

Caveolák, caveolin izoformák és a caveola-mediált endocitózis

Doktori Értekezés
Tézisek

Készítette: L. Kiss Anna
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet
Budapest
2016

IRODALMI ELŐZMÉNYEK

A caveolák morfológiai sajátosságai

A *caveolák* 50-100 nm átmérőjű, palack illetve omega alakú, plazmamembrán befűződés, amelyeket elsőként Palade (1953) írt le endotél sejteken. Ezen „kis üregek, üregecskék, amelyek az extracelluláris mátrixszal kommunikálnak” 1955-ben Yamada-tól kapták a „caveola” nevet. Kutatásuk a 90-es években új lendületet kapott, akkor, amikor kiderült, hogy a clathrin burkos vezikulák kialakulásának blokkolása nem állítja le az endocitotikus folyamatokat, és a caveolák mint alternatív endocitotikus compartimentumok kerültek az érdeklődés középpontjába. A morfológiai megjelenésük alapján feltételezhető, hogy a caveolák dinamikus struktúrák. Hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken különböző mélységű befűzések formájában figyelhetők meg. Egyesével vagy csoportosan, szőlőfürt-, ill. gyöngysorszerűen „lógna” bele az intracelluláris térbe. Számos sejtben előfordulnak, hosszú ideig vitatott volt, hogy az immunsejtek felszínén is jelen vannak-e caveolák. A legújabb kísérleti adatok azt mutatják, hogy valamennyi immunsejt felszínén megfigyelhetők, megjelenésük és eloszlásuk azonban a sejtek aktivitásának/differenciálódásának függvénye.

Hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken a caveolák citoplazma felőli oldalán nem látható a clathrin burkos vezikulákra jellemző burok. Nagy felbontású scanning elektronmikroszkóppal, illetve fagyasztva-tört és mély maratásos technika alkalmazásával azonban bebizonyosodott, hogy a caveolák citoplazmatikus felszínén jellegzetes, felcsavarodott, spirális szerkezetű burok mutatható ki.

A caveolák biokémiai jellemzése

A caveolák burkának legjellegzetesebb komponense egy ~21-24 kDa molekulatömegű integráns membránfehérje, amelyet **caveolinnak** ill. *vesicula integráns fehérjének (VIP21)* neveztek el.

A caveolin többféle változatban, a caveolin gén család termékeként fordul elő. Klónozással 3 különböző caveolin gént azonosítottak, amelyek három

izoformát, caveolin-1, caveolin-2, és caveolin-3 kódolnak. A caveolin-1 és caveolin-2 izoformáknak α és β altípusa ismert. Az izoformák molekulatömege (18 - 24 kDa), aminosavsorrendje hasonló. Az egyes izoformák előfordulása jellegzetesen szövet-specifikus.

A caveolin-1 izoforma jelenléte elengedhetetlenül szükséges a caveolák kialakulásához, a caveolin-1 expressziója eredményezi a jellegzetes burok kialakulását is. A caveolák kialakulásához a caveolin-1 mellett a caveolin-2-nek is jelen kell lennie. A caveolin-2 a burok kialakításában azonban csak mint „járulékos” fehérje funkcionál, önmagában nem elegendő a sejtfelszíni caveolák létrehozásához.

A plazmamembrán caveoláinak stabilizálásában, a membrán jellegzetes görbületének kialakításában, a klasszikus palack alak létrehozásában a caveolin mellett egy másik, újonnan leírt, *cavin*-nak vagy PTRF (polimeráz I release factor)-cavinnak nevezett fehérje is fontos szerepet játszik. Míg a caveolin hetero-oligimerek a caveolák burkának belső rétegét alkotják, a cavinok egy külső nagyméretű heterooligomer complexből álló fehérje réteget képeznek a caveolák citoszól felőli oldalán. A cavin a caveolin-1 által oligomerizált foszfatidil-szerin és koleszterin segítségével épül be a caveolák burkába, és így elősegíti a caveolák görbületének kialakulását. Cavin hiányában a jellegzetes caveola struktúra nem alakul ki.

