# Caveolák, caveolin izoformák és a caveola-mediált endocitózis

Doktori Értekezés

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

## Tartalomjegyzék

IRODALMI ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK	5
1. A CAVEOLÁK MORFOLÓGIAI SAJÁTSÁGAI	5
2. A CAVEOLÁK MEMBRÁNJÁNAK MOLEKULÁRIS ÖSSZETÉTELE	7
2.1. A caveolák: hidrofób membrán domének, caveolin tartalmú lipid raftok	7
2.2. A caveolin fehérjecsalád	9
2.3. A caveolák membránjában jelen lévő egyéb fehérjék, molekulák	13
3. A CAVEOLÁK KELETKEZÉŠE	18
4. A CAVEOLÁK FUNKCIÓJA	19
4.1. A caveolák és caveolin izoformák szerepe a jelátviteli folyamatokban és a	
daganatos betegségekben	19
4.2. A caveolák szerepe a sejtek transzportfolyamataiban	22
5. CÉLKITŰZÉSEK	35
6. ANYAG ÉS MÓDSZER	39
6.1. Sejtek	39
6.2. Anyagok	40
6.3. Ellenanyagok és fluoreszcens próbák	40
6.4. Kísérleti eljárások	41
7. EREDMÉNYEK	51
7.1. Vizsgálatok makrofágokon	51
7.2. Vizsgálatok HepG2 sejteken	84
8. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	. 111
8.1. A caveolák és caveolin izoformák peritoneális makrofágokban	. 111
8.2. A caveolák szerepe makrofágokban	. 115
8.3. A caveolák lefűződésének szabályozása	118
8.4. A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai	122
9. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	. 129
IRODALOMJEGYZÉK	132
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	154

#### RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BAR domén (Bin-Amphyphysin-RVS) fehérjék: a membrán görbülések kialakításáért felelős fehérjék

BSA: bovin szérum albumin

C133, C143, C156: a C terminális 133., 143. és 156. helyzetű cisztein aminosavai

CD138: Cluster of Differentiation 138 (=syndecan-1)

CD63: Cluster of Differentiation 63 (=LIMP-1)

C-MAD: C terminális vég, membránkapcsolatot biztosító domén

cMyc: regulátor gén, multifunkcionális fehérjét kódol, amely a sejtciklust, apoptózist,

celluláris transzforámciót szabályoz

CSD: caveolin scaffolding domén

DMEM: Dubecco's Modified Eagle Medium

ECM: extracelluláris mátrix

EDTA: etilén-diamin tetra-acetát

EHD fehérjék: ATP-áz aktivitással rendelkező, PACSIN-kötő fehérjék

EMT: epithelial/mesenchymal transition

E2F: transzjripciós faktor

eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintetáz

ERK: extracellular signal releted kinases

gp60: 60kDa molekulatömegű glikoprotein

GPI: glikozil-foszfatidilinozitol

GTP: guanozin trifoszfát

HDL: magas denzitású lipoprotein

HepG2: humán hepatocelluláris májkarcinóma sejtvonal

HOXA5: homeobosx fehérjét kódoló gén

HRP: tormaperoxidáz

LDL: alacsony denzitású lipoprotein

LIMP-1: lizoszóma integráns membrán fehérje 1

MAP-kináz: mitogén-activated protein kináz

MKKK3: MAP kinázkinázkináz

MHC: major histocompatibility antigen

- N-MAD: N terminális vég, membránkapcsolatot biztosító domén
- OD: oligomerizációs domén;
- PACSIN/syndapin: perifériás membrán fehérje, membrán-formáló BAR domén fehérje
- PAP: peroxidáz-antiperoxidáz immunkomplex
- PBS: 0,1M foszfátpuffer
- PDGF: platelet derived growth factor
- PKCα: protein kináz C α
- PP1: szerin/treonin protein foszfatáz 1
- PP2A: szerin/treonin protein foszfatáz 2
- PTRF/cavin: polimerase I release factor, a caveolák burok fehérjéje
- p38: mitogén aktiválta protein kináz
- p53: celluláris tumor antigén
- RhoA: Ras homolog gene family memberA: kis GTP-áz fehérje, a stre4ssz filamentumok keletkezésének regulátora
- Sp1: transzkripciós faktor
- Src: proto-onkogén kináz
- STAT: signal transducers of transcription
- SREBP: sterol responsive element binding protein
- SV40: Simian vírus 40
- TD: terminális domén
- TMD: transzmembrán domén
- VIP21: vezikula integráns fehérje 21 (= caveolin-1)
- Y14: 14. helyzetű tirozin aminosav

## IRODALMI ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

## 1. A CAVEOLÁK MORFOLÓGIAI SAJÁTSÁGAI

A caveolák 50-100 nm átmérőjű palack, vagy omega alakú plazmamembrán betüremkedések, amelyeket elsőként 1953-ban Palade írt le endotél sejteken (Palade. 1953). Ezen "kis üregek, amelyek az extracelluláris mátrixszal kommunikálnak" 1955ben Yamadától kapták a "caveola" ("little caves") nevet (Yamada, 1955). Kutatásuk a 90-es években új lendületet kapott, akkor, amikor kiderült, hogy a clatrhin burkos vezikulák kialakulásának blokkolása nem állítja le az endocitotikus folyamatokat, és a caveolák, mint alternatív endocitotikus strukturák kerültek az érdeklődés középpontjába. A caveolák hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken különböző mélységű (nyitott, sekély öblöcskék, zártabb, szűk nyakú invaginációk) membránbefűződések formájában figyelhetők meg. Egyesével vagy csoportosan, szőlőfürt-, gyöngysorszerű elrendezésben "lógnak bele" az intracelluláris térbe (1. ábra). Igen nagy számban fordulnak elő differenciált sejtek plazmamembránján, így például endotélsejtekben (Peters et al 1985), fibroblasztokban (Röhlich és Allison 1976) és zsírsejtekben (Fan, 1983, Scherer és mtsai 1994, 1996, 1997). Számos más sejtben is jelen vannak, mint például simaizom sejtekben (Forbes és mtsai 1979), szívizom sejtekben, harántcsíkolt izomrostokban, sőt, astrocytákban, oligodendroglia sejtekben, microglia sejtekben (Nishiyama és mtsai 1999), dendritikus sejtekben és makrofágokban (Kiss és Kittel 1995, Kiss és Geuse 1997). A caveolák néhány sejtből, például limfocitákból (Fra és mtsai 1995) azonban teljesen hiányoznak.

Hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken ezen plazmamembrán invaginációk citoplazma felöli oldalán nem látható a clathrin burkos vezikulákra jellemző burok (1.A ábra). Nagy felbontású scanning elektronmikroszkóppal, illetve fagyasztva-tört és mély maratásos technika alkalmazásával (Steer és Heuser 1991) azonban nyilvánvalóvá vált, hogy jellegzetes morfológiájú, spirális burokkal rendelkeznek (1.B ábra).



1. ábra: A.) Hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken a caveolák citoplazmatikus felszínén nem látható a clathrin-burkos vezikulákra jellemző elekrtonsűrű burok. Nyíl: clathrin-burkos vezikula; nyílhegyek: caveolák (A sejtfelszínen kationos-ferritin szemcsék láthatók.). B.) Fagyasztva-tört és mély maratásos technika alkalmazásával a clathrin-burkos vezikulák kosárszerű burkától (a kép jobb felső sarka) morfológiailag jól elkülöníthető a caveolák spirális burka (Heuser 1991).

## 2. A CAVEOLÁK MEMBRÁNJÁNAK MOLEKULÁRIS ÖSSZETÉTELE

Biokémiai vizsgálatok során kiderült, hogy a caveolák membránja is lipidekből és fehérjékből áll, melyek közül néhány jelenléte elengedhetetlen a caveola kialakulásához, azonban lipid-komponensei eltérnek a környező membránétól. Az elmúlt közel 20-25 év alatt a caveolák intenziv biokémiai vizsgálata során számos biológiailag fontos molekulát (lipideket, módosított fehérjéket, membrán receptorokat, jelátviteli molekulákat, transzportereket stb.) azonosítottak a caveolákban, amelyek csak időlegesen és átmentetileg kapcsolódnak a caveolák membránjához.

#### 2.1. A caveolák: hidrofób membrán domének, caveolin tartalmú lipid raftok

А caveolák membránja nagy mennyiségben tartalmaz koleszterint, szfingomielint valamint glikolipideket, glikofoszfolipideket, foszfolipidjeik telített zsírsav-tartalma is magas. Ezen lipid összetételnek köszönhetően detergensekben oldhatatlan, merev, erősen hidrofób membránrészletekké válnak, amelyeknek olvadási hőmérséklete magasabb (Tm~41C<sup>0</sup>), mint a környező membránoké. Ez a lipid összetétel szorosabb molekuláris "csomagolást" tesz lehetővé (Simmons és Ikonen 1997, Brown és London 1997). Az ilyen membrán-mikrodomének az irodalomban lipid raftokként ismertek. A lipid raftok nagy rendezettségű, kis fluiditású membránterületek, amelyek elkülönülnek a szomszédos rendezettlenebb membránterületektől, külön fázist alkotnak a membránban, mint a vizen úszó tutajok vagy jégtáblák (Friedrichson ls mtsai, 1998; Pralle és mtsai. 2000).

A lipid raftok fehérje tartalmukban is különböznek a környező membránoktól. A *glikozil-foszfatidilinozitolhoz kötött (GPI-kötött) fehérjék* előszeretettel akkumulálodnak a raftok membránjában (Oh és Schnitzer 2001). A caveolák membránjának jellegzetes fehérjéi a *caveolin fehérje család* tagjai, amelyek a GPI-kötött fehérjék egy különleges csoportját képezik (l. később). A caveolák tehát caveolin tartalmú lipid raftok. A caveolák membránjában a raftokra jellemző egyéb fehérjék csökkent mennyiségben vannak jelen (Pike 2004). Caveolin beépülése a lipid raft feladatainak meghatározója lesz, és ugyanakkor befolyásolja a raft morfológiai megjelenését is: a caveolin fehérjét

tartalmazó lipid raftok a caveolákra jellemzően a plazmamembrán palack illetve omega alakú invaginációiként figyelhetők meg a sejtek felszínén (2. ábra).

A caveolák membránját alkotó lipidek és a caveolin között szoros, dinamikus kapcsolat áll fenn. A caveolin *in vitro* (Murata és mtsai 1995) és *in vivo* (Thiele és mtsai 2000) nagy affinitással köti a koleszterint. A caveolin-koleszterin kapcsolat elengedhetetlenül szükséges a caveola-burok létrejöttéhez és stabilizálásához. Ha csökken a sejtekben a koleszterin szintje (például koleszterin-kötő ágens, filippin jelenlétében, vagy a koleszterin fokozott oxidációja esetén), a caveolin transzportja a Golgi készülékből a plazmamembrán irányába erősen csökken, a caveolák burka szétesik, a sejtfelszíni caveolák száma csökken (Anderson 1998, Murata és mtsai 1995, van Meer 2001).



**2. ábra:** A lipid raftok olyan membrán mikrodomének, melyekben a környező membrántól eltérően nagy mennyiségben van jelen koleszterin, glikolipidek, glikofoszfolipid és szfingolipid. A caveolák olyan lipid raftok, melyek jellemző fehérjéje a caveolin. A caveolin hajtűszerűen épül be a lipid raftokba, létrehozva a caveolák jellegzetes alakját. (Anderson 1998).

#### 2.2. A caveolin fehérjecsalád

A caveolák burkának fő komponense egy 21-24 kDa molekulatömegű integráns membránfehérje, melyet Rothberg (1992) *caveolinnak* nevezett el. Hasonló fehérjét mutatott ki Kurchalia (1992, 1994) a transz-Golgi hálózat exocitotikus vezikuláinak membránjában, amelyet *vezikula integráns fehérjének (VIP21)* nevezett el. Erről a fehérjéről később szekvencia-vizsgálatok során kiderült, hogy megegyezik a caveolinnal.

Molekuláris biológiai vizsgálatok bizonyították, hogy a caveolin többféle változatban, mint a caveolin géncsalád terméke fordul elő. (Glenney és Soppet, 1992; Scherer és mtsai, 1995, 1996, Tang és mtsai, 1994). A fehérjéket kódoló génszakaszok a 7. és a 3. kromoszómán találhatóak (Glenney és Soppet 1992, Scherer és mtsai 1995, 1996, Tang és mtsai 1996, Engelman és mtsai 1998a és b, Sotgia és mtsai 1999). A caveolin fehérjecsaládnak jelenleg három tagja ismert: **caveolin-1, caveolin-2 és caveolin-3**.

A **caveolin-1** –nek további két izoformáját ( $\alpha$  és  $\beta$ ) irták le. A  $\beta$  izoforma ~ 3kDa-al kisebb molekulatömegű, mint az  $\alpha$  (Li és mtsai 1996, Scherer és mtsai 1995). Mindkét izoforma képes a jellegzetes morfológiájú caveolákat létrehozni, a caveolin-1 $\alpha$  azonban inkább a mélyebb caveolákban fordul elő, és hatékonyabban indukálja a caveolák kialakulásást (Sherer és mtsai 1995; Fujimoto és mtsa 2000). A **caveolin-2**-nek három izoformáját azonosították: a teljes lánchosszúságú caveolin-2 $\alpha$ -t, és két rövidebb,  $\beta$  és y

variánst. A  $\beta$  izoforma feltehetőleg az alternatív splicing révén keletkezik, sejten belüli eloszlása különbözik az  $\alpha$  izoforma eloszlásától (Kogo és mtsai 2002). Az egyes izoformák funkciójáról azonban keveset tudunk. A **caveolin-3** izoformát izomspecifikus formának tartják (Song és mtsai 1996, Tang és mtsai 1996, Way és Parton 1995), bár kimutatták már asztrocitákban (Nishiyama és mtsai 1999, Marinissen és Gutkind 2001) és vegetatív ganglionok idegsejtjeiben is.

