 (PTRF – polymerase transcript release factor), kawinę 2 (SDRP – serum deprivation protein response), kawinę 3 (SRBC – srd-related gene product that binds to c-kinase) oraz kawinę 4 (MURC – muscle-restricted coiled-coil protein) [3]. Niedobór bądź zaburzenie syntezy kawiny 1 upośledza tworzenie kaweoli i hamuje endocytozę kaweolarną. U ludzi opisano kilka przypadków mutacji typu *null* w genie kodującym kawinę 1, które klinicznie charakteryzowały się różnorodnymi zaburzeniami obejmującymi przede wszystkim uogólnioną lipodystrofię, arytmie, miopatię związaną z pofałdowaniem włókien mięśniowych czy hipertrofię mięśni szkieletowych [53]. Ekspresja kawiny 1 i CAV1 jest ściśle ze sobą związana. Zaobserwowano, że wysokotłuszczowa dieta zaburza równowagę między tymi białkami w obrębie kaweoli nabłonka pęcherzyków płucnych, prowadząc do zaniku kaweoli i upośledzenia sygnalizacji regulującej aktywność eNOS. Uważa się, że to zjawisko może odpowiadać za rozwój chorób płuc w przebiegu miażdżycy, ponieważ u zwierząt z indukowaną hipercholesterolemią rozwijało się wtórne nadciśnienie płucne [71].

Brakuje jeszcze wiadomości o roli innych kawin w funkcjonowaniu kaweoli i ich udziału w patogenezie chorób, jakkolwiek kawina 4 jest niezbędna do prawidłowej budowy mięśni szkieletowych oraz jest wiązana z dysfunkcją serca przez modulację szlaku Rho/ROCK (rho-associated coiled-coil-forming kinase) [68].

Bardzo ważnym aspektem endocytozy kaweolarniej jest jej udział w pobieraniu przez komórki substancji odżywczych, m.in. glukozy i kwasów tłuszczowych. Związanie się insuliny z receptorem insulinowym w obrębie kaweoli adipocytów lub komórek mięśni szkieletowych uruchamia szlak sygnalizacyjny, którego skutkiem jest kierowanie przekaźnika glukozy GLUT4 z cytoplazmy w kierunku błony komórkowej. Szlak ten jest związany z autokatalityczną aktywacją receptora po związaniu insuliny i wtórną aktywacją kinaz fosforylujących wewnątrzkomórkowe substraty, przede wszystkim białka IRS (insulin receptor substrate) [41]. Autoaktywacja domeny kinazowej receptora insulinowego zależy od obecności CAV1 i CAV3. W doświadczeniach na zwierzętach z nokautem genu tych białek zaobserwowano wzrost oporności tkanek obwodowych na działanie insuliny, zwiększenie stężenia lipidów we krwi i upośledzoną tolerancję glukozy. Chociaż niedobór kaweolin nie wywoływał bezpośrednio cukrzycy u tych zwierząt, jednak dawał obraz zespołu metabolicznego, bardzo często stanowiącego wczesny etap rozwoju cukrzycy typu 2 [61].

Makropinocytoza i szlaki pokrewne

Makropinocytoza jest typem CIE uruchamianym m.in. przez czynniki wzrostu, które po związaniu z recepto-



rami błony komórkowej wzbudzają kaskadę sygnalizacyjną, prowadzącą do polimeryzacji aktyny i silnego sfalowania błony komórkowej. Tworzące się w czasie tego procesu wypustki błonowe otaczają porcję płynu zewnątrzkomórkowego formując makropinosomy, transportujące pobrany materiał do wnętrza komórki. Dotychczas opisano udział makropinocytozy i podobnych szlaków transportu w patologii cukrzycy i miażdżycy.

Jednym z istotnych klinicznie powikłań cukrzycy jest cukrzycowa choroba nerek. W patomechanizmie tej złożonej choroby uczestniczą m.in. końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGEs – advanced glycation end products), powstające wskutek nieenzymatycznej glikacji składników organicznych. AGEs są odpowiedzialne za stres oksydacyjny komórek nabłonka kanalików nerek, zwiększenie ekspresji czynników profibrotycznych i zaburzenie degradacji białek macierzy pozakomórkowej kłębuszków nerkowych. Nieenzymatycznie glikowane białka krwi są wchłaniane zwrotnie w kanalikach nerek, przynajmniej częściowo, za pośrednictwem makropinocytozy. Zjawisku temu towarzyszy zwiększona aktywność transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i zmniejszona ekspresja błonowej Na^+/K^+ -ATP-azy. Sprzyja to przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej, prowadzącej oprócz innych mechanizmów, do zwłóknienia nerek [21].

Miażdżyca, czyli zespół zmian zapalnych i proliferacyjnych ścian tętnic, jest związana z zaburzeniem gospodarki lipidowej. W patomechanizmie tej choroby uczestniczą procesy endocytozy mające wspólne elementy z makropinocytozą, lecz różniące się morfologią powstających pęcherzyków endocytarnych oraz zależnością od białek regulatorowych. Są to szlaki odpowiedzialne za internalizację lipoprotein LDL (lipoprotein o małej gęstości), transportujących głównie cholesterol. Negatywnym skutkiem zbyt dużego stężenia LDL we krwi lub ich upośledzonego metabolizmu jest modyfikacja transportowanych przez nie kwasów tłuszczowych pod wpływem czynników utleniających. Tak zmienione cząsteczki LDL (ox-LDL) są usuwane z krążenia po związaniu się z receptorami „zmiataczami” (scavenger receptors), ekspozowanymi m.in. na powierzchni monocytów, makrofagów i komórek śródbłonka. Jednym z nich jest receptor CD36, którego rola w patogenezie miażdżycy została bezsprzecznie udowodniona w badaniach z wykorzystaniem zarówno modeli zwierzęcych, jak i ludzkich linii komórkowych [31,41]. Połączenie się ox-LDL z białkiem CD36 na powierzchni makrofagów indukuje silne pofalowanie błony i internalizację utworzonych kompleksów. Mechanizm internalizacji aktywowanych ligandem receptorów CD36 jest niezależny od dynaminy, a zależny od aktyny i przypomina makropinocytozę, jest jednak regulowany w nieco odmienny sposób. Utworzenie kompleksów ox-LDL z CD36 aktywuje białka Rac i/ lub Cdc42 oraz prawdopodobnie białka Arf. Dochodzi do przebudowy szkieletu aktynowego i powstania małych pęcherzyków endocytycznych. Endocytoza ox-LDL różni

się od makropinocytozy nie tylko wielkością wytworzonych wakuoli, ale także tym, że w wychwyty nie jest zaangażowana kinaza PI3K (kinaza 3-fosfatydilinozytolu) ani pompa Na^+/H^+ . Proces wymaga natomiast aktywacji kinaz rodziny Src oraz kinazy c-Jun N-terminalnej [8]. Aktynozależna endocytoza ox-LDL wymaga również udziału IRGM, małego białka należącego do GTP-az związanych z odpornością. Ekspresja tego białka w makrofagach, stymulowana obecnością ox-LDL, jest niezbędna do prawidłowej polimeryzacji włókien aktynowych i rozpoczęcia procesu internalizacji. Wykorzystanie tej unikalnej drogi endocytozy może służyć opracowaniu selektywnych metod terapeutycznych, zapobiegających procesowi miażdżycy [73]. Podobne nadzicie wiąże się z wybiórczym hamowaniem białka IDOL (inducible degrader of the LDLR), regulującego szybkość usuwania LDL z krążenia. Cząsteczki LDL są wychwytywane z krążenia przez receptory LDLR, obecne na powierzchni komórek śródbłonka. Ich liczba jest regulowana nie tylko szybkością syntezy cholesterolu, zależną od zapotrzebowania komórki na ten sterol, ale także szybkością degradacji receptora LDLR w lizosomach. Za kierowanie receptorów LDLR na szlak degradacji odpowiadają dwa białka: IDOL i PCSK9. W odróżnieniu od PCSK9, które indukuje pobieranie receptorów w dołkach opłaszczonych klatryną, białko IDOL, przez ubikwitynizację LDLR, kieruje ten receptor do lizosomów. Jest to proces niezależny od klatryny, odrębny od endocytozy kaweolarnej, przypominający makropinocytozę. Przypuszcza się, że wybiórcze hamowanie białka IDOL może wydłużyć czas błonowej ekspresji LDLR i w ten sposób pomóc w redukcji stężenia cholesterolu we krwi, szczególnie w przypadku hipercholesterolemii wrodzonej [62].