A caveolák állandó komponense a koleszterin, amely fontos szerepet játszik a caveolák integritásának fenntartásában. A koleszterin erősen kötődik a caveolin-1-hez, azaz stabilizálja a caveolin-1 oligomereket. A koleszterin és a caveolin-1 együttműködik a burok kialakításában. A koleszterin mellett számos más lipid (szfingolipidek, glikozilszfingolipidek, szfingomielin, glikolipidek, glikofosfolipidek) akkumulálódik a caveolák membránjában. A caveolák magas koleszterin és szfingolipid tartalmuk következtében merev, rigid membránterületek, erősen hidrofób membrán doménekhez, az ún. *lipid raftok*hoz sorolhatók. Ezen lipid raftok nagy rendezettségű, de kis fluiditású membránterületek, amelyek külön fázist alkotnak a membránban, mint a vízen úszó tutajok vagy jégtáblák.

Az elmúlt 20 év alatt számos biológiailag fontos molekulát (lipideket, módosított fehérjéket, membrán receptorokat, jelátviteli molekulákat, transzportereket stb) azonosítottak a caveolákban. A caveolin N-terminális szakaszán jelen van egy ún. *scaffolding domén*, amely a caveolinhoz kötődő

molekulák közös, *caveolin-kötő* (caveolin-binding) szekvenciáját ismeri fel. Ez a caveolin-kötő szekvencia a legtöbb caveolinhoz kötődő emzim fehérje katalitikus centrumához közeli régióban található, a caveolinhoz való kötődés tehát allosztérikusan gátolhatja az adott fehérje aktivitását. A caveolin-scaffolding domén kölcsönhatása a caveolin-kötő doménnel a receptor-ligand kölcsönhatáshoz hasonlóan működhet.

A caveolák tehát különleges összetételű, erősen hidrofób, caveolin tartalmú, detergentekben oldhatatlan plazmamembrán domének, amelyeknek lipid- és fehérje-összetétele jelentősen eltér a környező membrán összetételétől. A caveolákban kimutatható fehérjék a caveolinhoz való specifikus kölcsönhatás, kötődés eredményeként akkumulálódnak a caveolákban.

A caveolák funkciója

Jelen ismereteink szerint a caveolák meglehetősen heterogén, sejtenként változó feladatot láthatnak el. A sejtek életfolyamataiban alapvetően kétféle szerepet töltenek be: i) a hozzájuk időszakosan kapcsolódó molekulák aktivitásának befolyásolása révén, jelátviteli központként szabályozzák (szabályozhatják) a sejtek differenciálódását, osztódását; ii) a clathrin-burkos vezikulák mellett részt vesznek a sejtek különböző transzportfolyamatainak lebonyolításában.

a.) A caveolák szerepe a transzportfolyamatokban

α.) Transzcitózis: A kapilláris endotél-sejtek nagy hatékonysággal vesznek fel anyagokat a lumenből, amelyek azután meglehetősen gyorsan megjelennek a perikapilláris térségben. Ebben a folyamatban, a transzcitózisban, az endotél sejtek sejthártyáján igen nagy számban jelenlévő caveolák vesznek részt. (Az endotél sejtek caveoláit funkciójuk alapján transzcitotikus vezikuláknak nevezték el.)

β.) Endocitózis: A caveoláknak a sejtek felvételi folyamataiban betöltött szerepét sokan és sokáig vitatták. Egyre több adat szól amellett, hogy szerepet játszhatnak mind a folyadék fázisos, mind pedig a receptorok közvetítésével végbemenő endocitotikus folyamatokban. Úgy tűnik azonban, hogy a cavolák

révén végbemenő endocitózis lassabban megy végbe, sebessége mintegy negyede a clathrin-burkos vezikulákkal lejátszódó endocitózis sebességének. Fehérjefoszfatáz gátlókkal (okadánsav) a clathrin-burkos vezikulák kialakulása gátolható, míg a caveola-mediált endocitózist a foszfataz gátlók stimulálják. Koleszterinkötő ágensek (filipin) blokkolják a caveolák közreműködésével történő endocitózist, de nincsenek hatással a clathrin-burkos vezikulákkal végbemenő endocitózisra. Protein-kináz-C aktiválókkal a caveolák lefűződése stimulálható, míg a PKC aktivitásának növekedése a clathrin-burkos útvonalat nem befolyásolja.