Az egyes fajok caveolin izoformáinak amimosavsorrendje nagyon hasonló: az emberi caveolin-1 és caveolin-2 aminosavsorrendjének 38%-a azonos, a hasonlóság 58%-os, míg a caveolin-3 aminosavsorrendje 65%-ban megegyezik és 85%-ban hasonlít a caveolin-1 aminosavsorrendjéhez (Cohen és mtsai 2003). A különböző állatfajokból

izolált caveolinok aminosavsorrendje is nagyfokú hasonlóságot mutat, amely arra utal, hogy a caveolin rendkívül konzervatív fehérje (Cohen és mtsai. 2003).

Az izoformák megjelenése szövetspecifikus: a caveolin-1 és a caveolin-2 bőségesen expresszálódik zsírsejtekben, endotélsejtekben, fibroblasztokban és simaizomsejtekben (Rothberg és mtsai 1992, Okamoto és mtsai 1998, Scherer és mtsai 1995, 1997).

A caveolin a membránban hajtűszerűen helyezkedik el, mind a C-, mind pedig az N-terminális része a citoplazma felé néz. A molekula struktúrálisan három részre tagolható: egy hidrofil N-terminális részre, egy meglehetősen rövid, centrális hidrofób szakaszra, mely a sejtmembrán kettős lipid-rétegébe ágyazva helyezkedik el, valamint egy hidrofil C-terminális szakaszra (3. ábra). Az N-terminális régió hossza a caveolin fehérjecsalád egyes tagjaiban eltérő, ez a caveolinok legnagyobb variabilitást mutató szakasza. Az N-terminális régióban található a caveolin scaffolding doménje (CSD, 81-101). Ezen régió gazdag aromás aminosavakban (triptofán, fenilalanin, tirozin), rendkívül fontos a fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában. Az N terminális régió 61aminosavnyi szakasza felelős a caveolin molekulák oligomerizációjáért 101 (Sargiacomo és mtsai 1995). A 32-33 aminosavból álló centrális régió (102-134 aminosav) többnyire hidrofób aminosavakat tartalmaz. Ez a caveolin transzmembrán doménje (TMD), segítségével a caveolin a lipid kettősrétegbe süllyed úgy, hogy a fehérje N és C treminális része is a citoplazma felé néz, így hozva létre a caveolin jellegzetes hajtű szerkezetét. A C terminális szakaszon a 133. 143. és 156. pozicióban található ciszteinhez kötödő palmitinsav oldalláncok a membránhoz horgonyozzák a caveolin homooligomereket, stabilizálva azokat a lipid kettős rétegben (Dietzen és mtsai 1995, Schlegel és Lisanti 2000, Lee és mtsai 2000)

A caveolin izoformák közül leginkább kutatott és ismert **caveolin-1** (vagy VIP21), amelynek jelenléte elengedhetetlenül szükséges a caveolák létrehozásához (Fra és mtsai 1995). A 24 kDa molekulatömegű caveolin-1 $\alpha$ , 178 aminosav hosszúságú, míg a 21 kDa molekulatömegű caveolin-1 $\beta$ , 147 aminosav hosszú, a két izoforma transzlációja külön mRNS-ről történik. (Scherer és mtsai 1997, Rothberg és mtsai 1992.). A caveolin-1 fehérjében 9 tirozin aminosav található, melyek közül a 6. 14. és a 25. csak a caveolin-1 $\alpha$  izoformában van jelen. A *caveolin-1* $\alpha$  izoforma N-terminálisának 14. helyén elhelyezkedő tirozin az Src kináz szubsztrátja (Lee és mtsai 2000). Az aktivált Src kináz által foszforilált caveolin a caveolák aggregációját, fúzióját, és

lefűződését eredményezi. A foszforiláció szükséges a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásához is (Nomura és Fujimoto 1999). A *caveolin-1β* izoforma szerin oldalláncain foszforilálódhat, bár foszforilációs módosulásai jóval kevésbé ismertek. A caveolin-1 egyéb foszforilációs módosulásai, például a 80. és a 168. helyen található szerin aminosavak foszforilációja a caveolin sejten belüli transzpotjának szabályozásában vesz részt (Schlegel és mtsai 2001.). A caveolin-1 a caveolákon kívül, a citoplazmában, nem vezikuláris strukturához kötötten is előfordulhat (Head és Insel 2006). Harántcsíkolt izomban, a bőr keratinocitáiban a citoszólban, hámsejtekben és májsejtekben a mitokondriumokban is kimutatható (Li és mtsai 2001). Egyes sejttípusok apolipoproteinként használják, s így a caveolin-1 részt vesz ezen sejtek lipidhomeosztázisának szabályozásában (Uittenbogaard 2000).



**3. ábra:** A caveolin fehérje szerkezete. OD: oligomerizációs domén; N-MAD: az N terminális vég membránkapcsolatot biztosító doménje; TM: transzmembrán domén; C-MAD: a C terminális vég membránkapcsolatot biztosító doménje; TD: terminális domén. (Razani és mtsai 2002).

A caveolin fehérjecsalád tagjai között a **caveolin-2** a legvariábilisabb. 38%-ban teljesen mértékben megegyezik, és 58%-os hasonlóságot mutat a caveolin-1 izoformával (Scherer et al. 1996). A caveolin-2 a legtöbb sejttípusban (endotélsejtben, simaizomsejtben és harátcsíkolt izomban, fibroblasztban és zsírsejtekben) együtt expresszálódik a caveolin-1 fehérjével (Scherer et al 1996). A caveolin-2 nagy mennyiségben a Golgi készülékben - monomer és homodimer formában - fordul elő. A caveolin-1 fehérjével képes hatalmas, 300-350 kDa molekulatömegű heterooligomerek

létrehozására. Sejten belüli a caveolin-1-el együtt szállítódik. Caveolin-1 hiányában a caveolin-2 a Golgi készülékben reked, majd degradálódik (Mora és mtsai 1999., Krajewska és Maslowska 2004.). A caveolin-1/caveolin-2 heterodimerek rész vesznek a caveolák kialakulásában. A caveolin-2 szintézist követő foszforilációja elősegíti a caveolák burkának felépülését (Lee és mtsai 2002, Sowa és mtsai 2003). A caveolin-2 azonban önmagában nem elégséges a burok felépítéséhez. Hosszú ideig az volt az elképzelés, a caveolin-2 csak a caveolák felépítésében vesz részt, ebben a folyamatban járulékos szerepet tölt be, tekintettel arra, hogy hiányában a caveolák megjelenése zavartalan. Az utóbbi évek intenzív kutatásainak eredményei azonban azt mutaják, hogy a caveolin-2 önmagában, a caveolin-1 és caveolin-3-hoz hasonlóan, képes módosítani a jelátviteli útvonalakat. Wong és mtsai (2009) igazolták, hogy a foszfo-caveolin-2 nemcsak a STAT3 foszforilációjában játszik fontos szerepet, de elősegítí a foszfo-STAT3 nukleáris transzlokációját, és a foszfo-STAT3 DNS-hez való kötődését. Macekova és mtsai (2015) kimutatták, hogy a csontvelő eredetű makrofágokban a caveolin-2 a pro-inflammatorikus válasz szabályozásában játszik fontos szerepet az ERK1/2 aktiválása révén.

A caveolin fehérjecsalád izomspecifikus tagja (M-caveolin) a 151 aminosav hosszúságú **caveolin-3**. Megtalálható harántcsíkolt izomban, simaizomban és szívizomban, mint ezen sejtek caveoláinak fő fehérjéje. Az izomsejtekben a caveolin-3 a szarkolemmában van jelen, ahol az izomspecifikus disztrofin-glikoprotein komplex alkotóeleme (Song et al 1996, Parton és mtsai 1997, Sotgia és mtsai 2000, Galbiati és mtsai 2001). A caveolin-3 szükséges a normális izomműködéshez, hiányában a harántcsíkolt izmok működési zavara alakul ki. Caveolin-3 knock-out egerekben a fehérje hiánya a harántcsíkolt izomdisztrófiát, szívizom hipertrófiát és kardiomiopátia kialakulását eredményezi (Woodman és mtsai 2002).

#### 2.3. A caveolák membránjában jelen lévő egyéb fehérjék, molekulák

Az állandó komponensek mellett számos, a sejt jelátviteli folyamataiban résztvevő, osztódását, differenciálódását szabályozó molekula is kimutatható a caveolákban, melyek a caveola élete során szabadon és dinamikusan beépülhetnek, illetve elhagyhatják ezen vezikulák membránját (Anderson 1998). Ezeknek többsége

glikozil-foszfatidilinozitolhoz kötött (GPI-linked) fehérje, melyek felhalmozásához koleszterinre van szükség (Stahl és Mueller 1995; Rothberg és mtsai 1992, Schenoy-Scaria és mtsai 1994). A caveolák membránjában írták le az inozitol 1,4,5-foszfát receptort (Fujimoto és mtsai 1992), heterotrimer G-fehérjét kötő receptorokat (Chun és mtsai 1994; Dupree és mtsai 1993), valamint többféle GTP-kötő fehérjét is (Chang és mtsai 1994; Lisanti és mtsai 1994). A caveolákban megtalálhatók továbbá a MAP-kináz foszforilációs kaszkád elemei, nem-receptor tirozin kinázok (c-Src kináz) és ezek egyes célmolekulái (Anderson R.G.W 1998, Lisanti és mtsai 1994, Smart és mtsai 1995), szteroid hormonok receptorai (Zhu és Smart 2003), az endoteliális nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) (Rizzo és mtsai 1998), valamint az ATP-dependens kalcium pumpa (Fujimoto 1992). A fent említett molekulák többsége nemcsak a caveolák hidrofób környezete miatt halmozódik fel ezen membrán invaginációkban, hanem a caveolinnal való fehérje-fehérje kölcsönhatás, a caveolinhoz való kötődés irányítja ill. tartja ezeket a molekulákat a caveolákban. A caveolinnal való kapcsolódásában kulcsfontosságú szerepe van a caveolin-1 fehérje N-terminális részén, a membrán közelében található, 40 aminosavból álló caveolin-scaffolding doménnek (l. 3. ábra), amelyet a kapcsolódó molekulák saját caveolin-kötő szekvenciáikkal ismernek fel (Couet és mtsai 1997). A sorrendben caveolin-kötő szekvenciák meghatározott elhelyezkedő aromás aminosavakat tartalmaznak (4. ábra). Ha ebben a fehérjeszakaszban az aminosavakat más aminosavakra cserélik, a caveolin és a fent említett molekulák közötti kapcsolat nem jön létre (Lisanti és mtsai 1994). Mivel a legtöbb esetben a caveolin-kötő szekvencia a molekula katalitikus centrumához közel helyezkedik el, a caveolinhoz való kapcsolódás alloszterikusan gátolja (gátolhatja) az adott fehérje aktivitását (Li és mtsai 1996). A caveolákba akkumulálódó fehérje kötődése a caveolinhoz tehát a fehérjét "kikapcsolt" állapotban tarja, azaz a jelátvitelben szerepet játszó molekula aktivitásának csökkenését (esetleges inaktivációját) eredményezi.



**4. ábra**: Számos fehérje kapcsolódik a caveolin scaffolding doménjéhez caveolin-kötő szekvenciája révén. A caveolin-kötő szekvenciában az aromás és nem aromás aminosavak meghetározott sorrendben helyezkednek el.(Okamoto és mtsai 1998)

A plazmamembrán caveoláinak stabilitázálásában, 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. A cavinoknak 4 típusa ismert: cavin-1, cavin-2, cavin-3 és cavin-4 (Parton és mtsai 2006, Bastini és mtsai 2009, Hansen és mtsa 2009). A cavin-1 a caveolák kialakulását segíti elő, a caveolin caveolákban való felhalmozódásához szükséges (Hill és mtsai 2008). A cavin-2 szabályozza a caveolák tradicionális palack morfológiájának kialakulását, a cavin-3 pedig a caveolák vesicula formájának kialakulásában vesz részt. (Chilow és mtsai 2010). A cavin3 a caveolák lefűződése után is a caveolin-1-hez kötve marad, és szabályozza a caveolák

mikrotubulusok mentén történő vándorlását (Briand et al. 2011). A cavin-4 szívizom és harántcsikolt izom-specifikus forma (Bastini és mtsai 2009). Míg a caveolin heterooligimerek a caveolák burkának belső rétegét alkotják, a cavinok egy külső nagyméretű heterooligomer complexből álló fehérje réteget hoznak létre a caveolák citoszól felöli oldalán (Bastiani és mtsai, 2009; McMahon és mtsai, 2009; Hayer és mtsai 2010). A cavin nem kötődik a caveolin-1-hez, a caveolin hetero-oligomerekhez csak a plazmamembránnál kapcsolódik. A cavin a caveolin-1 által oligomerizált foszfatidil-szerin és koleszterin segítségével épül be a caveolák burkába, így segítve elő a caveolák görbületének kialakulását (Bastini és mtsai 2009, Hansen és Nichols 2010, Hill és mtsai 2008, Liu és Pilch 2008). Cavin hiányában a caveolin a plazmamembrán lipid raftjaiban kimutatható, azonban a jellegzetes caveola struktúra nem alakul ki (Hill és mtsai 2008; Liu és Pilch 2008).