ENDOCYTOZA BAKTERII I ICH TOKSYN

Inwazja drobnoustrojów chorobotwórczych jest związana ze specyficznym środowiskiem mikrodomen lipidowych i często do skutecznego wiązania się bakterii z komórkami docelowymi jest wymagana obecność cholesterolu oraz sfingolipidów. Ogólnie bakterie zakażają komórki wykorzystując dwa mechanizmy: „spustowy” i „zamka błyskawicznego”. Mechanizm „spustowy” polega na wydzielaniu przez patogeny białek inwazyjnych, które wbudowując się w błonę komórkową indukują w niej zmiany strukturalne, umożliwiające wniknięcie bakterii do atakowanych komórek. Proces ma charakter makropinocytozy. Podstawą drugiego z wymienionych mechanizmów jest wiązanie się bakterii z receptorami na powierzchni komórek docelowych, co skutkuje reorganizacją cytoszkieletu i zmianą krzywizny błony komórkowej. Bakterie w tym przypadku są pobierane w procesie endocytozy z udziałem klatryny [16,51].

Mechanizm „spustowy” jest charakterystyczny dla Gram-ujemnych bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Shigella*, odpowiadających za zakażenia pokarmowe. Bakterie wydzielają białka T3SS (type III secretion system) lub T4SS (type IV secretion system), które wbudowują się w błonę komórek gospodarza w obrębie tratw

lipidowych. Połączenie się bakteryjnego kompleksu T3SS z lipidami błonowymi powoduje jego aktywację i powstanie porów w błonie atakowanej komórki. Przez utworzone pory bakterie wprowadzają do komórki czynniki efektorowe, które indukują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne i reorganizację cytoszkieletu. Obserwowane wewnątrzkomórkowe zmiany obejmują m.in. polimeryzację aktyny w sposób zależny od GTP-az Rho. Masowa polimeryzacja aktyny powoduje silne sfałdowanie błony komórkowej w miejscu kontaktu z bakterią, która prowadzi do pobrania patogenu przez komórkę [67]. Białka efektorowe bakterii nie tylko umożliwiają wniknięcie patogenu do komórek gospodarza, ale także jego ucieczkę przed przedziałem lizosomalnym. Wewnątrz komórek gospodarza bakteria może pozostać w wakuoli utworzonej z błon plazmatycznych atakowanej komórki lub uwalniać się do cytoplazmy. W obu przypadkach bakterie unikają skierowania na szlak degradacji w lizosomach dzięki manipulowaniu składem błonowych fosfolipidów przez aktywację fosfatazy fosfatidyloinozytolowej [22].

Patologia zakażeń wywołanych przez przecinkowce cholery (*Vibrio cholerae*) oraz różne gatunki czerwoni bakteryjnej (*Shigella*) jest ściśle związana z działaniem toksyn wiążących się z glikosfingolipidami błonowymi. Toksyny Shiga (Stx) i cholery (Ctx) są zbudowane z podjednostek A i B, przy czym ta druga podjednostka odpowiada za wiązanie się toksyny z błoną komórek gospodarza. W przypadku Stx docelowym receptorem jest CD77 (Gb3), a toksyny przecinkowca cholery – gangliozyd GM1. Po związaniu z receptorami błonowymi, toksyny są pobierane przez komórkę w procesie endocytozy z udziałem klatryny lub w sposób niezależny od klatryny, szlakiem typu CLIC/GEEC. Jest to rodzaj CIE charakterystyczny dla białek z kotwicą glikozylofosfatydoinozytolową, które są internalizowane w kanalikowatych tworach w sposób zależny od błonowych GTP-az Rab8 i Cdc42 [14]. Pęcherzyki endocytarne z cząsteczkami toksyn umiejscawiają się w przedziale wczesnych endosomów, skąd są transportowane drogą wsteczną przez aparat Golgiego do siateczki śródplazmatycznej (ER). Tam podjednostka katalityczna toksyn (A) wiąże się z rybosomami zakłócając syntezę białek [16].

Najnowsze badania wnikania toksyny cholery do komórek wykazały, że flotyliny także biorą udział w tym procesie. Podczas internalizacji Ctx przez ludzkie hepatocyty zaobserwowano kanalikowate wgłębienia w błonie komórek. Powstanie tych wpukleń nie wymagało dynaminy, lecz było zależne od cholesterolu i kompleksu białek Arp2/3, warunkującego polimeryzację aktyny i pączkowanie fragmentów błony. Proces był regulowany również przez kinazę białkową Src, białko Rho1 i PI3K [1]. Zubożenie błon we flotyliny nie zmniejszało internalizacji toksyny cholery oraz toksyny Shiga, ponieważ w tych warunkach były pobierane innymi drogami endocytozy. Wyłączenie genu flotyliny utrudniało jednak zatrucie Ctx, ponieważ hamowało jej transport do siateczki śródplazmatycznej. Przeciwny efekt zaobserwo-

wano w przypadku Stx, wskazując że transport zależny od flotyliny może odpowiadać za kierowanie jej na szlaki zmniejszające toksyczność [45].

Lipidy błonowe są również punktem przyczepu dla toksyn roślinnych: rycyny, obecnej w nasionach *Ricinus communis* i abryny, pochodzącej z *Abrus precatorius*. Toksyny roślinne są zbudowane, podobnie jak toksyny bakteryjne, z podjednostki katalitycznej A i receptorowej B. Podjednostka B jest lektyną łączącą się z resztą galaktozy łańcuchów cukrowych glikolipidów błonowych. Taki sposób wiązania powoduje, że zinternalizowana toksyna trafia przeważnie do przedziału endosomów sortujących, skąd jest kierowana z powrotem do błony komórkowej lub do lizosomów, gdzie jest degradowana. Tylko około 5% pobranej przez komórkę rycyny dociera do aparatu Golgiego i ER [16].

Niewiele bakterii zakaża komórki w sposób zależny od kaweolin. Są to: *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Ten ostatni patogen jest często odpowiedzialny za przewlekłe zapalenie płuc u chorych na mukowiscydozę. Mukowiscydoza jest chorobą genetyczną związaną z wrodzonym defektem błonowego regulatora przewodnictwa CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). W warunkach prawidłowych infekcja *P. aeruginosa* indukuje w błonie komórek nabłonka dróg oddechowych tworzenie tratw lipidowych, zawierających m.in. CAV1 i CFTR. Za ich pośrednictwem dochodzi do internalizacji bakterii i wzbudzenia odpornościowej reakcji zapalnej, która prowadzi do usunięcia zakażonych komórek w procesie apoptozy. Ten obronny mechanizm jest zaburzony u pacjentów z mukowiscydozą, co sprzyja rozwojowi przewlekłego zapalenia w obrębie płuc. To, że CAV1 jest niezbędna do fagocytozy *P. aeruginosa* przez neutrofile tkanki płucnej, może mieć podstawowe znaczenie do opracowania strategii zapobiegającej przewlekłym zakażeniom tym patogenem u chorych na mukowiscydozę [19,35].

W świetle zwiększającej się antybiotykooporności bakterii oraz szybkiego rozprzestrzeniania się nietypowych infekcji w dużych skupiskach ludzkich istotne jest poznanie mechanizmów molekularnych warunkujących zakaźność patogenów. Przykładem bakterii, której ekspansja jest związana z aglomeracjami miejskimi jest *Chlamydia pneumoniae*, ściśle wewnątrzkomórkowy Gram-ujemny patogen, odpowiedzialny za zakażenia układu oddechowego. Badania prowadzone w ostatnich kilku latach wykazały, że *Ch. pneumoniae* wnika do komórek w sposób niezależny od klatryny, a zależny od cholesterolu i małych GTP-az: Cdc42 i RhoA. W internalizacji bakterii nie uczestniczyły białka kaweoli i domen flotylinowych, chociaż flotylin 1 warunkowała wewnątrzkomórkowy wzrost i tworzenie tzw. inkluzji, czyli obłonionego tworu zawierającego patogen – etapu istotnego dla jego namnażania. Wyniki badań mogą pomóc w opracowaniu substancji wybiórczo blokującej wewnątrzkomórkowy rozwój *Ch. pneumoniae* i ograniczeniu zakażeń tym drobnoustrojem [29,30].