γ) *Transzcelluláris transzport, lipid szorting*: A caveolák ill. caveolin tartalmú membrán domének fontos szerepet játszanak bizonyos molekulák, elsősorban a koleszterin és más lipidek, valamint a GPI-linked fehérjék sejten belüli transzportjában és elosztásában. A caveolák a legfőbb membrán-lipid (koleszterin, szfingolipidek, szfingomielin, glikolipidek, gangliozin stb.) és fehérje transzporterek.

δ) *Koleszterin homeosztázis*: A caveolák fő komponense, a caveolin-1 izoforma igen nagy affinitással köt koleszterint. A sejtek szabad koleszterin koncentrációja pedig alapvetően meghatározza, befolyásolja a caveolák megjelenését a sejtfelszínen, a caveolin izoformák expresszióját, az egyes caveolin-mRNS-ek szintézisét. A caveolák/caveolin működése tehát szoros kapcsolatban áll a sejten belüli koleszterin szinttel, és szabályozó szerepet játszanak a koleszterin *intracelluláris transzportjában* is.

b.) A caveolák szerepe a jelátvitelben, szignáltranszdukcióban

A caveolák igen nagy mennyiségben akumulálnak GPI-kötött fehérjéket, a MAP kináz foszforilációs kaszkád elemeit (h-Ras, Fyn, c-Src), sejtfelszíni receptorokat (EGF, PDGF receptort), protein kinázA-t és C-t, endoteliális nitrogénmonoxid-szintetázt (eNOS). A caveolákban akumulálódó fehérje kötődése a caveolinhoz a fehérjét „kikapcsolt” állapotban tartja, azaz a jelátvitelben szerepet játszó molekulák inaktivációjához vezet, a caveolin tehát mint a jelátviteli folyamatok negatív regulátora funkcionál, negatív regulátorként játszik szerepet a sejtostódásban is.

Összefoglalva: a caveolák számos, alapvető jelentőségű működésben játszanak kitüntetett, kulcsfontosságú szerepet. A caveolák genezise és internalizációs ciklusa a membrán fehérjék és lipidek magasfokon szabályozott turnoverét jelenti. Lefűződésükkel, internalizációjukkal, és a caveolin izoformák down-regulációjával a caveolákban jelenlévő, jelátvitelben, szignál-transzdukcióban szerepet játszó molekulák modulációja válik lehetségessé.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során kísérleti objektumként patkányok hasüregéből izolált, ún. *peritoneális makrofágokat* használtam. A makrofágok az immunfolyamatokban fontos szerepet játszó mononukleáris fagocita-rendszer heterogén képviselői. A makrofágok aktivitási állapotát az eltérő környezeti hatások befolyásolják. Ezen hatások eredményeként háromféle funkcionális állapotban fordulhatnak elő: rezidens/exudált, elicitált és aktivált makrofágokról beszélhetünk.

A caveolák 1989-90-ben kerültek az érdeklődésem középpontjába, amikor sikerült kimutatnunk, hogy a clathrin-burkos vezikulák közreműködésével végbemenő felvételi folyamatok blokkolása után fibroblasztokban a caveolák játszanak fontos szerepet ezen sejtek endocitotikus folyamataiban.

1.) A szakirodalomban hosszú ideig az volt az elfogadott álláspont, hogy az immunsejtek felszínén nincsenek jelen a caveolák. Munkám során *első lépésben* arra kerestem választ, hogy a makrofágok sejtfelszínén jelen vannak-e caveolák, illetve caveolákra emlékeztető struktúrák. Vizsgáltam, hogy a makrofágok aktivitási állapotának változása befolyásolja-e ezen membrán invaginációk sejtfelszíni megjelenését és eloszlását.

2.) *Ezt követően* arra kerestem választ, hogy a makrofágok sejtfelszínén megjelenő palack- ill. omega alakú membrán-befűzések valóban caveolák-e. A választ a fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett immuncitokémiai vizsgálatok eredményeiből vártam. Mivel a caveolák megjelenéséhez, kialakulásához a caveolin-1 expressziója elengedhetetlenül szükséges, vizsgáltam, hogy a peritoneális makrofágok milyen caveolin izoformákat expresszálnak, változik-e az egyes izoformák expressziója a makrofágok aktivitási állapotának függvényében. Arra

kerestem választ, hogy a caveolák hiánya és megjelenése patkány peritoneális makrofágokban milyen izoformák hiányával, ill. jelenlétével magyarázható.