A membránok alakításában, formázásában fontos szerpet játszó BAR (Bin-Amphiphysis-Rvs) fehérje, a PACSIN2 is fontos fehérje komponense a caveoláknak. A PACSIN (más néven syndapin) fehérjecsaládnak három tagja ismert: az idegsejtekre jellemző PACSIN1, a PACSIN2, amely szinte minden sejtben expresszálódik, a PACSIN3 pedig elsősorban izomsejtekbnen fordul elő (Suetsugu 2010, Suetsugu és mtsai 2010). A PACSIN2 számos intracelluláris membránban, így a clathrin-burkos endocitotikus útvonal membrán invaginációkban, compartimentumaiban, plazmamembrán nyúlványokban, filopodiumokban fordul elő (Safari és Suetsugu 2012, Suetsugu és mtsai 2014). A BAR domén fehérjék a membrán negatív töltésű lipidjeihez (foszfatidilinozitol 4,5 bifoszfát) kötödnek. Félkör alakú homodimereket képeznek, helikális struktúrává polimerizálódva süllyednek bele a membrán hidrofób részeibe, íly módon deformálva a membránokat (Forst és mtsai 2008, Shimada és mtsai 2007.) A Bar fehérjék tehát a membránok görbületének kialakításban, és a membránok átszerveződésében játszanak szerepet (Forst és mtsai, 2008, 2009, Suetsugu és mtsai 2010), elengedhetetlenül szükségesek a membránok remodellezéséhez A PACSIN2 kötődik a dinamin SH3 doménjéhez is. A dinamin (egy kis molekulasúlyú GTP-áz, amely a vezikulák lefűződéséhez elengedhetelenül szükséges; l. később) feltehetően PACSIN2 közvetítésével kapcsolódik lefűződő caveolák membránjához (Hansen és mtsai 2011, Koch és mtsai 2012, Senju és mtsai 2011). A PACSIN2 tehát fontos szerepet játszik a caveolák morfogenezisében és a dinamin caveolákhoz való toborzása révén meghatározza, illetve szabályozza azok lefűződését.



**5. ábra:** A caveolák fehérje összetétele. A caveolák alakját meghatározó fő fehérjék a caveolin izoformák (cav1, cav2, cav3), cavinok és a PACSIN2. A caveolák dinmaikájának meghatározásában a dinamin (Dyn2), EHD2 és filamin játszik fontos szerepet (Echarri el mtsa 2015)

## 3. A CAVEOLÁK KELETKEZÉSE

A caveolák kialakulása többlépcsős folyamat, amely a caveolin izoformák szintézisével kezdődik a durva felszínű endoplazmás retikulum riboszómáin. A caveolin oligomerizációja a szintézis után már az endoplazmás retikulumban megkezdődik, ahonnan caveolin oligomerek a Golgi készülékbe transzportálódnak, ahol legalább 3 órán át tartózkodnak (Hayer és mtsai 2010). Az oligomerizáció során az egyedi, egyenként 21 kDa molekulatömegű caveolin-1 fehérjék 14-16 molekulából álló, 350-450 kDa molekulatömegű (8S) homooligomereket képeznek. Az oligomerizáció a caveolin fehérje N-terminális szakaszán elhelyezkedő oligomerizációs domén segíti. A caveolin homooligomerek egymáshoz kapcsolódásában a caveolin fehérje C terminálisának 168-178 aminosavai játszanak fontos szerepet. A caveolin oligomerek egymás mellé rendeződve a caveolák burkát alkotó hosszú filamentumot hoznak létre. Ez a hosszú filamentum spirálisan felcsavarodva kialakítja a fagyasztva tört, mély maratással készült készítményeken megfigyelhető jellegzetes morfológiájú caveola burkot (Fernandez és mtsai 2002, Hayer és mtsai 2010).

A caveola mikrodomének, "caveolar carrier"- ek vagy caveola prekurzorok kialakulása, összeszerelése is a Golgi apparátusban kezdődik. A koleszterinből, szfingolipidekből és glikoszfingolipidekből álló lipid-mag a transz-Golgi régióban jön létre. A caveolák kialakulása a caveolin, és a burok alapját képező lipid raft kapcsolatával kezdődik. A caveolin fehérje középső szakasza, a caveolin transzmembrán doménje (102-134 aminosavak) a lipid raftba süllyed, míg N és C terminális vége a citoplazma felé helyezkedik el. Az így létrejött szerkezetet stabilizálja a caveolin fehérje C-terminális végén 133, 143 és 153 pozícióban található cisztein aminosavak palmitoilációja is (Monier és mtsai 1995), elősegítve a koleszterin és a caveolin-1 kapcsolatát, lehorgonyozva a caveola burkot alkotó filamentumot a membrán mikrodoménjébe (Fernandez 2002., Uittenbogaard 2000).

Azokban a sejtekben, ahol a caveolin-1 és a caveolin-2 együtt expresszálódik lehetséges 300-350 kDa molekulatömegű heterooligomerek kialakulása is (Das és mtsai 1995) Az olyan sejtekben, amelyekben caveolin-1 nem expresszálódik, a caveolin-2 monomer és homodimer formában a Golgi apparátusban akkumulálódik, majd lebomlik (Mora et al 1999, Krajewska és Maslowska 2004). A caveolin-2 önmagában nem alkot homooligomereket és caveolák létrehozására sem képes.

Az elmondottakból jól látható, hogy a caveolák kialakulása már a citoplazmában megkezdődik. A preformált, citoplazmában (a Golgi készülékben) "elkészített" caveolaszerű domének, caveola-prekurzorok épülnek be, olvadnak bele a plazma membránba, ellentétben a clathrin burkos vezikulákkal, amelyek *in situ*, a sejtmembránon alakulnak ki (Okamoto és mtsai 1998, Fra és mtsai 1995, Parton és Simons 1995; Murata és mtsai 1995, Scherer és mtsai 1995, 1997, Ikonen és mtsai 1995)

### 4. A CAVEOLÁK FUNKCIÓJA

Az elmúlt évtizedekben a caveolák morfológiáját, biokémiai felépítését, lehetséges feladatait széles körben tanulmányozták és tanulmányozzák ma is. Az intenzív kutatások ellenére ezen membrán invaginációk funkciója mind a mai napig nem tisztázott. Jelen ismereteink szerint a caveolák meglehetősen heterogén, sejtenként változó feladatot láthatnak el. Számos, alapvető sejtélettani folyamatban vesznek részt, ill. játszanak kitüntetett, kulcsfontosságú szerepet. A caveolák kialakulásának, citoplazmán belüli transzportjának és lefűződésének szabályozott ciklusa a membrán fehérjék és lipidek magasfokon szabályozott turnoverét jelenti. Az irodalmi adatokat összegezve mára már elmondhatjuk, hogy a caveolák a sejtek életfolyamataiban alapvetően kétféle szerepet tölthenek be: i) a hozzájuk időszakosan kapcsolódó molekulák aktivitásának befolyásolása révén jelátviteli központként, mint "signalling organelles" szabályozzák (szabályozhatják) a sejtek jelátviteli folyamatait, differenciálódását, osztódását; ii) a clathrin-burkos vezikulák mellett részt vesznek a sejtek különböző transzportfolyamatainak lebonyolításásban.

# 4.1. A caveolák és caveolin izoformák szerepe a jelátviteli folyamatokban és a daganatos betegségekben

Számos caveolában akkumulálódó fehérje fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban (l. előző fejezet). Ezen molekulák (receptorok, foszforilációs kaszkád tagjai, protein kinázok) a caveolin scaffolding doménjét felismerő caveolin-kötő szekvenciájukkal kapcsolódnak caveolin-1-hez (Krajewska és Maslowska 2004), és dinamikusan, időlegesen épülnek be a caveolák membránjába. A caveolákkal illetve caveolinnal való kapcsolódásuk az egyes sejtekben, egyedi módon, sejttípustól és a sejt adott állapotától függően zajlik. Ennek következményeként a caveolák mint szervező feladatot ellátó központ (signalosoma, signalling organelles) működnek közre a sejt jelátviteli útvonalainak összehangolásában.

Különféle humán daganatok sejtjeiben számos olyan jelátviteli molekula aktiválódását írták le, amelyek egészséges sejtekben a caveolákban, caveolinhoz kötve, tehát inaktív állapotban vannak jelen. Ez a megfigyelés vetette fel annak lehetőségét, expressziója, szintézisének gátlása szerepet játszhat a hogy a caveolin-1 tumorgenezisben és a daganatok túlélésében (Galbati és mtsai 1998). Ezen feltételezés mellett szól az a megfigyelés is, hogy a caveolák nagy számban vannak jelen G0 fázisban lévő, véglegesen differenciált sejtekben. In vitro tenyésztett, transzfektált tumorsejtekben a caveolin-1 fehérje mennyiségének csökkenését, ill. teljes hiányát tapasztalták. Caveolin-1 hiányában a MAP-kináz kaszkád elemei felszabadulnak a gátlás alól, a kináz rendszer által irányított jelátviteli folyamatok felerősödnek, amely végső soron a sejtek korlátlan szaporodásához vezet. A caveolin-1 promoterében c-Myc represszív és p53 responzív elemek jelenlétét mutatták ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a caveolin-1 szintézisét az aktivált onkogének a transzkripció szintjén szabályozzák (Bist és mtsai 1997, Razani és mtsai 2000, Koleske és mtsai 1995, Park és mtsai 2001).

Caveolin-1 túltermeltetése (overexpressziója) után azonban a transzfektált sejtek érzékenyebbé válnak az apoptotikus szignálokra, növekedési ütemük lelassul (Galbiati és mtsai 1998). Egyre több irodalmi adat szól amellett, hogy a caveolin - és maguk a caveolák is - fontos szerepet játszanak a szigorúan szabályozott anti-apoptotikus/proapoptotikus jelátviteli folyamatok egyensúlyának fenntartásában. A caveolin-1 például kölcsönhatásba léphet, és ily módon inaktiválhat számos olyan jelátviteli molekulát (PDGF receptor, foszfatidilinozitol 3-kináz), amelyek szerepet játszanak a "túlélés"/sejtproliferáció folyamatában (Liu és mtsai 1996, Yamamoto és mtsai 1999, Zundel és mtsai 2000). A szfingomielin, amely a ceramid prekurzora, caveolák egyik legfontosabb lipid komponense. A szfingomielint ceramiddá konvertáló enzim, a szfingomielináz, szintén a caveolák mikrodoménjében halmozódik fel (Liu és Anderson

1995). A caveolin-1 túltermelődésének eredményeként a sejtekben a ceramid apoptózist indukál, foszfatidilinozitol 3-kináz függő mechanizmus révén (Zundel és mtsai 2000). Számos *in vivo* vizsgálat, megfigyelés szól amellett, hogy a caveolin-1 expressziójának szabályozása befolyásolja a tumorsejtek túlélését, agressziv növekedését és metasztatikus potenciálját. Előrehaladott prosztata tumorban szenvedő betegeknél a tumoros sejtek fokozott caveolin-1 termelése a tumor metasztázis-készségét növelte (Thomson 2004). A daganatsejtek túlélését biztosító multidrog rezisztencia kialakulásában is fontos szerepet játszik a tumorsejtekben szintetizálódó caveolin, valószínűleg úgy, hogy a caveolin közreműdödésével végbemenő, megnövekedett koleszterin efflux facilitálja zsíroldékony kemoterápiás szerek kipumpálását (Carver és Schnitzer 2003.).

Az endotél sejtek caveoláinak membránjához (acilálás révén) előszeretettel kapcsolódó nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) aktivitását a caveolinhoz való kapcsolódás gátolja. Tumorsejtekben caveolin szintézisének downregulációja az eNOS aktiválódásához vezet, aktivitása elősegíti a tumorszövetet tápláló erek kialakulását, befolyásolja az erek permeabilitásást, így a növekvő tumor ellátását biztosítja (Michel és mtsai 1997, Bucci és mtsai 2000).

Mindezen megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a daganatok életciklusuk során eltérő mennyiségben állítanak elő caveolin fehéjét, annak megfelelően, hogy éppen a lokális növekedés (korlátlan sejtosztódás és angiogenezis), vagy a daganatsejtek túlélése szempontjából fontos metasztázisképzés illetve a multidrog rezisztecia áll előtérben.

Immuncitokémiai vizsgálatok, Western blot, sejtfrakcionálási és siRNS kísérletek eredményei alapján Sanna és mtsai (2007), valamint Chretien és mtsai (2008) igazolták, hogy annak ellenére, hogy mag lokalizációs szignál nincs a caveolinok szerkezetében, a caveolin-1 lehet a sejtmagban is. Petefészek carcinoma sejtekben a caveolin-1 a mag mátrix-szal és a kromatinnal asszociáltan fordul elő, a sejtproliferációs gének promoter régiójához kapcsolódik, és gátolja a ciklinD transzkripcióját (Sanna és mtsai 2007). Arra vonatkozóan, hogy mag lokalizációs szignál hiányában hogyan jut be a caveolin-1 a sejtmagba jelenleg csak hipotézisek vannak. A lipid részecskébe ágyazott caveolin-1 bejuthat a citoplazmába (Liu és mtsai 2002), a koleszterinnel összekapcsolódott caveolin-1 kiválhat a caveolákból, és egyszerű diffúzióval, vagy chaperon fehérjékhez kötődve transzlokálódhat a sejtmagba. A caveolin-1 C-

terminálisán azonosítottak olyan aminosav szekvenciákat, amelyek például a HOXA-5 transzkripciós faktorban is jelen vannak. Ezen aminosav tartalmú szakaszok segíthetik a caveolin-1 fehérje átjutását membránokon (Joliot és mtsai 1997; Uittenbogaard és mtsai 1998).