ENDOCYTOZA WIRUSÓW

Namnażanie się wirusów jest ściśle związane z przedostaniem się materiału genetycznego wirusa do komórki gospodarza. Wirusy w toku ewolucji wykształciły różne mechanizmy pokonywania bariery błony komórkowej, wśród których endocytoza, zarówno zależna jak i niezależna od klatryny, odgrywają istotną rolę. Wydaje się, że typ endocytozy wykorzystywany przez wirusy do infekcji komórek gospodarza jest częściowo warunkowany budową wirusa. Endocytoza kaweolarna jest popularnym sposobem pobierania wirusów bezotoczkowych. Wirusy bezotoczkowe działają najczęściej jak cząsteczki sygnalizacyjne, które po związaniu się z glikosfingolipidami błonowymi atakowanej komórki indukują w niej szlaki prowadzące do przebudowy miozynowego szkieletu komórki i pobrania wirusa. Kaweole zawierające patogen pączkują z błony komórkowej i jako kaweosomy transportują swój ładunek do siateczki śródplazmatycznej. Wśród wirusów wykorzystujących CAV1 do ataku na docelowe komórki są m.in. mały wirus 40 (SV40), wirus polio, echowirusy oraz filowirusy (Ebola, wirus Marburg) [35]. Najlepiej scharakteryzowano endocytozę wirusa SV40, należącego do rodziny *polyomaviridae*. Związanie się wirusa z glikosfingolipidem GM1 indukuje reorganizację lipidów błonowych, które tworzą mikrodomeny odpowiedzialne za pobranie wirusa przez komórkę. Endocytoza SV40 tylko w niewielkim procencie zależy od CAV1; większość cząsteczek wirusa jest pobierana w sposób zależny tylko od lipidów. Endocytoza za pośrednictwem tratw lipidowych determinuje dalsze losy cząsteczki wirusa w komórce, który w ten sposób unika wewnątrzkomórkowej degradacji i jest kierowany przez ER do cytoplazmy [10,18].

Wirusy otoczkowe, takie jak wirus A grypy (IAV), wiążą się z kwasem sialowym na powierzchni komórek gospodarza. Najczęściej są pobierane za pośrednictwem dołków opłaszczonych klatryną, ale zidentyfikowano również mechanizm pobierania wirionów IAV przez komórkę niezależny od klatryny i dynaminy. Ten alternatywny szlak rozpoznano jako makropinocytozę. Jego aktywacja wymagała interakcji wirusa z receptorami błonowymi o aktywności kinaz tyrozynowych (RTK) komórek gospodarza, które warunkowały pobudzenie kinaz błony plazmatycznej z rodziny Src i Rac1 [11]. Mechanizm podobny do makropinocytozy jest również jednym ze szlaków internalizacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). Po połączeniu się wirusa z cząsteczką CD81 komórek wątroby dochodzi do indukcji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i powstania sfałdowań błony komórkowej. Proces nie zależy od aktywności kinazy PAK1, niezbędnej do zajścia makropinocytozy i jest swoisty tylko dla niektórych linii komórkowych wywodzących się z ludzkich hepatocytów. Należy wspomnieć, że HCV po związaniu z błonowymi receptorami hepatocytów: okcludyną i klaudyną 1, jest pobierany głównie przez szlak endocytozy z udziałem klatryny [38].

W sposób zależny od aktywacji EGFR są pobierane także ludzki wirus cytomegalii CMV oraz wirus AAV (adeno-associated virus) [7]. W procesie makropinocytozy pochłaniane są ponadto wirusy krowianki, wirusy Coxackie typu B (CVB), wirusy opryszczki zwykłej typu 1 (HSV-1) oraz ludzkie wirusy niedoboru odporności typu 1 (HIV-1). Ogólnie makropinocytoza wydaje się szlakiem pobierania wirusów wymagających do namnażania niższego niż fizjologiczne pH, gdyż zależy od aktywacji błonowego wymiennicza Na^+/H^+ [40].

Interesującym przykładem internalizacji wirusów jest pochłanianie wirusa brodawczaka ludzkiego typu 16 (HPV-16). Badania wskazują, że wirus HPV-16 jest pobierany za pomocą niezidentyfikowanego dotąd szlaku powiązanego z makropinocytozą. Szlak ten różni się od klasycznego procesu makropinocytozy wielkością pęcherzyków, wrażliwością na ubytek błonowego cholesterolu oraz zapotrzebowaniem na GTP-azy Rho. Wykazuje jednak podobieństwo względem udziału sygnalizacyjnych kinaz tyrozynowych, aktywny, pompy Na^+/H^+ , kinazy PAK1 i PKC oraz prawdopodobnie kinazy PI3K. Zapotrzebowanie na RTK i pompę Na^+/H^+ sprawia, że szlak sygnalizacyjny dla obu tych procesów jest wspólny. Pochłanianie HPV-16 nie wiąże się jednak z powstawaniem wielokrotnych sfałdowań błony ani wypustek błonowych. Indukowane wirusem pęcherzyki są małe oraz jednorodne pod względem wielkości i kształtu. Po internalizacji są kierowane do późnych endosomów, ulegając aktywacji w wyniku ekspozycji na niskie pH. Ponieważ nie wiadomo jeszcze, czy jest to nowy typ endocytozy, czy jedynie odmiana makropinocytozy, konieczna jest bardziej szczegółowa analiza transportu tych wirusów do wnętrza komórek [58].

Istotnym medycznie aspektem jest dokładne scharakteryzowanie drogi internalizacji wirusa HIV. Jednym z białek związanych z infekcją tym patogenem jest receptor chemeryny CMKLR1 (chemokine-like receptor 1). Ten metabotropowy receptor sprzężony z białkiem G ulega selektywnej ekspresji w niektórych komórkach układu odpornościowego, takich jak plazmocytoidalne komórki dendrytyczne, makrofagi oraz limfocyty T pomocnicze. Jest on koreceptorem uczestniczącym w transmisji wirusów do limfocytów. Internalizacja receptora CMKLR1 zachodzi w procesie endocytozy niezależnej od klatryny i wymaga aktywności kinaz białkowych ERK (extracellular signal-regulated kinase). Zahamowanie aktywności kinaz białkowych niezbędnych do efektywnej internalizacji tego receptora może być wykorzystane do zapobiegania rozwojowi zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS) [76].

ENDOCYTOZA PIERWOTNIĄKÓW I GRZYBÓW

Endocytoza kaweolarna jest jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez pasożyty do zasiedlenia komórek gospodarza. Przykładem choroby związanej z transportem kaweolarnym jest leiszmanioza, choroba przenoszona przez owady, wywołana przez wiciowce

z rodzaju *Leishmania*. Pasożyty ze śliną komara są wprowadzane do krwi w postaci promastygotów, które wiążą się z białkiem surowicy C3b i w ten sposób je aktywują, co następnie prowadzi do pobrania pasożyta przez makrofagowy receptor tego białka (CR3). Receptory CR3 są umiejscowione w kaweolach błony komórkowej i ulegają internalizacji wraz z CAV1. Utworzone w ten sposób pęcherzyki endocytarne transportują pasożyta do wnętrza komórki, chroniąc go przed szybką fuzją z lizosomami. W tym czasie (do 48 godzin) dochodzi do przekształcenia się promastygotów w postać inwazyjną – amastygoty, które po namnożeniu się wewnątrz makrofaga powodują jego rozpad i zakażają kolejne komórki żerne [35]. Podobny mechanizm wykorzystują tachyzoity pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. W tym przypadku punktem uchwytu patogenu jest cholesterol tratw lipidowych w błonie komórek docelowych, który jest również konieczny do internalizacji i wewnątrzkomórkowego namnażania pierwotniaka [9].