3.) A caveolák sokrétű funkciói közül érdeklődésem középpontjában az **endocitózisban** betöltött szerepük áll. Kísérletes munkám megkezdésekor ellentétes irodalmi adatok álltak rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy vajon a caveolák a sejtmembránon jelenlévő jellegzetes összetételű, rigid, *merev domének*, avagy más vezikulákhoz hasonlóan a plazmamembránról valóban lefüződő, *dinamikus struktúrák*. Munkám során vizsgáltam, hogy a patkányok hasüregéből izolált makrofágok caveolái lefüződnek-e a sejtmembránról, részt vesznek-e a makrofágok endocitotikus folyamataiban.

4.) A következő lépésben arra kerestem választ, hogy a caveolák lefüződését, internalizációját és esetleges reciklizációját milyen szabályozó mechanizmusok (kinázok/foszfataázok) befolyásolják. Vizsgáltam, hogy a szerint/treonin foszfataázgátló okadánsav hogyan hat a caveolák lefüződésére, illetve hogyan változik az egyes caveolin izoformák tirozin foszforilációja a foszfataáz gátlóval végzett kezelések után.

A patkányok hasüregéből izolált peritoneális makrofágok eredetüket, aktivitási állapotukat tekintve meglehetősen heterogének, a további vizsgálatokhoz célszerűbbnek látszott egy jól reprodukálható, homogén sejtpopulációt alkalmazni. Erre a célra egy *hepatocelluláris karcinóma* sejtvonalat, a *HepG2* sejteket választottam. Ezen sejtvonal előnye, hogy hosszú időn át megbízhatóan homogén sejtpopulációt képeznek, a sejteket nagy mennyiségben, olcsón állíthatjuk elő, a kísérletekhez elegendő mennyiségű sejt előállításához nincs szükség állatok feláldozására. Nem elhanyagolható szempont, hogy a *HepG2* sejtek plazmamembránján nagy számban vannak jelen caveolák. A kétféle sejtpopuláción végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása ugyanakkor lehetőséget nyújthat annak eldöntésére, hogy a tenyésztett sejteken kapott eredményekből milyen mértékben következtethetünk a fiziológias viszonyok között, az élő szervezetben végbemenő folyamatokra.

5.) A caveolák közreműködésével végbemenő felvétel indukálására a *HepG2* sejteken okadánsavat, egy tirozin-foszfataáz gátlót, a nátrium-ortovanadátot, valamint egy fiziológias ligandot, az albumint használtam.

6.) Tekintettel arra, hogy a **caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásairól** igen keveset tudunk, vizsgálataim középpontjában az állt, hogy a

caveolák által felvételre került ligandok, illetve maga a caveolin milyen intracelluláris struktúrák érintésével vándorol a sejtben. Kiemelt figyelmet szenteltem annak, hogy van-e kapcsolat a caveolák közreműködésével végbemenő endocitózis és a clathrin-mediált endocitózis sejtben belüli állomásai között, vagyis hogy a caveola-mediált endocitózis végállomásai valóban a caveoszóma néven leírt struktúrák

7.) Annak eldöntésére, hogy a plazmamembránon újonnan megjelenő caveolák pótlása esetleges citoplazmatikus caveola-raktárakból történik-e, avagy *de novo* szintetizált caveolin szükséges az új caveolák kialakulásához, fehérjeszintézist gátló cikloheximidet használtam. Biokémiai módszerekkel vizsgáltam a különböző membránfrakciókban megjelenő caveolin-1 mennyiségét az egyes kezelések után

8.) Minthogy a caveoszómák kizárólagos markere a caveolin-1, morfológiájuk, elhelyezkedésük alapján önálló sejtalkotó létük megkérdőjelezhető. A sejtfelszín jelölésére alkalmas Ruténium-vörös festék alkalmazásával vizsgálni kívántam azt, hogy a caveoszómák valóban önálló citoplazmatikus struktúrák-e, avagy a sejtfelszínnel összeköttetésben álló caveola-csoportok.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinket 200-250 gramm súlyú Charles River hím patkányok hasüregéből kinyert makrofágokon végeztük. Rezidens makrofágokat egészséges, kezeletlen állatok hasüregéből nyertünk. Elicitált makrofágokat az 1 ml komplett Freund adjuváns intraperitoneális injekciója után 24 órával izoláltunk. A humán hepatocelluláris sejtvonal sejtjeit (HepG2 sejtek, ATCC: HB8065), Dr. Kovalszky Ilona (I. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézet) biztosította számunkra.