Immunsejtekben a caveolák alkotásában résztvevő caveolin-1 immunmodulátor szerepet játszik (Chidlow és mtsa 2010), a MKK3/p38 MAPK útvonalon keresztül szabályozza az anti-inflammatorikus citokinek termelődését (Wang és mtsai 2006). A csontvelő eredetű makrofágokban a caveolin-2 a pro-inflammatorikus válasz szabályozásában játszik fontos szerepet az ERK1/2 aktiválása révén (Macekova és mtsai 2015). Caveolin-1 kitűntetett szerepet játszik a gyulladás indukálta, MEK-ERK1/2-Snail-1 dependens hám/mesenchyma átalakulásban (EMT) szabályozásában is (Strippoli és mtsai 2015).

#### 4.2. A caveolák szerepe a sejtek transzportfolyamataiban

#### 4.2.1. Potocitózis

A caveolák történetileg elsőként leírt, ma már erősen vitatott, lassan feledésbe merülő funkciója a potocitózis néven leírt felvételi folyamat (Anderson és mtsai 1998). Anderson elképzelése szerint potocitózis során a sejt több egymást követő lépésből álló folyamattal kisméretű molekulákat, ionokat vesz fel környezetéből (6. ábra). A folyamathoz a caveolák lefűződése nem szükséges. A modell magyarázhatja az 5-metilfolát vagy a kalcium transzportját. A folyamat kezdeti szakaszában a felvételre szánt molekula bekerül egy, az extracelluláris tér irányába nyitott caveola üregébe, majd ott receptorhoz (pl: 5-metil-folát) vagy ioncsatornához kötődik (pl: kalcium). A nyitott caveola ezután záródik, de nem fűződik le. A zárt vezikula belsejében megváltozik a mikrokörnyezet, elsősorban a pH, amely következtében a felvételre szánt molekula disszociál receptoráról és/vagy ioncsatorna nyílik, majd a molekula a citoplazmába áramlik. Az így kiürült caveola újra nyílik, és újabb molekulák felvételére készen áll. A modell jól magyarázza egyes molekulák felvételét, azonban a folyamat egyes részletei (például a nyitás-zárás ciklusa, vagy a felvett molekula membránon keresztüli transzportja) nem ismertek. Az utóbbi években már az irodalomban egyetlen publikációban sem említik a felvételi folyamat ezen formáját.



**6. ábra**. A potocitózis lépései: "nyitott" állapotban aligand a caveolában lévő receptorához kötődik. A caveola bezáródik, a belső milliő megváltozik. Ioncsatorna nyilik, és a kötött ligand disszociálva receptoráról a citoplazmába kerül.

#### 4.2.2. Transzcitózis

A kapillárisok endotélsejtjei gyors és hatékony transzport segítségével juttatnak át anyagokat a kapilláris lumenéből a perikapilláris térbe (Simionescu és mtsai 1972, van Deurs 2003). Ez a folyamat a transzcitózis, amely olyannyira jellemző a caveolákban gazdag endotélsejtekre, hogy az endotélsejtek caveoláit e megfigyelés alapján Palade transzcitotikus vezikuláknak nevezte el. Az endotél sejtek caveoláinak membránjában számos olyan molekula van jelen (NSF, SNAP, VAMP), melyek lehetővé teszik a vezikulák rövid ideig tartó fúzióját, és így egy transzcitotikus csatorna létrejöttét (Schnitzer és mtsai, 1995, Predescu és mtsai, 2001). A transzportra szánt anyag, például albumin felvétele után a rakományával terhes caveola egy, a "csatárláncban" következő caveolába (egyes elméletek szerint endoszómába) üríti tartalmát. Az albumin további transzportját egy kapcsolódó caveola, vagy az endoszómáról a perikapilláris tér irányába lefűződő vezikula biztosítja (7. ábra).

Az igen hatékony, gyors anyagtranszportot az teszi lehetővé, hogy az endotélsejtek igen laposak, így kevés számú caveola is elégséges e transzportút kialakításához (van Deurs 2003). A korlátlan anyagtranszportnak egy vékony szűrőszerkezet, a caveolák felszínhez közeli szűkületénél elhelyezkedő diafragma szab határt, a specifikus, gyors anyagáramlást azonban lehetővé teszi a (Radu 2005)



7. ábra: A transzcitózis során a caveolák sejten keresztüli gyors anyagáramlást tesznek lehetővé. A lefűződött caveolák csatárláncot alkotva egy olyan csatornát alakítanak ki, amely áthidalja a sejtet. Egyes elképzelések szerint a caveolák által felvett molekulák endoszómák közbeiktatásával kerülhetnek át az endotél sejtek bazolaterális felszínére.

# 4.2.3. Lipidek és fehérjék irányított transzportja az apikális és basolaterális membránokhoz

A polarizált hámsejtek apikális és bazolaterális felszíne egymástól jelentősen eltérő lipid-, és fehérje-összetételű membránokkal rendelkezik (Drubin és Nelson 1996). Az apikális membránfelszín akár háromszor nagyobb mennyiségben tartalmazhat GPI-kötött fehérjét, koleszterint, glikolipideket, glikoszfingolipidet, mint a bazolaterális felszín (Ali és Evans 1990, Wilson és mtsai 1990). Az eltérő lipidösszetétel feltételezhetően az apikális membrán számára védelmet biztosít a környezeti hatásokkal szemben. A megfelelő összetétel kialakítását, fenntartását egy elosztó mechanizmus biztosítja, melynek központja a transz-Golgi hálózat (Mostov és mtsai 1992, Matter és Mellman 1994, Le Gall 1995). Itt alakulnak ki azok a szortírozó vezikulumok, melyek tartalmazzák az apikális, valamint a bazolaterális membrán fehérjéit és lipidjeit (Kurchalia és mtsai 1992). Biokémiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a szortírozó feladat ezen transzportvezikulumok membránjában található caveolin izoformák jelenlététől függ. A Golgi készülékben oligomerizálódott caveolin-1 és caveolin-2 tartalmú

heterooligomerek a transzportvezikulumokat a transz-Golgi hálózatból a sejt bazolaterális felszíne felé írányítják, míg a csak caveolin-1 fehérjéből álló homooligomer tartalmú membrán mikrodomének az apikális plazmamembránba épülnek be (Scheiffele és mtsai 1998, Parolini és mtsai 1999). Ezekben a membrán mikrodoménekben már megtalálhatóak az apikális illetve a basolaterális membránra jellemző arányú lipid-, és fehérjekomponensek. Mindezek alapján elmondható, hogy az apikális és bazolaterális membrán eltérő membránösszetételének kialakítását és fenntartását a polarizált sejtekben caveolin tartalmú membrán domének és vezikulumai biztosítják.

#### 4.2.4. Koleszterin homeosztázis

A koleszterin a caveolák burkának nélkülözhetetlen alkotóeleme. A caveolát alkotó fehérje és a koleszterin kapcsolata szabályozott fehérje-lipid kapcsolat eredménye. A caveolin-1 fehérje igen nagy affinitással köt koleszterint (Murata és mtsai 1995). A sejt koleszterin tartalma ugyanakkor befolyásolja a caveolin-1 expresszióját és a plazmamembrán caveolák számát. Ha a sejtekben megnövekszik a koleszterin mennyisége, a caveolin-1 mRNS szint emelkedése tapasztalható (Fielding és Fielding 1997). Koleszterinkötő ágensekkel, vagy a koleszterin oxidációjával drasztikusan csökkenthető a caveolin-1 szintézis, valamint a sejtfelszíni caveolák száma (Zhu és mtsai 1999.)

A koleszterin sejten belüli koncentrációját egy szenzor-effektor mechanizmus biztosítja, mely szigorú transzkripciós szabályozás alatt áll. (van Meer 2001). Egyre több adat szól amellett, hogy a caveolák aktiv szerepet játszanak a koleszterin homeosztázis fenntartásában. A caveolin mint koleszterin-szenzor funkcionál, és ily módon számos sejtfunkciót modulál, befolyásolva a koleszterin felvételét, leadását, szintézisét, valamint intracelluláris transzportját. Az endoplazmás retikulumban illetve a peroxiszómákban *de novo* szintetizálódott, valmint a clathrin burkos vezikulák közreműködésével felvett alacsony denzitású lipoproteinből (LDL) származó koleszterint caveolin oligomereket tartalmazó vezikulák szállítják a plazmamembránhoz (Uttenbogaard és Smart 2000). A sejt intracelluláris koleszterin tartalma a koleszterin szintézisért felelős enzimek, illetve a koleszterin felvételért felelős sejtfelszíni LDL

receptorok mennyiségének függvénye. Ha a sejtekben magas a koleszterin szint, egy transzkripciós faktor, a *sterol responsive element binding protein (SREBP)* inaktív, a caveolin-1 bioszintézise nő, fokozódik a koleszterin efflux (Fielding és Fielding 2000). Ha a koleszterin koncentrációja csökken, a SREBP gátolja a caveolin expresszióját (a SREBP mint destabilizáló faktor kötődik a caveolin-1 promoteréhez), ugyanakkor fokozza a *de novo* koleszterin szintézis enzimeinek, és az LDL receptorának transzkripcióját. A downregulációban szerepe van a foszforilációs kaszkád aktiválódásának. A caveolin-1 gén promoteréhez kötődő E2F, p53 és az Sp1 traszkripciós-faktor komplex fokozza a transzkripciót. Az E2F foszforilációja destabilizálja a komplexet, ily módon gátolja, leállítja a transzkripciót (Fielding és Fielding 2000).

A koleszterin transzportját az intracelluláris organellumokból az extracelluláris koleszterin-kötő makromolekulákhoz is caveolák segítik, ebben az esetben a caveolin apolipoprotein feladatot lát el, elősegítve a leadásra szánt koleszterin beépülését a szállításért felelős magas denzitású lipoproteinbe (HDL) (Matveev és mtsai 2001).

#### 4.2.5. A caveolák, mint alternatív endocitotikus struktúrák

#### a.) A caveolák lefűződése

A caveolák működésével kapcsolatosan a legvitatotabb, legkevésbé tisztázott terület a felvételi folyamatokban, endocitózisben betöltött szerepük volt. A caveolák változó görbületű megjelenése azt sugallja, hogy a caveolák lefűződhetnek a sejtfelszínről. Ennek ellenére sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a caveolák a sejtmembrán állandó, stabil, nem lefűződő, speciális összetételű mikrodoménjei. Morfológiai (sorozatmetszés, kettős jelöléses immuncitokémia) és biokémiai vizsgálatok eredményei (saját munkánkat is beleértve) mára már egyértelműen bizonyították, hogy a caveolák lefűződnek, illetve lefűződhetnek a sejtmembránról, és a clathrin-burkos vezikulák mellett részt vesznek, illetve részt vehetnek az különböző extracelluláris anyagok felvételében (Pelkmans és mtsai 2004, Kiss és Geuze 1997, Kiss és Botos 2009). Bizonyított tény, hogy a sejtek caveolák segítségével vesznek fel számos ligandot (I.táblázat), például GPI-kötött fehérjéket, albumint, vírusokat,

immunkomplexeket, bakteriális toxinokat, (Pelkmans and Helenius 2002.), alkalikus foszfatázokat (Montesano és mtsai 1982, Anderson és mntsai 1998, Parton és mtsai 1994).

Caveola-mediált endocitózis lépéseit a Simian Vírus 40 (SV40) felvétele kapcsán tanulmányozták, és írták le (Pelkmans és mtsai 2001, Pelkmans és Helenius 2002). A vírus internalizációja annyira caveola-specifikus, hogy caveolin-1 hiányos állatokban SV40 fertőzés nem jön létre, a vírusrészecskék felvétele caveolák hiányában elmarad (Pelkmans és mtsai 2001). Az SV40 vírus a sejtek felszínén található MHCI molekulához kapcsolódik. A vírusrészecske-MHCI kapcsolat kialakulása után a komplex caveolába kerül, és a caveola lefűződésével megindul a vírus internalizációja (8. ábra).



8. ábra: Az SV40 vírus felvétele során a vírus a sejt felszínén MHC I. molekulához kötődik, majd a komplex caveolába kerül (1.). A vírus indukálta jelátviteli folyamatok eredményeként a caveolin-1 foszforilálódik (2., 3.), majd dinamin kapcsolódik a caveola nyaki részéhez, ezt követi a kortikális aktin-citoszkeleton átrendeződése. Ennek eredménye az aktin-farok kialakulása (4.), amely a plazmamembránról lefűződő caveolát a citoplazmába húzza (5.). Ezután a kortikális aktinhálózat visszarendeződik (6.) (Pelkmans és Helenius 2002.)

## I. táblázat

A caveolák illetve lipid raftok által felvett anyagok listája. (Pelkmans és Helenius, 2002. alapján)

	Receptor vagy adaptor	Indukció	Caveola	Clathrin-		
			vagy	burkos		
			lipid raft	vezikula		
Ligandok						
Folát	Folát receptor (GPI-kötött)	igen	++	+		
Albumin	gp60 (transzmembrán)	igen	++	+		
Autocrine motility	AMF receptor	nem ismert	++	+		
factor (AMF)	(transzmembrán)					
Interleukin-2 (IL-2)	IL-2 receptor (transzmembrán)	nem ismert	++	-		
Membrán-alkotók						
Alkalikus foszfatáz	GPI-kötött	igen	++	-		
GPI-GFP	GPI-kötött	nem ismert	++	-		
Lactosyl ceramid	glicoszfingolpipd	igen	++	-		
Toxinok						
Koleratoxin		nem ismert	++	+		
Tetanusz toxin	GPI-kötött	nem ismert	++	-		
Vírusok						
Simian vírus 40 (SV40)	MHC I. (transzmembrán)	igen	++	-		
Polyoma vírus	sziálsav, GM1 gangliozid	nem ismert	++	-		
Echovírus 1	integrin	nem ismert	+	Nem		
				ismert		
Respiratory syncytial	nem ismert	nem ismert	+	Nem		
vírus (RSV)				ismert		
Baktériumok						
az E.coli FimH	CD68 (GPI-kötött)	igen	++	-		
antigénje						

A caveolák lefűződése lassú folyamat. Míg a calthrin-burkos vezikulák lefűződésének ideje néhány percet vesz igénybe, addig a vírusrészecskék kapcsolódása és a caveolák lefűződése közt eltelt idő 15-30 perc.