Endocytoza niezależna od klatryny wydaje się również podstawą inwazji niektórych grzybów chorobotwórczych. Najlepiej scharakteryzowano zakażenia *Paracoccidioides brasiliensis*, drożdżakiem występującym w Ameryce Południowej i w okolicach Zatoki Meksykańskiej. Do zakażenia tym grzybem dochodzi najczęściej drogą wziewną, a zajęcie nabłonka pęcherzyków płucnych jest zależne od cholesterolu i obecności gangliozydu GM1 w komórkach docelowych. Głównym składnikiem ścian komórek grzybów jest beta-glukan, który silnie wiąże się z długoołańcuchowymi resztami kwasów tłuszczowych wchodzących w skład laktozyloceramidów tratw lipidowych ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. Związanie beta-glukanu z błoną komórkową neutrofilów indukuje zmianę morfologii komórki i pochłanianie grzyba. Przypuszcza się, że patogen wykorzystując tę niezależną od klatryny drogę wnikania do komórki unikają klasycznego szlaku endosom-lizosom i szybkiej degradacji wewnątrz komórek gospodarza [39].

CIE A NOWOTWORY

Poszczególne szlaki CIE w różny sposób uczestniczą w transdukcji sygnałów i odpowiadają za właściwości morfogenetyczne komórek, m.in. ich zdolność do polaryzacji, przylegania czy migracji. Wiele z tych szlaków jest zaburzonych w komórkach nowotworowych, a obserwowane nieprawidłowości dotyczą najczęściej zaburzonej recyrkulacji białek adhezyjnych i spowolnionej degradacji receptorów czynników wzrostu. Ponadto w obrębie tratw lipidowych występuje wiele receptorów chemokin zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego i apoptozy. Niektóre onkogeny, np. białka sygnalizacyjne z rodziny Hedgehog, niereceptorowe kinazy Src i Lyn, ulegają aktywacji po związaniu się z mikrodomenami lipidowymi, co sugeruje udział tych platform sygnalizacyjnych w procesie onkogenezy. Mechanizmy wzbudzone przez onkogeny prowadzą do wadliwego działania białek regulujących procesy endocytozy i sor-

bowania materiału, nieprawidłowej przebudowy włókien aktynowych i utraty polarnośći przez komórkę [42,73]. Zjawiska endocytarne leżące u podstaw migracji i inwazji komórek nowotworowych przez bariery tkankowe są związane z tworzeniem się tzw. ognisk przylegania (focal adhesion), w których umiejscawiają się heterodimery integryny. Internalizacja integryny jest kontrolowana przez dynaminę i odbywa się za pośrednictwem dołków opłaszczonych klatryną lub kaweoli. Z przedziału wczesnych endosomów integryny mogą być sortowane do degradacji w lizosomach, zawracane do błony komórkowej przez szlak zależny od białka Rab4 lub transportowane do przedziału recyklingu okołojądrowego. Zawracanie integryn do błony komórkowej z przedziału okołojądrowego wymaga białek rodziny Rab11, które często ulegają nadmiernemu wytwarzaniu w nowotworach człowieka, co promuje transport integryn do błony komórkowej i warunkuje zdolności penetracyjne komórek rakowych [42].

Przyczyną ekspansywności nowotworu jest nieprawidłowa internalizacja i transport receptorowych kinaz tyrozynowych, które są elementem szlaku sygnalizacyjnego wzbudzanego przez czynniki wzrostu. Oprócz podstawowego mechanizmu internalizacji RTK, jaką jest endocytoza z udziałem klatryny, zidentyfikowano ostatnio szlaki niezależne od klatryny. Aktywacja tych ostatnich zależy od stężenia czynników wzrostu w przestrzeni okołokomórkowej i wpływa na wzrost i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych [36]. Jednym z nich jest endocytoza za pośrednictwem pofałdowań błony komórkowej formujących się na grzbietowej powierzchni komórek w obecności dużych stężeń czynników wzrostu (circular dorsal ruffles, CDR). Po związaniu ligandów RTK są bardzo szybko internalizowane i kierowane na szlak lizosomalnej degradacji. Taki mechanizm chroni prawdopodobnie komórkę przed nadmierną stymulacją czynnikami wzrostu. Zaobserwowano, że tworzenie CDR jest upośledzone w niektórych komórkach rakowych, co może się przyczyniać do ich niekontrolowanego wzrostu [44].

Innym typem CIE zaangażowanym w transport RTK jest makropinocytoza. Powstające podczas jej trwania duże pęcherzyki - makropinosomy zawierają aktywne białko H-Ras, zidentyfikowane jako czynnik promitotyczny zintegrowany z receptorami czynników wzrostu. Jednym z ligandów tych receptorów jest PDGF (czynnik wzrostu pochodzący z płytek), którego zwiększoną syntezę stwierdzono w glejakach, w raku wątroby oraz przerzutach raka sutka. W ludzkich fibroblastach transformowanych nowotworowo onkogenem H-Ras obserwowano niezależną od liganda aktywację receptora PDGFR i jego internalizację przez makropinocytozę. Towarzystwa temu wzmocniona fosforylacja podjednostki beta receptora, co skutkowało aktywacją kolejnych receptorowych kinaz tyrozynowych, w tym również receptorów czynnika wzrostu naskórka. Zablokowanie makropinocytozy przez hamowanie enzymu PI3K, zapobiegało nadmiernej aktywności receptora w transformowanych fibroblastach [59].



Z procesem nowotworowym jest związana również endocytoza zależna od Arf6. Jest to małe białko o aktywności GTP-azy występujące w błonie komórkowej oraz przedziale endosomalnym, odpowiadające za odkształcenie błony i przebudowę szkieletu aktynowego. Białko Arf6 zlokalizowano w inwadopodiach komórek czerniaka i raka sutka. Są to wypustki inwazyjne, w których gromadzą się enzymy odpowiedzialne za degradację błony podstawnej komórek nabłonka i macierzy pozakomórkowej. GTP-aza Arf6 nie tylko odpowiada za polimeryzację aktyny i wzrost inwadopodiów, ale również za rekrutację integryny do tych wypustek. Integryny są niezbędne do aktywacji metaloproteinaz, uczestniczących w degradacji macierzy pozakomórkowej [50]. Związek między Arf6 a inwazyjnością nowotworów potwierdziły badania, w których ujawniono zwiększoną ekspresję tego białka w raku sutka oraz jego udział w rozprzestrzenianiu się komórek glejaka w mózgu. Wykazano również, że zahamowanie ekspresji Arf6 *in vivo* skutkuje zmniejszeniem ekspansji nowotworów [60].

Związek między nowotworzeniem a endocytozą nie ogranicza się tylko do zmiany regulacji endocytozy. Białka strukturalne domen lipidowych mogą również wpływać na wzrost, podziały komórek czy hamowanie kontaktowe przez oddziaływanie z wieloma białkami regulatorowymi o aktywności kinaz białkowych. Kaweoliny bezpośrednio uczestniczą w procesie nowotworowym przez promocję lub supresję genów. CAV1, funkcjonująca jako białko supresorowe, hamuje proces powstawania komórek nowotworowych sutka, płuc oraz jajników. Wyłączenie genu CAV1 lub jego mutacja u zwierząt doświadczalnych skutkowało progresją tych nowotworów, przy czym sam brak genu CAV1 bez działania czynnika mitogennego nie powodował indukcji nowotworzenia *de novo* [61]. Przeciwnowotworowe działanie kaweoliny 1 nie jest jednoznaczne, gdyż zwiększona ekspresja tego białka występuje w gruczolaku stercza oraz raku jelita grubego, a wyłączenie genu CAV1 zmniejsza ryzyko tworzenia przerzutów w przebiegu tych nowotworów [65]. O złożoności funkcji CAV1 świadczą ponadto doniesienia o udziale tego białka w patologicznej angiogenezie, odpowiedzialnej za odżywianie komórek nowotworowych [5]. Kaweole są także punktem wychwytu dla resweratrolu. Jest to pochodna stilbenu, zaliczanego do grupy roślinnych polifenoli powszechnie uznawanych za składniki o wyjątkowo korzystnym wpływie na zdrowie i udowodnionym *in vitro* działaniu przeciwnowotworowym. Związek ten jest pobierany intensywnie przez komórki nowotworowe w sposób zależny od CAV1 i cholesterolu [74]. W pierwszym etapie, gromadzenie resweratrolu w domenach lipidowych błony komórki powoduje redystrybucję i szybką aktywację kinaz odpowiedzialnych za uruchomienie kaskady kaspaz. Resweratrol wiążąc się z zewnątrzkomórkową domeną integryny $\alpha_v\beta_3$, przyczynia się do utworzenia integrynowego kompleksu, który wzbudza wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny kinazy ERK 1/2. Wszystkie te procesy prowadzą do apoptozy komórki [12].