Caveolák kimutatása, caveolin izoformák azonosítása

Hagyományos elektronmikroszkópos technikát, fény- (konfokális) és elektronmikroszkópos immuncitokémiát, Western blot vizsgálatokat, immunprecipitációt és PCR technikát alkalmaztunk a caveolák, illetve a caveolin izoformák azonosítására.

A caveolák lefűződésének, internalizációjának vizsgálata

Rezidens és elicitált makrofágok folyadék fázisos és receptor-mediált endocitózisát tanulmányoztuk morfológiai és biokémiai (spektrofotometriás kvantitatív enzim meghatározás) módszerekkel. Folyadék fázisos markerként tormaperoxidázt (HRP), a receptor-mediált endocitózis tanulmányozására pedig peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) immunkomplexet használtunk. Vizsgáltuk, hogy a caveolák integritásának megváltozása (a koleszterin eltávolítása) hatással van-e a makrofágok endocitotikus folyamataira.

A caveolák internalizációjának stimulálásához egy szerin-treonin foszfatáz gátlót, az okadánsavat 4 és 100nM koncentrációban, illetve 10 μ M tirozin-foszfatáz gátló nátrium-ortovanadátot (Na₃VO₄) használtunk. Makrofágokkal végzett kísérleteink során tormaperoxidázt, HepG2 sejteken pedig albumint használtunk az internalizáció nyomon követésére. Kísérleteink egy részében fehérjeszintézis gátlására cycloheximidet alkalmaztunk.

Morfológiai valamint biokémiai vizsgálatainkhoz az alábbi ellenanyagokat alkalmaztuk: poliklonális caveolin-1, monoklonális caveolin-2, anti-CD63, monoklonális anti-syndecan (CD138), valamint monoklonális anti-foszfotirozin ellenanyagot. Fluoreszens jelölés esetén az ellenanyagok kimutatását anti-nyúl Alexa 488nm, illetve avidin-konjugált Alexa 594nm fluoreszens festékekkel végeztük. A fluorescens felvételek Bio-Rad Radianc2100 Rainbow konfokális mikroszkóppal, Laser Sharp software alkalmazásával készültek. További képszerkesztéshez Confocal Assistant és Adobe Photoshop programokat használtunk.

A fagyasztott ultravékony metszeteinken elvégzett immun-arany jelöléshez az immunoreaktív fehérjéket 10nm illetve 15nm átmérőjű koloidális arannyal jelölt protein-A segítségével mutattuk ki (Cell Microscopy Center, Utrecht), majd a jelölt metszeteket Jeol illetve Hitachi elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

Morfológiai vizsgálataink: fénymikroszkópos immuncitokémia, hagyományos elektron-mikroszkópia, DAB reakció, sejtfelszín jelölése Ruténium-vörössel, fagyasztott ultravékony metszeteiken végzett immun-arany jelölés, morfometriai és statisztikai elemzések.

Biokémiai vizsgálataink: tormaperoxidáz meghatározás spektrofotométerrel, immunoprecipitáció és Western blot analízis, detergens-mentes membránizolálás majd Western blot analízis.

EREDMÉNYEK ÉS KÖTKEZTETÉSEK

1.) Munkánk során az irodalomban elsőként sikerült igazolni, hogy a makrofágok sejtfelszínén *jelen vannak caveolák*. Megállapítottuk, hogy számuk, megjelenésük a sejtek fiziológiás (aktivitási) állapotának függvénye.

2.) A caveolák kialakulása a caveolin-1 expressziójának függvénye. Rezidens makrofágok csak nagyon kis mennyiségben expresszálnak caveolin-1 izoformát, sejtfelszínükön csak elenyésző mennyiségben vannak jelen caveolák. Elicitálás hatására a caveolin-1 expressziója igen jelentősen megnő, és ezzel párhuzamosan a sejtfelszínen a caveolák is nagy számban jelennek meg. A caveolin-1 expressziója mind a transzkripció, mind pedig a transzláció szintjén szabályozott.

3.) Elsőként igazoltuk, hogy makrofágokban egy 29kDa molekulatömegű caveolin izoforma is jelen van. Immunprecipitáció és Western blot eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy ez az izoforma *caveolin-2, expressziója a rezidens makrofágokra jellemző*.