A caveolák stabilizálásában egy aktin-kötő fehérje, a filamin fontos szerepet játszik, kapcsolatot létesítve az kortikális citoszkeleton aktin filamentumai és a caveolin-1 között (Stalhut és van Deurs 2000, van Deur és mtsai 2003, Echarri és mtsa 2015). Az aktin caveolákat stabilizáló szerepét bizonyítja az is, hogy depolimerizációját eredményező citokalazin-D kezelést követően a caveolák laterális mobilitása a plazmamembránban megnövekszik, és a caveolák internalizácója gátlódik. Az SV40 vírus felvétele során Pelkmans és mtsai (2002) megfigyelték, hogy a caveolin-1 tirozin foszforilációjával egyidőben a kortikális aktin hálózat átrendeződik (8. ábra). A rakományával töltött caveola citoplazma felé néző felszínéhez kapcsoltan egy aktin "farok" alakul ki, mely mintegy mélybe húzza a lefűződni készülő caveolát. A caveola internalizációja után az eredeti aktin hálózat visszarendeződik (Pelkmans és Helenius 2002). Az aktin-citoszkeleton tehát kettős szerepet tölt be a caveolák életében: egyrészt plazmamembránnal való kapcsolattal stabilizálja őket, másrészt elősegíti a lefűződésüket. A plazmamembrán stabil caveolái és a dinamikus, lefűződő caveolák mennyisége között egyensúly van, amely igen fontos a caveolákhoz köthető feladatok megfelelő összehangolásában. A lefűződő caveolák endocitózisban vesznek részt, míg a nem lefűződő, immobilis caveolák jelátviteli funkciók ellátásáért felelősek (Stahlhut és van Deurs 2000).

Az utóbbi években egyre több adat szól amellett, hogy a caveola-mediált endocitózis szabályozásában a caveolák burkához kapcsolódó fehérjék foszforilációs módosításának kiemelt szerepe van. Smart és munkatársai (1995) a caveolák membránjában leírtak egy 90 kDa molekulatömegű fehérjét, amely az ugyancsak caveolákban jelenlévő szerin-treonin kináz, a protein kinázCα (PKCα) szubsztrátja. Feltételezésük szerint a caveolák internalizációs ciklusa, lefűződése és reciklizációja ezen 90 kDa molekulatömegű fehérje foszforiláltsági állapotának a függvénye. A caveolák lefűződéséhez a 90 kDA molekulatömegű fehérje foszforilációja szükséges.

Az internalizáció megindulásával. párhuzamosan a PKCα aktivitása csökken, teret engedve a defoszforilációt végző foszfatázoknak. A fehérje defoszforilációja

következtében a caveola reciklizál a felszíni membránhoz. Az elképzelés hiányossága, hogy mind a mai napig nem sikerült azonosítani ezt a 90 kDa molekulatömegű fehérjét.

A foszforiláció szerepét a caveolák lefűződésében okadánsavval végzett kísérletek (köztük saját eredményeink) is alátámasztják. Az okadánsav foszfatáz gátló, a szerin/treonin foszfatáz 1-et (PP1), és a szerin/treonin protein foszfatáz 2-t (PP2) gátolja, koncentráció-függő módon (Wera és Hemmings 1995, Boland és mtsai 1993). Smart (és mtsai 1995). Parton (és mtsai 1994) okadánsavval a caveolák intenzív lefűződését indukálták. Mivel azonban az okadánsav a szerin/treonin foszfatázok gátlása révén számos jelátviteli útvonalat befolyásol a sejtben, nem ismert, hogy a caveola-mediált endocitózist, a caveolák lefűződését pontosan milyen mechanizmus(ok) révén indukálja.

A caveolák internalizációjának egyik fontos lépése a *dinamin* átmeneti kapcsolódása a caveolák nyaki részéhez (Oh és mtsai 1998). A dinamin kis molekulasúlyú GTP-áz, melynek a vezikulák lefűződésében betöltött szerepe a clathrinmediált endocitózis folyamatából már ismert (Hinshaw 2000). A citoplazmában jelenlévő dinamin molekulák GDP-t kötött formában egymás után kapcsolódnak a caveolák keskeny nyaki részéhez, amelynek eredményeként egy dinamin oligomerekből álló "gallér" jön létre. A dinamin ebben az oligomer "gallérban" az oligomerizáció hatására aktiválódik, GTP-kötő és hidrolizáló képessége nő. Az oligomerizáció egy kritikus szintje után a dinaminhoz kötött GTP hidrolizál, a GTP hidrolíziséből származó energia fedezi a caveola nyaki részén a membrán zárását, így megindul a caveola lefűződése a plazmamembránról.

Az utóbbi évtized intenzív kutatómunkájának köszönhetően a caveolák internalizációjának megindulásához szükséges biokémiai változások finomabb részleteit már elég jól ismerjük. Endotélsejtekben az albumin felvételének tanulmányozása során Minshal (és mtsai 2003), valamint Shajahan (és mtsai 2004) leírták, hogy az albumin egy, a caveolákban jelenlévő adapter molekulához, 60kDa molekulatömegű glikoproteinhez (gp60-hoz) kötődik. A gp60-albumin kapcsolat G fehérje aktiválódását eredményezi (9. ábra). Az aktivált G fehérje disszociáló  $\beta$  és  $\gamma$  alegységei a caveolin-1 fehérjéhez kapcsolódó tirozin-kinázt, az Src kinázt aktiválják, amely foszforilálja a caveolin-1 fehérjét, illetve a caveola nyaki részéhez kapcsolódó dinamint. Az albumin és a gp60 fehérje kapcsolatának kialakulását követően a fent említett folyamatok nagyon gyorsan (5 perc) lejátszódnak (Shajahan és mtsai 2004).



**9. ábra:** A caveolák internalizációját elindító jelátviteli folyamatokat az albumin és adaptor molekulájának, a gp60 fehérjének kapcsolata aktiválja. Az aktivált Src kináz a dinamin és a caveolin-1 fehérjéket tirozin aminosavon foszforilálja. A caveolin tirozin foszforilációja a caveolák lefűződését indukálja. (Minshall és mtsai 2003.)

A caveolák lefűződésének szabályozásában a PACSIN2-EHD2 -cavin complex játszik szabályozó szerepet (EHD2 a dinaminhoz hasonló ATP-áz). A PACSIN2 aszparaginprolin-fenilalanin aminosavszekvenciája közvetítésével EDH2-höz kapcsolódva a caveolákat membrán-kötött állapotban tartja. A PACSIN2 a C terminálisán elhelyezkedő SH3 doménjén keresztül dinamint is képes kötni, ezáltal a dinamint a caveolák nyakához toborozza. Bár a lefűződéshez elengedhetetlenül szükséges dinamin molekulák jelen vannak a caveolák nyakánál, a PACSIN2 molekulák szorosan összecsomagolt Bar doménjei miatt nincs hozzáférésük a membránhoz. Ha azonban a PACSIN2-t a PKC $\alpha$  foszforilálja, a szorosan csomagolt Bar domén oligomerek fellazulnak, a PACSIN-membrán kapcsolat fellazul, lehetővé téve azt, hogy a dinamin elhasítsa a membránt, a caveolák lefűződhessenek. (Senju és mtsai 2015). A PACSIN2-EHD2-cavin1 komplex tehát esszeciális szerepet játszik a caveolák dinamikájában. A PACSIN2 mennyisége, jelenléte a caveolák nyakánál meghatározó lépése, faktora a caveolák lefűződésének illetve endocitózisának. A caveolák endocitózisát a sejtek extracelluláris mátrixhoz (ECM) való kapcsolódása is befolyásolja. Ha a sejt-extracelluláris kapcsolat fellazul, a caveolin-1 (caveolák) a plazmamembránról a perinukleáris térbe helyeződnek át.

#### b.) A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai

A caveolák közreműködésével végbemenő felvételi útvonal citoplazmatikus állomásairól intenziv kutatásuk ellenére sokáig bizonytalan információink voltak. Kísérleti adatok amellett szólnak, hogy a lefűződött caveolák megőrzik jellegzetes morfológiai és biokémiai sajátságaikat az endocitózis során (Pelkmans és mtsai 2004), membránjuk nem olvad bele a környező membránokba. Pelkmans és mtsai (2002) az SV40 vírus felvételének tanulmányozása során azt tapasztalták, hogy a vírust tartalmazó caveolák nagyméretű, vakuolumokba olvadnak bele, amelyek sem nem endoszómák, sem nem a lizoszómák. Ezen nagyméretű vakuolumokat caveoszómáknak nevezték el, minthogy membránjukban caveolin-1 van jelen, belsejükben pedig caveola méretű vezikulák figyelhetők meg. A caveoszómák a caveola-mediált endocitózis jellegzetes, a mai napig is csak kevéssé ismert organellumai. Morfológiájuk alapján igen heterogén struktúrák: szőlőfürtre emlékeztető, zsúfolt csoportba rendezett vezikula-halmok formájában, hosszúkás, fűzérbe rendezett vezikulák csoportjaként ("borsók a hüvelyben" Pelkmans, és Helenius 2002), vagy virág alakú ovális rozetta-szerű képletekként láthatóak a citoplazma plazmamembránhoz közeli területein. A sejtben betöltött szerepük alapján a klasszikus, clathrin-mediált endocitózisban megismert korai endoszómákkal egyenértékű képleteknek tartották őket, a korai endoszómák morfológiai és biokémiai jellemzőivel azonban nem rendelkeznek. (Pelkmans és Helenius 2002.). A caveoszómákban nem mutathatók ki a clathrin burkos vezikulák által felvett ligandok és azok receptorai, mint például a transzferin és a transzferinreceptor.

A caveoszómák membránjának *molekuláris összetétele* nagymértékben hasonlít a caveolák membránjához: igen gazdag koleszterinben és szfingomielinben. A membránból azonban hiányoznak az endoszómákra, lizoszómákra, a Golgi apparátusra, illetve az endoplazmás retikulumra jellemző specifikus molekula-markerek, tulajdonképpen a caveolin-1 tekinthető ezen sejtalkotók egyetlen markerének. A

caveoszómák membránjában nincs jelen a plazmamembránra és az endoszómák membránjára jellemző protonpumpa, így belső milliője nem savasodik. Pelkmans és Helenius (2002) elképzelése szerint a neutrális caveoszóma nem képes a savas bennékű lizoszómákkal való fúzióra, így tartalmát a savas hidrolázok nem emészthetik meg. A caveoszómák a caveolák intrenalizációját követő 15 perc elteltével jelennek meg a citoplazmában, és a felvett ligandok akár több órán át is itt tárolódhatnak (Pelkmans és Helenius 2002).

Bár vonzó feltételezés, hogy azok a kórokozók, melyek caveolák közreműködésével kerülnek felvételre, fertőző képességüket éppen azáltal fejthetik ki, hogy a semleges caveoszómákba kerülve a lizoszómális enzimek lebontó, hidrolizáló hatása alól megmenekülnek, morfológiai és biokémiai jellemzőik alapján azonban kérdéses, hogy a caveoszómák valóban önálló, a sejtmembránról lefűződött sejtalkotóke. Ha léteznek is ezen organellumok, kevés adat áll rendelkezésünkre a caveoszómák további, sejten belüli sorsára vonatkozóan is. A caveoszómákba kerülő egyes ligandok a felvételt követő néhány óra után az endoplazmás retikulumba szállítódnak (SV40 vírus) (Pelkmans és mtsai 2001), míg mások, például a ceramid (Nichols és mtsai 2001), vagy éppen a GPI fehérjék (Puri és mtsai 2001) a Golgi készülékbe kerülnek. Kérdés, hogy a caveoszómák kizárólagosan a caveolák közreműködésével végbemenő felvétel citoplazmatikus állomásai, a klasszikus endocitotikus útvonaltól eltérő felvételi folyamat jellegzetes organellumai-e. Az utóbbi időben egyre több adat szól amellett, hogy a caveolák, illetve caveoszómák és a korai endoszómák képesek fúzionálni egymással, így a caveolák által felvett ligandok is a korai endoszómákba kerülhetnek (Parton és Simons 2007). Nem teljesen ismert azonban, hogy a clathrin-mediált endocitózis és a caveola-mediált útvonal intracelluláris organellumai valóban kapcsolatba kerülnek-e egymással, és ha igen, milyen tényezők szabályozzák, szabályozhatják a "párbeszédet".

Amíg a caveolák lefűződésében az aktin filamentumok átrendeződése játszik fontos szerepet, a mikrotubulusok a caveolin-1 pozitív vezikulák szortírozását (szállítását az egyes sejtkompartimentumok felé ill.a reciklizációját) szabályozzák. A motor molekulák, amelyek a caveolin-1 pozitív vezikulákat a mikrotubulusokhoz kapcsolják azonban jelenleg még nem ismertek.

#### 4.2.6. A caveolák, mint mechanoszenzitív membrán invaginációk.

A caveolák számos seitben szoros kapcsolatban állnak а stressz filamenetumokkal. A caveolák kialakulását, sejten belüli mozgását a stressz filamentumok regulátorai jelentősen befolyásolják. A caveolák részt vesznek a RhoA irányította aktomiozin kontrakcióban, és más mechanoszenzitív mechanizmusokban. Az utóbbi évek kísérleti eredményei igazolták, hogy mechanikai nyújtásra, vagy ozmotikus térfogatváltozásra (duzzadásra) a plazmamembrán caveolái laposabbá válnak (Kozera és mtsai 2009; Gervasio és mtsai 2011), sőt mechanikai stressz hatására el is tűnnek a plazmamembránról (Sinha és mtsai 2011). Sekélyebb, laposabb caveolák figyelhetők meg a plazmamembránon akkor is, ha a membrán tenzió fokozódására a stressz filamentumok igen nagy számban jelennek meg a citoplazmában a plazmamembrán közelében (Echarri és mtsai 2012).