TERAPEUTYCZNE WYKORZYSTANIE CIE

Różnorodność systemów CIE i ich złożoność sprawiają, że stają się one atrakcyjnym obiektem badań terapii celowanej. Ten stosunkowo nowy dział medycyny ma na celu ukierunkowane dostarczenie leku do ogniska choroby, aby zwiększyć skuteczność terapii i zminimalizować działania niepożądane leku. W celu poprawy biodostępności leków stosuje się systemy lipidowe, które obejmują kompleksy lipid-lek oraz liposomy i emulsje lipidowe. Bezpośrednie sprzężenie leków ze związkami tłuszczowymi wykorzystuje się do zwiększenia pobierania leku przez komórki i ich odpowiedniego kierowania do przedziałów wewnątrzkomórkowych [55]. Ponadto skuteczne wchłanianie leków do komórek można osiągnąć przez ich sprzężenie z ligandami receptorów błony komórkowej i ich dostarczenie za pośrednictwem endocytozy kompleksów receptor-ligand. Takie systemy dostarczania leków mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie w zwalczaniu chorób nowotworowych, zakaźnych i neurodegeneracyjnych [54].

Endocytoza nanocząsteczek

Nanomedycyna jest gwałtownie rozwijającym się działem terapii celowanej, wykorzystującym nanomateriały jako wektory terapeutyczne oraz narzędzia diagnostyczne. Nanomateriały umieszczone w środowisku zewnątrzkomórkowym mogą oddziaływać z błoną komórkową, prowadząc do internalizacji cząsteczki w wyniku endocytozy. Komórki niemające zdolności do fagocytozy pobierają nanocząsteczki w sposób zależny od klatryny, w sposób zależny od kaweoli lub innymi szlakami CIE. Głównymi parametrami wpływającymi na internalizację oraz wewnątrzkomórkowy transport nanocząsteczek jest ich wielkość, kształt, hydrofobowość, elastyczność oraz rodzaj związanego liganda [4,57]. Typ użytego nośnika może również wpływać na sygnalizację komórkową w wyniku interakcji z określonymi mikrodomenami błonowymi. Aby zwiększyć pobieranie nanocząsteczek przez komórki do nośników przyłącza się tzw. peptydy penetrujące komórki (cell penetrating peptides), do których należą białko TAT i poliarginina. Białko TAT, charakterystyczne dla wirusa HIV, pochłaniane jest w wyniku makropinocytozy oraz innych mechanizmów niezależnych od klatryny i kaweoliny. Natomiast poliarginina ma zdolność łączenia się z proteoglikanami, charakterystycznymi dla mikrodomen internalizowanych w sposób zależny od flotyliny i dynaminy [48,57].

Dużą rolę w nanomedycynie odgrywa szlak endocytozy kaweolarniej, nadmiernie aktywowany w komórkach nowotworowych. Jego interesującą właściwością jest częściowa zdolność do omijania przedziału lizosomalnego i kierowania ładunku do ER lub aparatu Golgiego. Ten sposób internalizacji dotyczy m.in. preparatu Abraxane, nanocząsteczek opłaszczonych albuminą zawierających lek przeciwnowotworowy paklitaksel. Po związaniu się z powierzchniową glikoproteiną gp60, receptorem

albuminy eksponowanym w obrębie kaweoli komórek nabłonka, nanocząsteczki Abraxane są transportowane przez ścianę naczyń krwionośnych do przestrzeni śródmiąższowej. Stąd są wychwytywane przez SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) – białko selektywnie wydzielane przez komórki nowotworowe. Utworzone kompleksy SPARC-Abraxane są następnie pobierane przez nowotwór, miejscowo działając cytotoksycznie [15]. Inaczej przebiega w komórkach nowotworowych endocytoza kaweolarna polimerowych miceli z usieciowanym rdzeniem anionowym. Micele przenoszące lek cytostaticzny, np. doksorubicynę, wnikają wybiórczo do transformowanych komórek, omijając przyległe prawidłowe komórki, prawie pozabawione tej drogi endocytozy. Następnie micele, z pominięciem przedziału wczesnych endosomów, są transportowane do lizosomów, w których - w wyniku zmiany pH - jest uwalniana substancja czynna [57].

Nanocząsteczki, szczególnie te o wymiarach przekraczających 200 nm i kształcie sześciątów, są pobierane przez komórkę szlakiem makropinocytozy. W ten sposób są internalizowane np. polielektrolitowe wielowarstwowe kapsułki (PEM). Pierwszym etapem tego procesu jest elektrostatische wiązanie się nanokapsułek z powierzchnią komórek w obrębie tratw lipidowych, które indukuje fałdowanie się błony komórkowej wokół nanocząsteczki. Utworzony pęcherzyk jest następnie pochłaniany i kierowany do lizosomów, czemu towarzyszy zakwaszenie jego wnętrza pod wpływem błonowej pompy H^+ [27].

W przypadku nanocząsteczek transportujących oligonukleotydy czy fragmenty DNA istotne jest, żeby takie nośniki omijając drogę degradacji w lizosomach, mogły dostarczyć swój ładunek w pobliżu jądra komórkowego. W tym celu próbuje się wykorzystywać syntetyczne fragmenty białek wirusów lub same wirusy, które rozwinęły wiele strategii uniknięcia degradacji w komórkach gospodarza [4]. Wirusy mozaikowości fasolnika chińskiego (CPMV) planuje się wykorzystać jako platformy w celowanej terapii oraz metodach diagnostycznych. Wirus CPMV w badaniach *in vivo* okazał się użyteczny w przyżyciowym obrazowaniu naczyń, kierowaniu substancji leczniczej do nowotworów, obszarów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym oraz blaszki miażdżycowej. Dzięki badaniom z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów endocytozy, jak również określeniu współwystępowania z charakterystycznymi białkami regulującymi różne szlaki endocytozy, wykazano że wirus CPMV pochłaniany jest za pomocą endocytozy kaweolarniej oraz makropinocytozy. Zaobserwowano, że wirus CPMV wiążąc się z białkiem cytoszkieletu – wimentyną – wnika do komórek, gdzie w następnym etapie kierowany jest do późnych endosomów i aparatu Golgiego [49]. Lepsze poznanie mechanizmów wchłaniania nanocząsteczek i wirusów może dostarczyć wskazówek dotyczących najefektywniejszych szlaków internalizacji, zapewniających optymalny transport oraz subkomórkowe umiejscowienie substancji leczniczych [15].

TRANSPORT LEKÓW PRZEZ BARIERĘ KREW-MÓZG

Ze względu na specyficzną budowę i wyjątkowo ograniczoną przepuszczalność bariery krew-mózg (BBB), dostarczanie leków do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) stwarza wiele problemów. Najwięcej możliwości wykorzystania, jako sposobu transportu leków do mózgu, oferuje transcytoza za pośrednictwem receptorów (receptor-mediated transcytosis, RMT). W celu wykorzystania endogennych systemów RMT lek lub jego nośnik muszą być sprzężone z cząsteczką, która może kierować utworzony kompleks na drogę endocytozy zależnej od receptorów. Takim wektorem może być albo naturalny ligand lub jego syntetyczny odpowiednik, np. przeciwciało lub peptyd. Wśród receptorów BBB najczęściej wykorzystywanych w testowaniu takich strategii są receptory albuminy, receptor insuliny i białka rodziny receptorów LDL [26].