4.) Az elsők között sikerült igazolnunk, hogy a caveolák a sejtfelszínről lefüződő, dinamikus struktúrák. Makrofágokban megnövekedett számuk egyenes arányban áll a sejtek által felvett anyag mennyiségének növekedésével. Morfológiai bizonyítékokkal támasztottuk alá, hogy részt vehetnek a makrofágok endocitotikus folyamataiban, alternatív endocitotikus útvonalat képviselnek.

5.) Kísérleteink során megállapítottuk, hogy mind makrofágokban, mind medig HepG2 sejtekben a sejtfelszínen lévő caveolák lefüződését a caveolin izoformák tirozin foszforilációja szabályozza. Makrofágokban a caveolák lefüződése során a kb. 29kDa molekulatömegű, makrofág-specifikus caveolin-2 izoforma erőteljes tirozin foszforilációját tapasztaltuk. Ennek alapján úgy véljük, hogy a *makrofágokban* a caveolin-2 izoforma játszik szabályozó szerepet a caveolák lefüződésében.

6.) Lehetséges modellt állítottunk fel annak magyarázatára, hogy a szerin/treoninfoszfataz gátló okadánsav milyen lépéseken keresztül eredményez(het)i a caveolin tirozin foszforilációját.

7.) Az irodalomban elsők között vizsgáltuk a caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásait. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a clathrin-burkos és caveola-mediált endocitózis nem egymástól független felvételi folyamat, hanem a

késői endoszómák szintjén kapcsolatba kerül egymással. Úgy véljük, hogy természetes ligandok esetében *a klasszikus és a caveola-mediált felvételi útvonal citoplazmatikus állomásai azonosak*, és a multivezikuláris testek közbeiktatásával végül is a lizoszómákkal kerülnek kapcsolatba.

8.) Hagyományos és Ruténium-vörös felszíni jelöléssel kombinált elektronmikroszkópos vizsgálataimmal egyértelműen igazoltam, a caveoszómáknak tűnő struktúrák többsége a plazmamembránnal összeköttetésben álló caveola-csoport, és nem önálló sejtorganellum.

9.) Morfológiai, morfometriai vizsgálataimmal bizonyítottam, hogy a foszfatáz gátló okadánsav kezelés hatására a caveola-multivezikuláris test fúzió elmarad, a caveoláris transzport a rozetta-szerű caveola-halmaz keletkezésének szintjén megreked. Az okadánsav a caveolák lefűződését indukáló hatása mellett a lizoszómális degradációhoz vezető utat gátolja, feltehetőleg a PP2A gátlása révén.

10.) Elektronmikroszkópos megfigyeléseink és a fehérjeszintézist gátló cikloheximid alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a plazmamembránról lefűződő caveolák pótlására a sejtek *de novo* szintetizált caveolin-1 fehérjét használnak fel.

Összefoglalva: Kísérleti eredményeim nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy Ari Helenius (akinek nevéhez a caveoszóma fogalom bevezetése fűződik) 2010-ben a *Traffic* c. folyóiratban megjelent cikkében visszavonja eredeti hipotézisét. Ebben a cikkében Helenius elismeri, hogy a caveolák közvetítésével lejátszódó endocitózis a hagyományos korai endoszóma - késői endoszóma - lizoszóma útvonalat követi, és nem javasolja a caveoszóma fogalom használatát. (Hayer, A., Stoeber, M., Bissing, C., Helenius, A. (2010) Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*, 11: 361-382.)

A disszertáció alapját képező közlemények

Cupers, P., Veithein, A., **Kiss, A.L.**, Baudhuin, P., Courtiy, P. (1994): Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat foetal fibroblasts. *J Cell Biol.* 127: 724-735.

Kiss, A.L., Kittel, Á. (1995): Early endocytotic step in elicited magcrophages: omega shaped plasma membrane vesicles at their cell surface. *Cell Biology International*, 19: 527-538.

Kiss, A.L., Geuze, H.J. (1997): Caveolae can be alternative endocytotic structures in elicited macrophages. *European J Cell Biol* 73: 19-27

Kiss, A.L., Turi, Á., Müllner, N., Tímár, J. (2000): Caveolin isoforms in resident and elicited rat peritoneal macrophages. *European J Cell Biol* 79: 1-7.