Ezen adatok alapján számos kutató úgy véli, hogy a caveolák nyomást, nyomás változásokat pufferoló rendszert képviselnek a plazmamembránon. A caveolák a stressz filamentumokhoz való kapcsolódásuk révén, nyomásváltozások alatt, lokálisan regulálják a stressz filamentumokkal kapcsolatos jelátviteli útvonalakat (elsősorban a RhoA jelátvitelt), molekuláris kapcsolatot biztosítva a mechanotranszdukciós utak és az aktin-irányította változások között. Ilyen módon biztosítják a sejtek stressz-tűrő képességét, anélkül, hogy a membrán integritása megváltozna (Echarri és mtsai 215).

## 5. CÉLKITŰZÉSEK

A caveolákkal foglalkozó szakirodalomban hosszú ideig tartotta magát az az álláspont, hogy az immunsejtek felszinén nincsenek jelen a caveolák. Limfocitákon végzett vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a limfoid sejtek valóban nem expresszálnak caveolin izoformákat, és sejtfelszinükön nincsenek caveolák. Heterogén caveolin mRNS injektálása után azonban a limfociták plazmamembránján is megjelennek ezen jellegzetes morfológiájú membrán invaginációk (Fra és mtsai 1995), jelezvén, hogy kialakulásuk feltétele a caveolin expressziója. Kutatómunkát hosszú évek óta sejtbiológiai témában végzek, kísérleti objektumként patkányok hasüregéből izolált. peritoneális makrofágokat használok. А ún. makrofágok az immunfolyamatokban fontos szerepet játszó mononukleáris fagocita-rendszer heterogén képviselői, amelyek különböző forrásból származhatnak (Ginsel és mtsai 1985, 1986, Ginsel 1993), és a szervezetben különböző aktivitási állapotban jelenhetnek meg. Az eltérő környezeti hatások eredményeként háromféle aktivitási állapotban fordulhatnak elő: rezidens/exudált, elicitált és aktivált makrofágokról beszélhetünk (van Furth és mtsai 1972, van Furth 1988). Kísérletes munkám magkezdésekor arra vonatkozóan, hogy a professzionális fagocita sejtekben, a makrofágokban vannak-e caveolák, egyáltalán nem voltak adatok.

1.) Munkám során *első lépésben* tehát vizsgálni kívántam, hogy az immunfolyamatokban fontos szerepet játszó makrofágok sejtfelszinén a clathrin burkos vezikulák mellett jelen vannak-e más plazmamembrán invaginációk, caveolákra emlékeztető strukturák, és ha igen, a makrofágok aktivitási állapotának változása befolyásolja-e a plazmamembránon megjelenő vezikulák, membrán invaginációk számát, illetve sejtfelszini eloszlását.

2.) Ha a caveolákra emlékeztető struktúrák jelen vannak a makrofágok plazmamembránján, kérdés, hogy ezek a palack- ill. omega alakú membránbefűződések valóban caveolák-e. A caveolák jelenlétét a caveolin-1 kimutatásával lehet igazolni. Ebből a célból anti-caveolin-1 ellenanyaggal fagyasztott ultravékony metszeteken elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatokat kívántam elvégezni. Miután a caveolák megjelenéséhez, kialakulásához a caveolin-1 expressziója elengedhetetlenül szükséges, vizsgálni kívántam, hogy a peritoneális makrofágok

milyen caveolin izoformákat expresszálnak. Arra kerestem választ, hogy a caveolák hiánya és megjelenése patkány peritoneális makrofágokban milyen izoformák hiányával, ill. jelenlétével magyarázható, és változik-e az egyes izoformák expressziója a makrofágok aktivitási állapotának függvényében.

3.) A caveolák sokrétű funkciói közül érdeklődésem középpontjában az endocitózisban betöltött szerepük áll. *Kisérletes munkám megkezdésekor ellentétes irodalmi adatok álltak rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy vajon a caveolák a sejtmembránon jelenlévő, speciális összetételű, rigid, merev domének, avagy más vezikulákhoz hasonlóan a plazmamembránról valóban lefűződő, dinamikus strukturák.* Kísérleteim során tehát arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a patkányok hasüregéből izolált, endocitózisra specializálódott, professzionális fagocita sejtek, a makrofágok caveolái lefűződnek-e a sejtmembránról, részt vesznek-e a makrofágok endocitotikus (folyadék fázisos és receptor-mediált) folyamataiban.

4.) Ha a caveolák valóban lefűződnek a plazmamembránról, a következő kérdés, hogy *milyen szabályozó mechanizmusok (foszforiláció/defoszforiláció, kinázok/foszfatázok) befolyásolják a caveolák lefűződését,* internalizációját és esetleges reciklizációját. Irodalomból ismert volt, hogy a szerint/treonin protein foszfatázgátló okadánsav más sejtekben a caveolák lefűződését indukálja. Vizsgálni kívántam, hogy az okadánsav hatással van-e a caveolák lefűződésére makrofágokban. Tekintettel arra, hogy a valójában a caveolin-1 tirozin foszforilációja játszik kulcs szerepet a caveolák lefűződésében, a kérdés az volt, hogy változik-e, és ha igen, hogyan az egyes caveolin izoformák tirozin foszforilációja az okadánsav 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 fiziológiás viszonyok között, az élő szervezetben végbemenő folyamatokra. A HepG2 sejtvonal azonban csak akkor alkamazható további kérdéseink megválaszolására, ha a makrofágokon elvégzett kezelések hasonló hatást váltanak ki ezen sejteken is. Ezért első lépésben tehát az internalizáció vizsgálatát és az okadánsav kezeléseket HepG2 sejteken is el kellett végeznem.

5.) A caveolák közreműködésével végbemenő felvétel indukálására a HepG2 sejteken okadánsav mellett egy tirozin-foszfatáz gátlót, a nátrium-ortovanadátot, valamint egy fiziológiás ligandot, az albumint használtam. Ezek a vizsgálatok lehetőséget adnak annak tanulmányozására, hogy milyen azonosságok és/vagy különbségek vannak a kétféle anyag, – erős, sokrétű hatással bíró ágensek (foszfatáz gátlók) és a természetes ligand (albumin) – által indukált caveola internalizáció folyamatában. Okadánsavval és tirozin-foszfatáz gátlóval elvégzett kísérleteim eredményei igazolhatják, hogy a *caveolin foszforilációja befolyásol(hat)ja-e, és ha igen, hogyan a caveolák lefűződését, internalizációját.* 

6.) Tekintettel arra, hogy a caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásairól igen keveset tudunk, vizsgáltaim középpontjában az állt, hogy a caveolák által felvételre került ligand, illetve maga a caveolin milyen intracelluláris struktúrák érintésével vándorol a sejtben. Ebből a célból a folyadék fázisos (HRPO) és receptor-mediált endocitózis (PAP és albumin felvétel) folyamatát vizsgálatam és hasonlítottam össze rezidens és elicitált makrofágokban, valamint HepG2 sejtekben. *Kiemelt figyelmet szenteltem annak, hogy van-e kapcsolat a caveolák közreműködésével végbemenő endocitózis és a klasszikus (clathrin-burkos vezikulák közreműködésével végbemenő) felvételi folyamat sejten belüli állomásai között, vagyis hogy a caveola-mediált endocitózis végállomásai valóban a caveoszómáknak nevezett struktúrák-e. A kérdést fagyasztott ultravékony metszeteken kettős jelöléses immuncitokémiai vizsgálatokkal kívántam megválaszolni.* 

7.) Az ún. caveoszómák kizárólagos markere a caveolin-1, morfológiájuk, elhelyezkedésük alapján azonban önálló sejtalkotó létük megkérdőjelezhető. A Ruténium vörös festék - amely pozitív töltése révén a glikokalixhoz kötödik, nem jut át a membránon - mint extracelluláris marker, kiválóan alkalmas a setjfelszin, és a sejtfelszinnel összeköttetésben álló struktúrák jelölésére. Munkám következő

37

szakaszában Ruténium-vörös festék alkalmazásával vizsgálni kívántam azt, hogy a caveoszóma néven leírt kompartimentumok valóban önálló citoplazmatikus struktúrák-e, avagy a sejtfelszínnel összeköttetésben álló rozetta-szerű caveola-csoportok.

8.) Ha a caveolák valóban internalizálódnak, és a klasszikus endocitotikus útvonalon esetleg degradálódnak, kérdés, hogy a plazmamembránon újonnan megjelenő caveolák pótlása i.) citoplazmatikus caveola-raktárakból, ii.) az előzetesen internalizált caveolák reciklizációjából történik-e, iii.) avagy *de novo* caveolin szintézis révén megy végbe. A kérdés megválaszolására fehérjeszintézist gátló cikloheximid kezeléseket végeztem, és sejtfrakcionálás után biokémiai módszerrel (Western blot) vizsgáltam a különböző membránfrakciókban megjelenő caveolin-1 mennyiségét.

# 6. ANYAG ÉS MÓDSZER

# 6.1. Sejtek

# 6.1.1. Makrofágok

Kísérleteimet 200-250 gramm súlyú Charles River hím patkányok hasüregéből foszfát pufferes mosással izolált makrofágokon végeztem. *Rezidens* makrofágokat egészséges, kezeletlen állatok hasüregéből nyertünk (~10<sup>5</sup>sejt/ml/állat). *Elicitált* makrofágokat az 1 ml komplett Freund adjuváns intraperitoneális injektálása után 24 órával izoláltunk (~10<sup>7</sup>sejt/ml/állat). A kezeletlen és a komplett Freund adjuvánssal kezelt állatok hasüregéből vegyes peritoneális sejtszuszpenziót 0,1M foszfátpufferrel (pH:7,4) (PBS) végzett mosással nyertünk, melyből diszkontinuus Percoll grádiensen (100% Percoll szuszpenzió és 10-szer tömény HAMF-10 9:1 elegye 1M HEPES pufferben) makrofágokat tisztítottunk Hester és munkatársai (1981) módszere alapján. 30 perces (330g) centrifugálás után az 51/57%-os Percoll határfázison kiülepedő makrofágokat összegyűjtöttük és PBS-el mostuk.

#### 6.1.2. HepG2 sejtek

A humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonal sejtjeit (HepG2 sejtek, ATCC: HB8065), Dr. Kovalszky Ilona (I. sz. Pathológiai és Kísérletes Rákkutató Intézet) biztosította számunkra. A sejteket 10% FBS (Gibco), 100 U/ml Penicillin és 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma) tartalmú DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco) tenyésztői médiumban tenyésztettük. Hagyományos elektronmikroszkópos beágyazáshoz, illetve fagyasztva metszéshez a sejteket T25 tenyésztői edényekben (Orange) tenyésztettük. Fluorescens mikroszkópos munkákhoz a sejteket 12mm átmérőjű fedőlemezeken neveltük. Biokémiai vizsgálatokhoz T75 tenyésztői edényben (Orange), illetve membránizoláláshoz 100mm átmérőjű tenyésztői csészében (Orange) nevelt sejteket használtunk.

# 6.2. Anyagok

A caveolák internalizációjának stimulálásához a szerin-treonin foszfatáz gátló okadánsavat (Sigma Chemical Co.) 4 és 100nM, a tirozin-foszfatáz gátló nátriumortovanadátot (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) (Sigma Chemical Co.) pedig 10µM koncentrációban használtuk. végzett Makrofágokkal kísérleteink során az internalizáció nyomonkövetésére folyadékfázisos markerként 800µg/ml tormaperoxidázt (HRP; Sigma Chemical Co., type VI.) használtunk. A receptor-mediált endocitózist peroxidázantiperoxidáz (PAP) immunkomplex felvételével vizsgáltuk. A sejtfelszini caveolák eltávolítására a makrofágokat 0.5 µg/ml filipinnel kezeltük. HepG2 sejtekben a caveolamediált endocitózist 30mg/ml albumin (serum albumin - fraction V., 98% pure, Sigma Chemical Co.) inkubációjával provokáltuk. A sejtfelszinnel összeköttetésben álló strukturákat Ruténium-(Ru) vörös festékkel (Sigma Chemical Co) jelöltük. A fehérjeszintézist 50µg/ml cycloheximiddel, (Sigma Chemical Co) albumin jelenlétében (60 illetve 180 perc, 37°C) gátoltuk.

# 6.3. Ellenanyagok és fluoreszcens próbák

*Immunfluoreszcens* vizsgálatainkhoz első ellenanyagként poliklonális caveolin-1 és monoklonális caveolin-2 ellenanyagot (Transduction Laboratories), második ellenanyagként biotinált anti-egér ellenanyagot (Vector) alkalmaztunk. Az ellenanyagok kimutatását anti-nyúl Alexa 488nm, illetve avidin-konjugált Alexa 594nm fluorescens festékekkel (Molecular Probes) végeztük. Az aktin citoszkeleton jelölését phalloidinkonjugált Alexa 594nm (Molecular Probes) fluorescens festékkel végeztük.

*Fagyasztott ultravékony metszeteinken elvégzett immun-arany jelölés*hez első ellenanyagként poliklonális anti-VIP21/ caveolin (Prof. Rob Parton, Heidelberg, személyes ajándéka), poliklonális anti-caveolin-1 (Transduction Laboratories), poliklonális anti-albumin (Nordic Laboratories), illetve monoklonális anti-CD63 ellenanyagot (Peli-Cluster), második ellenanyagként nyúl anti-egér ellenanyagot (Calbiochem) alkalmaztunk. Az immunoreaktív fehérjéket 10nm illetve 15nm átmérőjű kolloidális arannyal jelölt protein-A segítségével mutattuk ki (Cell Microscopy Center, Utrecht).