Głównym obiektem badań w obszarze RMT jest glikoproteina błonowa gp60 (albonydyna), umiejscowiona w kaweolach śródbłonna i odpowiedzialna za przenoszenie albuminy. Związanie się albuminy z tym receptorem indukuje jego interakcję z CAV1, w wyniku czego dochodzi do Src-zależnej fosforylacji CAV1 niezbędnej do procesu transcytozy [69]. Wynikiem obecnie prowadzonych badań nad lekami o utrudnionej przenikalności przez śródbłonek naczyń krwionośnych jest model kompleksu leku z peptydem o dużym powinowactwie do albuminy. Taki kompleks w krążeniu może być wiązany przez albuminę, a następnie transportowany przez komórki śródbłonna za pośrednictwem RMT z udziałem gp60 [17,37]. Wadą kaweolozależnym systemów dostarczania leków przez BBB jest to, że ulegają ujemnej regulacji przy dłuższym stymulowaniu ligandem. W tym kontekście niedawno odkryta i scharakteryzowana endocytoza za pośrednictwem białka adhezyjnego ICAM-1, niezależna od klatryny i CAV1, wydaje się drogą do sukcesu. ICAM-1 jest cząsteczką ulegającą ekspresji na komórkach śródbłonna i komórkach odpornościowych, regulowaną dodatkowo przez czynniki prozapalne i promitotyczne. Udowodniono, że polistyrenowe nanocząsteczki opłaszczane przeciwciałami anti-ICAM-1 łącząc się swoiście z białkiem adhezyjnym na powierzchni komórek śródbłonna bariery krew-mózg indukowały proces transcytozy nanocząsteczek przez cytoplazmę. Uwolnione po stronie błony podstawnej komórek śródbłonna nanocząsteczki były następnie pobierane przez astrocyty i perycyty, tworzące łożę podśródbłonkowe. Proces był na tyle wydajny, że może być modelem dostarczania terapeutyków do OUN [25,43].

Dostarczanie leków na poziomie subkomórkowym

Wiele leków przeciwnowotworowych wymaga dostarczenia do określonej struktury w obrębie komórek. Ze względu na to, że podstawowym składnikiem błon biologicznych są lipidy i że związki lipofilne łatwo przenikają do wnętrza komórek, próbuje się wykorzystać różne systemy lipidowe do ukierunkowanego dostarczania



leków na poziomie subkomórkowym. Egzogenne lipidy są internalizowane w obrębie tratw lipidowych i sortowane do różnych przedziałów komórki w sposób zależny od ich budowy. Krótkołańcuchowe sfingomieliny są preferencyjnie sortowane do endosomów cyrkulujących, a długołańcuchowe sfingomieliny są przemieszczane do późnych przedziałów endosomalnych. W celu osiągnięcia pewnych przedziałów wewnątrzkomórkowych wystarczy zatem połączyć leki z poszczególnymi lipidami, które będą tam kierowane [55].

Leki przeciwnowotworowe próbuje się kierować do przedziału endosomalnego przez sprzężanie ich z ligandami internalizowanymi szlakiem endocytozy kierowanej receptorami. W tym celu stosuje się najczęściej transferynę oraz kwas foliowy. Związki te wykazują duże powinowactwo do swoistych receptorów, które bardzo często ulegają nadekspresji w nowotworach złośliwych. Wykorzystuje się to również do diagnostyki obrazowej w chorobie nowotworowej [54]. Receptor transferyny jest klasycznym receptorem internalizowanym drogą endocytozy z udziałem klatryny, natomiast receptor kwasu foliowego jest białkiem tratw lipidowych, zakotwiczonym za pomocą glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Internalizacja receptora folianowego odbywa się w kanalikowatych tworach pączkujących z błony komórkowej, zwanych nośnikami niezależnymi od klatryny (CLIC). We wnętrzu komórki CLIC ulegają sortowaniu do przedziału wczesnych endosomów, tworząc kompartment bogaty w białka GPI (GEEC). Koniugaty kwasu foliowego i leków przeciwnowotworowych przechodzą obecnie II fazę badań klinicznych. Wyniki badań wskazują na zwiększenie skuteczności leczenia i zminimalizowanie działań toksycznych leków stosowanych w terapii raka sutka i płuc [75].

Przykłady leków ukierunkowanych subkomórkowo z wykorzystaniem różnych szlaków endocytozy przedstawiono w tabeli 1.

NOWE WYZWANIA

Komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptorów transferyny (TFR). Ten fenomen jest związany ze zwiększonym zapotrzebowaniem nowotworu na żelazo, niezbędne do wzrostu i proliferacji komórek. Ponieważ niedobór żelaza może działać hamująco na wzrost nowotworu, podjęto próby stworzenia niskocząsteczkowych inhibitorów jego pobierania przez komórki. Zaskoczeniem było odkrycie, że jeden z takich inhibitorów – ferrystatyna – hamuje transport żelaza do komórek przez kierowanie TFR na szlak degradacji lizosomalnej i proteosomalnej. Internalizacja TFR w tym przypadku przebiegała w sposób odrębny od klasycznej endocytozy angażującej klatrynę i wymagała udziału tratw lipidowych i cholesterolu [23]. Podobny mechanizm działania przeciwnowotworowego wykazuje dihydroartemizyna (DHA), popularny lek przeciwmalaryczny badany pod kątem zastosowania w leczeniu nowotworów. DHA indukuje palmitoilację TFR, wskutek czego dochodzi do internalizacji receptorów w wyniku endocytozy kaweolarniej. Obniżenie poziomu TFR na powierzchni komórek powoduje zahamowanie transportu żelaza do komórek i działanie cytotoksyczne [2]. Niespodziewany mechanizm działania inhibitorów wchłaniania żelaza w komórkach nowotworowych oraz odkrycie niezwyklej drogi internalizacji TFR wzbudzonej przez te inhibitory rzuca nowe światło na projektowanie strategii przeciwnowotworowych, a zarazem obrazuje, jak odmiennie w różnych warunkach mogą być pobierane te same cząsteczki przez komórki.

Tabela 1. Przykłady leków ukierunkowanych subkomórkowo z wykorzystaniem CIE (wg [51,52])

Lek	Typ CIE	Docelowy przedział komórkowy	Sposób działania	Zastosowanie
Inhibitor β -sekretazy	Endocytoza kaweolarna	Wczesne endosomy	Skojarzenie leku z cholesterolem ułatwia jego wiązanie z błoną i warunkuje internalizację drogą endocytozy	Choroba Alzheimera
Leki przeciwnowotworowe	Endocytoza CLIC/GEEC	Wczesne endosomy	Koniugaty lek- ligand są transportowane do komórki w sposób zależny od błonowych receptorów	Zwiększenie skuteczności leczenia przeciwnowotworowego
Fragmety antygenów	Endocytoza CLIC/GEEC	ER i aparat Golgiego	Dostarczenie peptydowych fragmentów antygenów przez skoniugowanie z Stx-B, celem ich prezentacji z udziałem MHC-I	Leczenie chłoniaków złośliwych i raka jajnika
Barwniki fluorescencyjne	Endocytoza CLIC/GEEC	ER i aparat Golgiego	Obrazowanie tkanek nowotworowych przez połączenie związków fluorescencyjnych z Stx-B, związanej wybiórczo przez receptor GB3 nadprodukowany w komórkach nowotworowych	Diagnostyka raka jelita grubego i jajnika, wykrywanie przerzutów do wątroby
Cisplatyna i doksorubicyna	Makropinocytoza lub endocytoza kaweolarna	Jądro komórkowe	Koniugacja leku z wirusowymi wektorami zapewnia ich kierowanie do jądra komórki	Leczenie nowotworów

ER – siateczka śródplazmatyczna; MHC –I – główny kompleks zgodności tkankowej typu I; Stx-B – podjednostka B toksyny Shiga

PODSUMOWANIE

Podsumowując, endocytoza niezależna od klatryny, oprócz swojej roli we wchłanianiu substancji odżywczych i płynów, wpływa na wiele procesów, takich jak polaryzacja komórek czy modulacja sygnałów. Systemy endocytozy CIE są również wykorzystywane przez różne patogeny do osiągnięcia celu ataku – komórek gospodarza. Ze względu na złożoność mechanizmów transportu, właściwe powiązanie konkretnego schorzenia z defektem danej składowej swoistego szlaku endocytozy jest bardzo trudne. Niemniej podejmuje się badania pozwalające zidentyfikować rolę endocytozy CIE w chorobach metabolicznych, dystrofiach mięśniowych, nowotworach i miażdżycy. Najbardziej są zaawansowane badania udziału CIE w patomechanizmie nowotworów i chorób związanych z hipercholesterolemią. Zdobyta wiedza pozwoli nie tylko na zrozumienie procesów patologicznych związanych z zaburzeniami endocytozy, ale również umożliwi nowe działania terapeutyczne.