Kiss, A.L., Turi, Á., Müllner, N., Kántor, O., Botos, E. (2002): Caveolae and caveolin isoforms in rat peritoneal macrophages. Review *Micron* 33: 75-93.

Kiss, A.L., Botos, E., Turi, Á., Müllner, N., Hollósi, P., KovaLszky, I. (2003): Ocadaic acid treatment alters the intracellular localization of caveolin-1 and caveolin-2 in HepG2 cells. *Acta Biologica Szegediensis* 47: 11-17.

Kiss, A.L., Turi, A., Müllner, N., Kovacs, E., Botos, E., Greger, A. (2005): Oestrogen-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its effect on the oestrogen receptor localization: an in vivo study. *Mol Cell Endocrinol* 245: 128-137.

Botos, E., Turi, A., Müllner, N., Kovalszky, I., Tatrai, P., **Kiss, A.L.** (2007): Regulatory role of kinases and phophatases on the internalization of caveolae in HepG2 cells. *Micron* 38: 313-320.

Kiss, A.L., Botos, E. (2009): Ocadaic acid retains caveolae in multicaveolar clusters. *Pathol. Oncol Res*, 15: 479-486.

Botos, E., Klumperman, J., Oorshot, V., Ígyártó, B., Magyar, A., Oláh, M., **Kiss, A.L.** (2008): Caveolin-1 is transported to multi-vesicular bodies after albumin-induced endocytosis of caveolae in HepG2 cells. *J Mol Cell Med*. 12. 1632-1638.

Kiss, A.L., Botos, E. (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13: 1228-1237.

Kiss, A.L. (2012): Caveolae and the regulation of endocytosis. (Review) *Adv Exp Med Biol* 729. 14-28.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom mentoromnak **Prof. Dr. Röhlich Pálnak**, aki bevezetett az endocitózis rejtelseibe, szigorú, kemény elvárásaival, hozzáállásával megtanított a szakmai igényességre, a precizításra, tanácsaival segítette, ösztönözte munkámat. A publikációink szigorú szakmai és nyelvi lektoraként a mai napig támogatja, segíti munkámat.

Köszönettel tartozom az Anatómiai (ill. volt Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai) Intézet volt és jelenlegi vezetőinek, **Prof. Dr. Halász Bélának**, aki lehetővé tette, hogy Intézetében Prof. Dr. Röhlich Pál mellett dolgozhassak; **Prof. Dr. Oláh Imrének**, aki megnyitotta a lehetőségeket előttem, módot és lehetőséget adott arra, hogy bizonyítsak; **Prof. Dr. Szél Ágostonnak**, akivel a kezdetek kezdetétől baráti kapcsolatban vagyok, akinek baráti, segítőkész támogatását állandóan magam mellett érzem.

Hálával és köszönettel tartozom volt és jelenlegi PhD hallgatóimnak, **Dr. Botos Erzsébetnek**, **Dr. Katz Sándornak**, **Dr. Balogh Petrának**, akik fáradhatatlan, kitartó munkájukkal hozzájárultak ezen disszertáció megszületéséhez. **Zsiros Viktóriának**, aki mindössze egy éve PhD hallgatóm, de máris sokat tett azért, hogy a kutatómunka eredményesen folyjék tovább a laboratóriumban.

Külön köszönettel tartozom asszisztenseimnek, **Kutasi Ferencné (Margitnak)**, akivel több évtizeden kersztül jóban-rosszban, munkában és örömben megosztottunk; **Szemere Lászlóné (Katinak)**, aki kiváló elektronmikroszkópos asszisztensi munkájával járult hozzá eredményeimhez; **Dóczi Nikolettnek**, a fiatal, de nagyon tehetséges új asszisztensnőnknek a fagyasztott félvékony és ultravékony metszetek elkészítéséért, és az elvégzett immuncitokémiai munkákért.

Végül örök hálával tartozom férjemnek, **Dr. Lásztity Demeternek** és gyermekeimnek (**Alexandra lányomnak és Dusán fiamnak**), akik mindvégig biztattak a disszertáció megírására, lelkiileg mellettem álltak, nyugodt, kiegyensúlyozott családi háttér biztosításával lehetővé tették számomra, hogy a tudományos munkára megfelelő mennyiségű időt és figyelmet szentelhessek.