Biokémiai vizsgálataink során (immunoprecipitáció, detergensmentes membránizolálás valamint Western blot analízis) első ellenanyagként poliklonális anti-caveolin-1, illetve anti-caveolin-2 ellenanyagokat monoklonális (Transduction Laboratories), monoklonális anti-syndecan (CD138) (Dako Laboratories), valamint monoklonális antifoszfotirozin ellenanyagot (Upstate Biotechnology) használtunk. Második ellenanyagként biotinált anti-nyúl illetve biotinált anti-egér ellenanyagokat (Vector Laboratories) alkalmaztunk.

# 6.4. Kísérleti eljárások

#### 6.4.1. Vizsgálatok makrofágokon

#### 6.4.1.1. Caveolák kimutatása, caveolin izoformák azonosítása

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

Hagyományos elektronmikroszkópos technika: Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz a sejteket 0.1M Millonig foszfát pufferben (pH:7,6) higított 2% glutáraldehiddel fixáltuk (2 óra, szobahőmérsékleten). A fixálót alapos Millonig pufferes mosással eltávolítottuk, majd a sejtszuszpenzióból 10% zselatin (37C°) hozzáadásával, centrifugálással tömör blokkokat formáltunk. A sejteket tartalmazó zselatin-blokkokat apró darabokra vágtuk, 0.1M cacodilát pufferben (pH:7,4) mostuk, és 1% OsO4-el 60 percig 4C°-on utófixáltuk. Ezt követően 0.1M cacodilát pufferrel, majd desztillált vízzel mostuk a blokkokat. A blokk-kontrasztozást 1% uranil-acetáttal végeztük (60 perc, 4C°, sötétben). Desztillált vizes mosás után a blokkokat növekvő koncentrációjú víztelenítettünk, Araldit alkoholsorral majd műgyantába ágyaztuk. Leica ultramikrommal 50-80 nm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket uranilacetáttal (10 perc), majd ólom-nitráttal (10 perc) kontrasztoztuk és Opton illetve Hitachi elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

*Morfometriai vizsgálatok*: A caveolák számának és sejtfelszini eloszlásának meghatározása céljából morfometriai vizsgálatokat végeztünk. Valamennyi kisérleti csoportból 20-25 elektronmikroszkópos felvételt készitettünk. A felvételeket egyforma nagyitással (20 000x) és random módon készitettük. A felszinnel összeköttetésben álló clathrin-burkos vezikulákat, és omega alakú plazmamembrán invaginációkat megszámoltuk, átmérőjüket megmértük. A citoplazma felszín/térfogat arányát Weibel (és mtsai 1966) módszerével meghatároztuk, majd kiszámoltuk a sejtfelszin egységnyi területére jutó vezikulumok, invaginációk számát.

*Fénymikroszkópos (konfokális) immuncitokémiai vizsgálatok:* Izolált rezidens és elicitált makrofágokat polilizinnel kezelt tárgylemezre letapasztottuk, majd jéghideg acetonnal (20 másodperc) a sejteket fixáltuk, ill. permeabilizáltuk. 0.1% BSA tartalmú PBS-el a sejteket mostuk, majd monoklonális anti-caveolin-1 és anti-caveolin-2 ellenanyaggal (1% BSA/PBS) 1 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk, Alapos mosás (PBS) után FITC-el jelölt anti-egér ill. anti-nyúl ellenanyaggal (1% BSA/PBS) további 1 órát inkubáltunk szobahőmérsékleten. Alapos mosás után a sejteket MRC 1024 Bio-Rad lézer konfokál mikroszkóppal vizsgáltuk, a Lasersharp 4.0 software alkalmazásával.

Elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok: A peritoneális makrofágokat 4% parpaformaldehid és 0.1% glutáraldehid fixáló elegyben (0.1M foszfát pufferben) 1 órát szobahőmérsékleten fixáltuk, majd ezt a fixálót 1% paraformaldehid (0.1M foszfát pufferben) fixálóra cseréltük, amelyben a sejteket néháy napig tartottuk, tovább fixáltuk. 0.15M glicin tartalmú PBS-el való háromszori mosás után a sejteket 10% zselatinban centrifugáltuk, az így keletkezett csapadékból kisméretű kockákat vágtunk, amelyeket 2.3M cukor (0.1M foszfát pufferben) oldattal itattunk át (1 óra 4C<sup>0</sup>) krioportekció céljából. A blokkokat ezután preparátum tartóra felragasztottuk, és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Fagyasztott ultravékony metszeteket Leica Ultracut S fagyasztófeltétes ultramikrotómmal készítettünk. Az ultravékony metszeteken immuncitokémiai reakciót végeztünk: mosás, 10% szérum albuminnal (BSA) való blokkolás után a metszeteken anti-caveolin-1/VIP21 poliklonális, illetve monoklonális anti-caveolin-1 és anti-caveolin-2 ellenanyaggal inkubáltunk (1 óra szobahőmérsékleten). A monoklonális ellenanyagokkal kezelt metszeteken második

ellenanyagként nyúl-anti-egér IgG-t használtunk (30 perc, szobahőmérsékleten), majd a sejteket 10 ill 15nm kolloidális arannyal konjugált proteinA-val inkubáltuk (30 perc, szobahőmérsékleten).

Néhány esetben a fagyasztott ultravékony metszeteken kettős jelölést alkalmaztunk. Kettős jelöléses vizsgálataink során a szérum albumint nyúlban termeltetett anti-patkány albumin ellenanyaggal jelöltük, illetve a tormaperoxidázt anti-HRP (nyúl) ellenyaggal mutattuk ki. Mindkét esetben második ellenanyagként 10nm kolloidális arannyal konjugált proteinA-t használtunk. A VIP/21caveolin-1 kimutatására nyúl anti-VIP21 ellenanyaggal, majd 5nm kolloidális arannyal jelölt proteinA-val inkubáltunk.

*Western blot analizis*: Izolált rezidens és elicitált makrofágokat 1% SDS-t és 2.5% βmerkaptoetanolt tartalmazó 20nM Tris-HCl (pH: 7.4) oldatban szolubilizáltuk, és 4-5 percig forraltuk. A lizátum fehérjetartalmát Lowry-módszerrel határoztuk meg, majd grádiens (8-12%) SDS-PAGE elektroforézissel a fehérjéket szétválasztottuk (30µg fehérjét használtunk minden elektroforézis esetén). A szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz filterre transzferáltuk, majd 3% BSA tartalmú Tween-PBS pufferrel blokkolást végeztünk. Ezt követően anti-caveolin-1 és anti-caveolin-2 ellenanyagokkal inkubáltunk. Második ellenanyagként tormaperoxidázzal jelölt anti-nyúl ill. anti-egér IgG-t használtunk. ECL detektálás után az eredményeket a GelScan program alklamazásával, LKB lézer denzitométerrel értékeltük.

*Immunprecipitáció*: Rezidens és elicitált makrofágokat ( $10^7$ sejt/ml) 200ml szolubilizáló pufferben (50mM Tris-HCl, pH:7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mm NaF, 10% glicerin, 0.5% Monidet P40, 01mMK PMSF, 10µg/ml aprotinin) szuszpendáltuk, majd a lizátumot anti-caveolin-1 ill. anti-caveolin-2 specifikus ellenanyaggal inkubáltuk (5 óra, 4C<sup>0</sup>). Protein-A-Sepharose 4B jelenlétében immunkomplex képződést indukáltunk (1 óra, 4C<sup>0</sup>), majd az immunkomplexet centrifugálással (12 000g) izoláltuk. Mosás után a kötött fehérjét szolubilizáltuk, majd SDS-PAGE elektroforézist követően immunoblottinggal aqnalizáltuk.

*RT-PCR analízis*: Izolált rezidens és elicitált makrofágokból guanidin-tiocianáttal és fenol-kloroform-izoamilalkohollal teljes RNS kivonást végeztünk (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 1.7

felett). Az RNS-ből random primerek és 200U M-MLV segítségével reverz transzkripciót végeztünk. A cDNS-t polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk. A caveolin primereket az NIH könyvtárában hozzáférhető patkány caveolin szekvenciára Primer-2 program segítségével terveztük. Belső kontrolként a glükóz-aldehidfoszfát-dehidrogenáz (GAPGH) expresszióját használtuk. A PCR reakciót hot starttal, a reakcióelegy 94C<sup>0</sup>-on történő 5 perces inkubálásával inditottuk. A ciklus (n=35) paraméterei a következők voltak: denaturáció 94C<sup>0</sup>, 1 perc, annealing 55C<sup>0</sup>, 1 perc, lánchosszabbítás 72C<sup>0</sup>, 1 perc.

#### 6.4.1.2. A caveolák lefűződésének, internalizációjának vizsgálata

A makrofágok felvételi folyamatokra, endocitózisra differenciálódott sejtféleségek. Annak eldöntésére, hogy a caveolák lefűződnek-e a peritoneális makrofágok membránjáról, funkcionális vizsgálatokat végeztünk. Rezidens és elicitált makrofágok folyadék fázisos és receptor-mediált endocitózisát vizsgáltuk 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.

*Folyadék fázisos endocitózis*: Izolált rezidens és elicitált makrofágokat (8x10<sup>5</sup> sejt/ml) 2mg/ml HRP jelenlétében (szérum-mentes HAMF-10, pH: 7.0) 37C<sup>0</sup>-on különböző ideig (30 másodperc, 1, 2 és 5 perc) inkubáltuk. A folyadék fázisos felvétel leállítására a sejteket lehűtöttük, a fel nem vett peroxidázt jéghideg PBS-el történő alapos mosással eltávolítottuk. 1% glutáraldehidet (Millonig foszfát pufferben) használtunk a sejtek fixálására. 30 perces fixálás után (szobahőmérsékleten) Millonig, majd Tris-HCl (pH:7.4) pufferrel mostuk a sejteket. A peroxidáz kimutatására diaminobenzidin (DAB) reakciót használtunk (Kiss és Röhlich 1984). A DAB reakcióhoz 0.02g DAB-t 50 ml PBS-ben oldottuk, illetve közvetlenül a reakció előtt 100µl 1%-os Hyperol oldatot adtunk a reakcióelegyhez. A reakcióeleggyel való inkubálást 5 percig, sötétben végeztük. A DAB reakciót követően Tris-HCl pufferes (0.05M pH: 7.6), majd 0.1M-os kakodilát pufferes (pH: 7.4) mosást végeztünk. Ezt követően ismételt Tris-HCl és kakodilát pufferes mosás után 1% OsO<sub>4</sub>-oldattal utófixáltunk, a sejtszuszpenzióból 10%-os (37C°) zselatin felhasználásával blokkokat formáltunk, melyeket Araldit műgyantába ágyaztunk.

*Receptor-mediált endocitózis*: Rezidens és elicitált makrofágokat ( $8x10^5$  sejt/ml) szérum-mentes HAMF-10 médiumban oldott  $50\mu$ g/ml PAP immunkomplex jelenlétében 1 órát  $4C^0$ -on inkubáltuk. A nem specifikusan kötött ligandot foszfát pufferes mosással ( $4C^0$ ) távolítottuk el, majd a sejteket  $37C^0$ -ra felmelegítettük. Az internalizációt 30 másodperc, 1, 2 és 5 perc után 2% glutáraldehidben (Millonig foszfát pufferben) való fixálással állítottuk le. Mosás, majd DAB reakció után a sejteket dehidráltuk és aralditba ágyaztuk (l. fent).

*Enzim kimutatás: az internalizált HRP kvantitatív meghatározása:* A sejtek által felvett HRP ill. PAP mennyiségét spektrofotometriás módszerrel (Steimnan és Cohn 1972) határoztuk meg. Meghatározott idejű internalizáció után a sejteket 10% Triton-X és ultrahangos kezeléssel szolubilizáltuk. A peroxidázt o-dianizidin segítségével mutattuk ki. Az enzimreakció termékének abszorbanciáját spektrofotométerrel, 435nm hullámhossznál mértük.

*Filipin kezelés:* elicitált makrofágokat (8x10<sup>5</sup> sejt/ml) szérum-mentes HAMF-10 médiumban oldott 0.5µg/ml filipinnel kezeltük 10, 30 és 60 percig. Hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken és fagyasztott ultravékony metszeteken morfometriai analízissel ellenőriztük, hogy a filipin kezelés hatására változik-e a sejtfelszinen jelenlévő a caveolák száma.

A filipin előkezelt sejtek folyadék fázisos (HRP felvétel) ill. receptor-mediált endocitózisát (PAP felvétel) vizsgáltuk, kvantitativ spektrofotometriai méréssel meghatároztuk a felvett HRP ill. PAP mennyiségét. A sejteket 0.5µg/ml filipinnel 30 percig 37C<sup>0</sup>-on előinkubáltuk, majd a megfelelő marker (2mg/ml HRP; 50µg/ml PAP) jelenlétében különböző ideig inkubáltuk. Az internalizáció leállítása után a felvett markerek mennyiségét, az HRP enzimreakció elvégzése után, spektrofotometriás módszerrel (l. fent) határoztuk meg.