Największe nadzieje wiąże się z wykorzystaniem nietypowej regulacji szlaków CIE w komórkach nowotworowych. To zjawisko próbuje się zastosować do szybkiego wykrywania komórek złośliwych metodami obrazowania oraz do pokonania oporności nowotworu na działanie chemioterapeutyków. Poznanie mechanizmów endocytozy ma także zasadnicze znaczenie w kontrolowaniu farmakokinetyki i toksyczności nanocząsteczek. Z badań *in vitro* wynika, że wybór szlaku pobierania nanocząsteczki w dużym stopniu zależy od jej rozmiarów, kształtu, a także ładunku powierzchniowego. Swoiste ligandy opłaszczone na nanonośnikach, ukierunkowane na konkretny typ komórki, mogą być internalizowane w sposób odmienny od samych ligandów. Zważywszy na mnogość dróg wykorzystywanych do internalizacji nanocząsteczek, idea stworzenia uniwersalnego systemu dostarczania, odpowiedniego dla różnych ładunków, jest coraz mniej realna. Szerszy wgląd w mechanizmy leżące u podstaw endocytozy może ujawnić nowe cele dla projektowanych leków, a selektywne wykorzystanie CIE pozwoli na manipulowanie komórkowymi szlakami endocytarnymi w celu łagodzenia objawów konkretnych chorób.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ait-Slimane T., Galmes R., Trugnan G., Maurice M.: Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Mol. Biol. Cell.*, 2009; 20: 3792-3800
- [2] Ba Q., Zhou N., Duan J., Chen T., Hao M., Yang X., Li J., Yin J., Chu R., Wang H.: Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1. *PLoS One*, 2012; 7: e42703
- [3] Briand N., Dugail I., Le Lay S.: Cavin proteins: new players in the caveolae field. *Biochimie*, 2011; 93: 71-77
- [4] Canton I., Battaglia G.: Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41: 2718-2739
- [5] Chang S.H., Feng D., Nagy J.A., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Vascular permeability and pathological angiogenesis in caveolin-1-null mice. *Am. J. Pathol.*, 2009; 175: 1768-1776
- [6] Chaudhary N., Gomez G.A., Howes M.T., Lo H.P., McMahon K.A., Rae J.A., Schieber N.L., Hill M.M., Gaus C., Yap A.S., Parton R.G.: Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. *PLoS Biol.*, 2014; 12: e1001832
- [7] Chi P.I., Liu H.J.: Molecular signaling and cellular pathways for virus entry. *ISRN Virology*, 2013, 2013; ID 306595
- [8] Collins R.F., Touret N., Kuwata H., Tandon N.N., Grinstein S., Trimble W.S.: Uptake of oxidized low density lipoprotein by CD36 occurs by an actin-dependent pathway distinct from macropinocytosis. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 30288-30297
- [9] Coppens I., Sinai A.P., Joiner K.A.: *Toxoplasma gondii* exploits host low density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J. Cell Biol.*, 2000; 149: 167-180
- [10] Damm E-M., Pelkmans L., Kartenbeck J., Mezzacasa A., Kurzchalia T., Helenius A.: Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.*, 2005; 168: 477-488
- [11] de Vries E., Tscherner D.M., Wienholts M.J., Cobos-Jiménez V., Scholte F., García-Sastre A., Rottier P.J., de Haan C.A.: Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1001329
- [12] Delmas D., Aires V., Colin D.J., Limagne E., Scagliarini A., Cotte A.K., Ghiringhelli F.: Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2013; 1290: 90-97
- [13] DeWever J., Frerart F., Bouzin C., Baudelet C., Ansiaux R., Sonveaux P., Gallez B., Dessy C., Feron O.: Caveolin-1 is critical for the maturation of tumour blood vessels through the regulation of both endothelial tube formation and mural cell recruitment. *Am. J. Pathol.*, 2007; 171: 1619-1628
- [14] Doherty G.J., McMahon H.T.: Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009; 78: 857-902
- [15] Duncan R., Richardson S.C.: Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Mol. Pharm.*, 2012; 9: 2380-2402
- [16] Eierhoff T., Stechmann B., Römer W.: Pathogen and toxin entry - how pathogens and toxins induce and harness endocytotic mechanisms. W: *Molecular regulation of endocytosis*, Wyd. Brian Ceresa, 2012, 251-276
- [17] Elsadek B., Kratz F.: Impact of albumin of drug delivery - New applications on the horizon. *J. Control. Release*, 2012; 157: 4-28
- [18] Ewers H., Römer W., Smith A.E., Bacia K., Dmitrieff S., Chai W., Mancini R., Kartenbeck J., Chambon V., Berland L., Oppenheim A., Schwarzmann G., Feizi T., Schwille P., Sens P., Helenius A., Johannes L.: GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat. Cell Biol.*, 2010; 12: 11-18; sup 1-12
- [19] Gadjeva M., Paradis-Bleau C., Priebe G.P., Fichorova R., Pier G.B.: Caveolin-1 modifies the immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.*, 2010; 184: 296-302
- [20] Galbati F., Volonte D., Chu J.B., Li M., Fine S.W., Fu M., Bermudez J., Pedemonte M., Weidenheim K.M., Pestell R.G., Minetti C., Lisanti M.P.: Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibres induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 9689-9694



- [21] Gallicchio M.A., Bach L.A.: Uptake of advanced glycation end products by proximal tubule epithelial cells via macropinocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 2922-2932
- [22] Ham H., Sreelatha A., Orth K.: Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011; 9: 635-646
- [23] Horonchik L., Wessling-Resnick M.: The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/NSC306711 promotes degradation of the transferrin receptor. *Chem. Biol.*, 2008; 15: 647-653
- [24] Howes M.T., Mayor S., Parton R.G.: Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 519-527
- [25] Hsu J., Rappaport J., Muro S.: Specific binding, uptake, and transport of ICAM-1-targeted nanocarriers across endothelial and subendothelial cell components of the blood-brain barrier. *Pharm. Res.*, 2014; 31: 1855-1866
- [26] Jones A.R., Shusta E.V.: Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor mediation. *Pharm. Res.*, 2007; 24: 1759-1771
- [27] Kastl L., Sasse D., Wulf V., Hartmann R., Mircheski J., Ranke C., Carregal-Romero S., Martínez-López J.A., Fernández-Chacón R., Parak W.J., Elsasser H.P., Rivera Gil P.: Multiple internalization pathways of polyelectrolyte multilayer capsules into mammalian cells. *ACS Nano*, 2013; 7: 6605-6618
- [28] Konopska B., Gołąb K., Gburek J.: Endocytoza niezależna od klatryny – co wiemy, co przypuszczamy, co pozostaje zagadką. *Postępy Biol. Kom.*, 2014; 41: 265-284
- [29] Korhonen J.T., Puolakkainen M., Häivälä R., Penttilä T., Haveri A., Markkula E., Lahesmaa R.: Flotillin-1 (Reggie-2) contributes to *Chlamydia pneumoniae* growth and is associated with bacterial inclusion. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 1072-1078
- [30] Korhonen J.T., Puolakkainen M., Haveri A., Tammirousu A., Sarvas M., Lahesmaa R.: *Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *Microb. Pathog.*, 2012; 52: 157-164
- [31] Kuliczowska-Pląksej J., Bednarek-Tupikowska G., Pląksej R., Filus A.: Receptor CD36 – występowanie, regulacja ekspresji oraz rola w patogenezie miażdżycy. Część I. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 142-151
- [32] Kumari S., Mg S., Mayor S.: Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.*, 2010; 20: 256-275
- [33] Laurenzana A., Fibbi G., Chilla A., Margheri G., Del Rosso T., Roviada E., Del Rosso M., Margheri F.: Lipid rafts: integrated platforms for vascular organization offering therapeutic opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015; 72: 1537-1557
- [34] Lin, M.I., Yu J., Murata T., Sessa W.C.: Caveolin-1-deficient mice have increased tumor microvascular permeability, angiogenesis, and growth. *Cancer Res.*, 2007; 67: 2849-2856
- [35] Machado F.S., Rodriguez N.E., Adesse D., Garzoni L.R., Esper L., Lisanti M.P., Burk R.D., Albanese C., Van Doorslaer K., Weiss L.M., Nagajoyyhi F., Nosanchuk J.D., Wilson M.E., Tanowitz H.B.: Recent developments in the interactions between caveolin and pathogens. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012; 729: 65-82
- [36] Maldonado-Báez L., Williamson C., Donaldson J.G.: Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp. Cell Res.*, 2013; 319: 2759-2769
- [37] Malik A.B.: Targeting endothelial cell surface receptors: novel mechanisms of microvascular endothelial barrier transport. *J. Med. Sci.*, 2009; 2: 13-17
- [38] Matsuda M., Suzuki R., Kataoka C., Watashi K., Aizaki H., Kato N., Matsuura Y., Suzuki T., Wakita T.: Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.*, 2014; 95: 2658-2667
- [39] Maza P.K., Straus A.H., Toledo M.S., Takahashi H.K., Suzuki E.: Interaction of epithelial cell membrane rafts with Paracoccidioides brasiliensis leads to fungal adhesion and Src-family kinase activation. *Microbes Infect.*, 2008; 10: 540-547
- [40] Mercer J., Helenius A.: Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 510-520
- [41] Michel V., Bakovic M.: Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell*, 2007; 99: 129-140
- [42] Mosesson Y., Mills G.B., Yarden Y.: Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 835-850
- [43] Muro S., Wiewrodt R., Thomas A., Koniaris L., Albelda S.M., Muzykantov V.R., Koval M.: A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 1599-1609
- [44] Orth J.D., McNiven M.A.: Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11094-11096
- [45] Otto G.P., Nichols B.J.: The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 3933-3940
- [46] Parton R.G., del Pozo M.A.: Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013; 14: 98-112
- [47] Patel H.H., Murray F., Insel P.A.: Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2008; 48: 359-391
- [48] Payne C.K., Jones S.A., Chen C., Zhuang X.: Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic*, 2007; 8: 389-401
- [49] Plummer E.M., Manchester M.: Endocytic uptake pathways utilized by CPMV nanoparticles. *Mol. Pharm.*, 2013; 10: 26-32
- [50] Premont R.T., Schmalzigaug R.: Metastasis: wherefore art thou? *Curr. Biol.*, 2009; 19: R1036-R1038
- [51] Radin N.S.: Preventing the binding of pathogens to the host by controlling sphingolipid metabolism. *Microbes Infect.*, 2006; 8: 938-945
- [52] Rahman A., Sward K.: The role of caveolin-1 in cardiovascular regulation. *Acta Physiol.*, 2009; 195: 231-245
- [53] Rajab A., Straub V., McCann L.J., Seelow D., Varon R., Barresi R., Schulze A., Lucke B., Lutzkendorf S., Karbasiyan M., Bachmann S., Spuler S., Schuelke M.: Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS Genet.*, 2010; 6: e1000874
- [54] Rajendran L., Knölker H.J., Simons K.: Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010; 9: 29-42
- [55] Rajendran L., Udayar V., Goodger Z.V.: Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2012; 33: 215-222
- [56] Roth D.M., Patel H.H.: Role of caveolae in cardiac protection. *Pediatr. Cardiol.*, 2011; 32: 329-333
- [57] Sahay G., Alakhova D., Kabanov A.V.: Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release*, 2010; 145: 182-195
- [58] Schelhaas M., Shah B., Holzer M., Blattmann P., Kühling L., Day P.M., Schiller J.T., Helenius A.: Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002657
- [59] Schmees C., Villasenor R., Zheng W., Ma H., Zerial M., Heldin C.H., Hellberg C.: Macropinocytosis of the PDGF β -receptor promotes fibroblast transformation by H-RasG12V. *Mol. Biol. Cell*, 2012; 23: 2571-2582
- [60] Schweitzer J.K., Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C.: ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2011; 22: 39-47

- [61] Schwencke C., Braun-Dullaeus R.C., Wunderlich C., Strasser R.H.: Caveolae and caveolin in transmembrane signaling - implications for human disease. *Cardiovasc. Res.*, 2006; 70: 42-49
- [62] Scotti E., Calamai M., Goulbourne C.N., Zhang L., Hong C., Lin R.R., Choi J., Pilch P.F., Fong L.G., Zou P., Ting A.Y., Pavone F.S., Young S.G., Tontonoz P.: IDOL stimulates clathrin-independent endocytosis and multivesicular body-mediated lysosomal degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 2013; 33: 1503-1514
- [63] Sellers S.L., Trane A.E., Bernatchez P.N.: Caveolin as a potential drug target for cardiovascular protection. *Front. Physiol.*, 2012; 3: 280
- [64] Simons K., Sampaio J.L.: Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011; 3: a004697
- [65] Sotgia F., Martinez-Outschoorn U.E., Howell A., Pestell R.G., Pavlides S., Lisanti M.P.: Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu. Rev. Pathol.*, 2012; 7: 423-467
- [66] Sowa G.: Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front. Physiol.*, 2012; 2: 120
- [67] Srikanth C.V., Mercado-Lubo R., Hallstrom K., McCormick B.A.: Salmonella effector proteins and host-cell responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, 68: 3687-3697
- [68] Tagawa M., Ueyama T., Ogata T., Takehara N., Nakajima N., Isodono K., Asada S., Takahashi T., Matsubara H., Oh H.: MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2008; 295: C490-C498
- [69] Tiruppathi C., Song W., Bergensfeldt M., Sass P., Malik A.B.: Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 25968-25975
- [70] Tsutsumi Y.M., Horikawa Y.T., Jennings M.M., Kidd M.W., Nieman I.R., Yokoyama U., Head B.P., Hagiwara Y., Miyanojima A., Patel P.M., Insel P.A., Patel H.H., Roth D.M.: Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 induces endogenous cardiac protection by mimicking ischemic preconditioning. *Circulation*, 2008; 118: 1979-1988
- [71] Williams J.J., Palmer T.M.: Cavin-1: caveolae-dependent signaling and cardiovascular disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 2014; 42: 284-288
- [72] Wojewódzka U., Gajkowska B., Jurkiewicz J., Gniadecki R.: Mikrodomeny (rafty) lipidowe w błonach komórkowych: struktura, fizjologia i znaczenie w procesach patologicznych. *Postępy Biol. Kom.*, 2005, 32, 293-309
- [73] Xia F., Li R., Wang C., Yang S., Tian L., Dong H., Pei C., He S., Jiang P., Cheng H., Fang S., Li H., Xu H.: IRGM1 regulates oxidized LDL uptake by macrophage via actin-dependent receptor internalization during atherosclerosis. *Sci. Rep.*, 2013; 3: 1867
- [74] Yang H.L., Chen W.Q., Cao X., Worschech A., Du L.F., Fang W.Y., Xu Y.Y., Stroncek D.F., Li X., Wang E., Marincola F.M.: Caveolin-1 enhances resveratrol-mediated cytotoxicity and transport in a hepatocellular carcinoma model. *J. Transl. Med.*, 2009; 7: 22
- [75] Yoon D.J., Liu C.T., Quinlan D.S., Nafisi P.M., Kamei D.T.: Intracellular trafficking considerations in the development of natural ligand-drug molecular conjugates for cancer. *Ann. Biomed. Eng.*, 2011; 39: 1235-1251
- [76] Zhou J.X., Liao D., Zhang S., Cheng N., He H.Q., Ye R.D.: Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2014; 35: 653-663

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