45

A caveolák internalizációjának szabályozása: Ebben a kísérlet-sorozatban azt vizsgáltam, hogy a foszfatázok gátlása milyen hatással van a caveolák lefűződésére, ill. esetleges internalizációjára. Foszfatáz-gátlóként egy szerin/treonin foszfatáz gátlót, az okadánsavat használtunk 4 ill. 100nM koncentrációban, amelyet borjú savó tartalmú DMEM tenyésztői médiumban oldottuk, majd 30, 60 ill 90 perc 37C<sup>0</sup> (tenvésztői inkubálás után а médiumban. tenyésztőfülkében) sejteket hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatokra beágyaztuk. Az elektronmikroszkópos felvételeken morfometriai módszerekkel ellnőriztem a sejtfeszinen jelenlévő caveolák számának változását. Annak eldöntésére, hogy a caveolák valóban lefűződtek a sejtfelszínről Ruvörös festéket használtam, amellyel a sejtfeszínnel összeköttetésben álló stuktúrák jól jelölhetők. Ebből a célból olyan fixáló oldatot, mosó puffereket, és utófixáló OsO4 oldatot használtam, amelyben 0.4 mg/ml Ru vöröst oldottunk (l. lent).

Hagyományos elektronmikroszkópos és kvantitativ (spektrofotometriás) módszerrel vizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációjú (4 és 100 nM) okadánsav hatással van-e a rezidens és elicitált makrofágok HRP felvételére. A sejteket 10%FBS tartalmú DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) tenyésztői médiumban, 60mm átmérőjű tenyésztői edényekben 4 illetve 100nM okadánsav jelenlétében 30 percig, 37C°-on inkubáltuk. A folyadék fázisos felvételi folyamatok vizsgálatához 800µg/ml tormaperoxidázt alkalmaztam, amelyet okadánsavval végzett előinkubációt követően okadánsav jelenlétében adtam a sejtszuszpenzióhoz (30 perc, 37C°). Az internalizációs kísérleteket PBS-es mosással állítottuk le. A sejtek egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára beágyaztuk. A felszínnel kapcsolatban álló struktúrák jelölésére Ruténium-vörös (lásd fent) festéket használtunk. Morfológiai vizsgálataimat morfometriai méréssel egészítettem ki. Az internalizált tormaperoxidáz mennyiségét spektrométerrel határoztam meg (lásd fent). A caveolin izoformák foszforilációját immunprecipitációt követő immunblot módszerrel ellenőriztem. Ellenanyagként antifoszfotirozint használtam.

*A sejtfelszín jelölése Ruténium-vörössel:* A sejtfelszínnel kapcsolatban álló struktúrák jelölésére extracelluláris markerként Ruténium-vörös (Sigma Chemical Co) festéket használtam. A sejteket alapos 0.1M PBS-es mosás után Millonig pufferben (pH: 7.6) higított, 0.4 mg/ml Ruténium-vörös tartalmú 2% glutáraldehiddel 2 órán át,

dc\_1278\_16

szobahőmérsékleten fixáltam. A fixálást követően 0.1M-os cacodilát pufferrel mosást végeztem, majd a sejteket 0.4 mg/ml Ruténium-vöröst, 2%-os OsO<sub>4</sub>-t tartalmazó 0.1M kakodilát pufferben utófixáltam. Az utófixálást követően a sejteket zselatinnal kezeltem, majd beágyaztam a fent leírtak szerint.

#### 6.4.2. Vizsgálatok HepG2 sejteken

HepG2 sejtekben a caveolák internalizációjának stimulálására szerin/treoninfoszfatáz gátló okadánsavat, tirozin-foszfatáz gátló nátrium-ortovanadátot és egy természetes ligandot, az albumint használtunk. A sejteket 4 illetve 100nM szerin/treonin-foszfatáz gátló okadánsavval (30 perc, 37C°), ill. 10µM tirozin-foszfatáz gátló nátrium-ortovanadáttal (15 perc, 37C°) inkubáltam. Kísérleteim egy részében 10µM nátrium-ortovanadáttal előinkubációt végeztem (15 perc, 37°C), majd nátriumortovanadát jelenlétében további 15 percig 30mg/ml albuminnal kezeltem a sejteket. Tekintettel arra, hogy az albumin a caveolák lefűződését önmagában is indukálja, a HepG2 sejteket 30mg/ml albumin tartalmú médiumban 15, 60 és 180 percig (37C°) inkubáltam. Egyes kísérleteinkben a fehérjeszintézis gátlására 30mg/ml albumin jelenlétében 50µg/ml cycloheximidet alkalmaztam, a sejteket 60 illetve 180 percig 37C°-on inkubáltam. Kísérleteimet albuminmentes médiummal történő mosással állítottuk le.

Eredményeimet morfológiai (fénymikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok illetve elektronmikroszkópia) és biokémiai módszerekkel (detergensmentes membránizolálás és Western blot analízis) nyertem.

### 6.4.2.1. Morfológiai vizsgálatok

*Fénymikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok:* Immunfluoreszcens, konfokális mikroszkópos megfigyelésekhez fedőlemezre tapadt HepG2 sejteket okadánsavval, nátrium-ortovanadáttal illetve albuminnal kezeltem a fent leírtak szerint. A kísérleteket követően 0.1M foszfátpufferben (pH: 7.4) 4% paraformaldehiddel 2 órát fixáltam, majd a fixálót PBS-es mosással eltávolítottam. Triton-X 100-al végzett permeabilizálást követően a caveolák jelölésére 1%BSA/PBS-ben higított anti-caveolin-1 (1:200) illetve

anti-caveolin-2 (1:100) ellenanyaggal immunjelölést végeztem (2h, 4C°), majd PBS-es mosás után a specifikusan kötött anti-caveolin-1 ellenanyagot 1%BSA tartalmú PBSben higított anti-nyúl-Alexa 488nm fluorescens festékkel (1:200) (2h, 4C°) tettem láthatóvá. Anti-caveolin-2 ellenanyaggal történt jelölést követően második ellenanyagként 1%BSA/PBS-ben higított biotinált anti-egér ellenanyagot (1:100) (2h, 4C°), majd PBS-es mosást követően 1%BSA/PBS-ben higított avidin-konjugált Alexa 594nm vagy 488nm fluorescens festéket (1:200) (2h, 4C°) alkalmaztam. Az aktin citoszkeleton jelölésére 1%BSA/PBS-ben higított phalloidin konjugált Alexa 594nm (1:100) került felhasználásra (2h, 4C°). A flourescens felvételek Bio-Rad Radiance2100 Rainbow konfokális mikroszkóppal, Laser Sharp software alkalmazásával készültek. További képszerkesztéshez Confocal Assistant és Adobe Photoshop programokat használtam.

Hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatok: Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz a sejteket 0.1M Millonig foszfát pufferben (pH:7,6) higított 2% glutáraldehiddel fixáltam (2 óra, szobahőmérsékleten). A fixálót alapos Millonig pufferes mosással eltávolítottam, majd a sejtszuszpenzióból 10% zselatin (37C°) hozzáadásával, centrifugálással tömör blokkokat formáltam. A sejteket tartalmazó zselatin-blokkokat apró darabokra vágtam, 0.1M cacodilát pufferben (pH:7,4) mostam, és 1% OsO<sub>4</sub>-el 60 percig 4C°-on utófixáltam. Ezt követően cacodilát pufferrel, majd desztillált vízzel mostam a blokkokat. A blokk-kontrasztozást 1% uranil-acetáttal végeztem (60 perc, 4C°, sötétben). Desztillált vizes mosás után a blokkokat növekvő koncentrációjú alkoholsorral víztelenítettem, majd Araldit műgyantába ágyaztam. Leica ultramikrommal 50-80 nm vastagságú metszeteket készítettem, melyeket uranil-acetáttal (10 perc) majd ólom-nitráttal (10 perc) kontrasztoztam és Opton illetve Hitachi elektronmikroszkóppal vizsgáltam (l. fent).

*Elektronmikroszkópos immuncitokémia:* Fagyasztott ultravékony metszetek készítéséhez a sejteket a tenyésztőedényben 4% parafomaldehidben (0.1M foszfátpuffer, pH:7.4), 24 órán át fixáltam, majd 0.05M glicin tartalmú foszfátpufferel a fixálót eltávolítottam. A tenyésztői edényben letapadt sejteket 37C°-os, 1% zselatin tartalmú foszfát pufferben óvatosan felkapartam, majd a fixálót foszfátpufferes mosással

A sejtszuszpenzióból ezt követően 10%. 37C<sup>o</sup> zselatinban eltávolítottam. centrifugálással blokkokat formáltam, majd a zselatin-blokkokat apró darabokra vágtam. A fagyasztás során keletkező jégkristályok kialakulásának megakadályozására a blokkokat 2.3M cukorral átitattam (minimum 4 óra, 4C°), majd alumínium mintatartóra helyezve folyékony nitrogénben lefagyasztottam. A metszeteket Leica Ultracut S ultramikrotommal (Bécs, Ausztria) készítettem (Slot és mtsai, 1991, Liou és mtsai, 1996). A metszeteken végzett immun-arany jelöléshez 1%BSA/PBS-ben higított anti-caveolin-1 ellenanyagot (1:100), anti-albumin ellenanyagot (1:600) és anti-CD63 ellenanyagot (1:150) alkalmaztam. Az immunoreaktív fehérjéket PBS-ben higított 10 (1:60) illetve 15 nm (1:65) átmérőjű kolloidális arannyal konjugált protein-A-val mutattam ki. A metszeteket uranil-oxaláttal (pH:7) illetve metilcellulózban higított uranil-acetáttal (pH:4.0) 5-5 percig kontrasztoztam, és Jeol illetve Hitachi elektronmikroszkópban vizsgáltam.

#### 6.4.2.2. Biokémiai vizsgálatok

*Immunoprecipitáció és Western blot analízis*: Az immunoprecipitációhoz minden kísérleti csoportból 10<sup>7</sup>/ml sejtet használtunk. A megfelelő kezelések után a sejteket lízispufferben (l. fent) feloldottuk. A lizátumot anti-caveolin-1 illetve anti-caveolin-2 jelenlétében 5 órán át 4C°-on inkubáltuk. Protein-A-Sepharose 4B alkalmazásával további 1 órás inkubáció után keletkező immunkomplexeket a lízispufferben 4-5 alkalommal ismételt szétválasztottuk. Az immunoprecipitátumból 10-30 µg mennyiségű fehérjét 10% SDS gélen futtatunk, majd nitrocellulóz membránra blottoltunk. Blottanalízishez anti-caveolin-1 (1:250) vagy anti-caveolin-2 (1:250) ellenanyagokat használtunk. A precipitátumok foszfotirozin tartalmának vizsgálatához a 10-30µg mintát 10%-os SDS gélre rétegeztük, majd blottolást követően a nitrocellulóz membránt anti-foszfotirozin (1:500) ellenanyaggal inkubáltuk.

*Detergens-mentes membrán izolálás:* A HepG2 sejteket 100mm átmérőjű petricsészében neveltük. Minden egyes kísérleti csoportban 10 petricsészényi, konfluens sejttenyészetet használtunk. A plazmamembrán és az intracelluláris membrán frakciókat Smart (1995) és Conrad (1995) módszere alapján nyertük. A sejteket 4C° hőmérsékletű

homogenizáló pufferrel mostuk (0.25M szacharóz, 1mM EDTA, 20mM Tricine, pH: 7.8), majd teflon homogenizálóban homogenizáltuk. A homogenizált sejteket 23ml homogenizáló pufferben higított, 30%-os Percollra rétegeztük és VAC602 ultracentrifugában 84 000g-vel, 30 percig, 4C°-on centrifugáltuk. A centrifugálást követően a 30%-os Percollban a homogenizátum két frakcióra vált szét. A könnyebb frakcióban a plazmamembrán, a nehezebb frakcióban a citoplazmatikus membránok (endoplazmás retikulum, Golgi apparátus, endoszómák illetve lizoszómák) vannak jelen. A membrán-izolátumok fehérjetartalmát Bio-Rad Bradford Assay segítségével határoztuk meg, majd 50µg/ml mennyiségű fehérjetartalmú membránfrakciót 10% SDS gélre rétegeztünk. Blottolás után anti-caveolin-1 (1:500) ellenanyagot ezt követően biotinált-anti–nyúl ellenanyagot (1:500) illetve egy integráns membránfehérje, a syndecan (CD138) ellen termeltetett monoklonális anti-syndecan ellenanyagot (1:500), valamint biotinált anti-egér (1:500) ellenanyagot használtunk. Az immunoreaktív fehérjéket NovaRED Substrate Kit (Vector) segítségével tettük láthatóvá.

*Morfometriai vizsgálatok:* Minden kísérleti csoportból (kontrol, okadánsavval, illetve 60 és 180 perc albuminnal kezelt sejtek) 20-25, véletlenszerűen kiválasztott elektronmikroszkópos kép (nagyítás 20 000x) felhasználásával morfometriai analízist végeztem. A sejtfelszínnel kapcsolatban álló (egyes esetekben Ruthenium-vörössel jelölt), omega alakú képleteket, valamint a lefűződött, caveola-méretű vezikulákat számláltam. Az egységnyi citoplazmára számított felszín/térfogat arányt Weibel és mtsi (1966) módszere szerint számítottam.

Fagyasztott ultravékony metszeteken végzett immun-arany jelölés után vizsgáltam a caveolin-1 és caveolin-2 eloszlását az okadánsavval illetve albuminnal kezelt sejteken. A plazmamembránnal összeköttetésben álló caveolák membránjában, illetve a citoplazma organellumaiban jelenlévő aranyszemcsék számát az összes aranyszemcse számához viszonyítottam. Különleges figyelmet fordítottam azokra az anti-CD63 ellenanyaggal jelölt, morfológiailag késői endoszómaként azonosítható sejtalkotókra, melyekben a caveolin-1 detektálható. Az anti-caveolin-1 és anti-CD63 ellenanyagokkal kettősen jelölt késői endoszómák, és a csak anti-CD63 ellenanyaggal jelölt késői endoszómák számát hasonlítottam össze. Morfometriai eredményeimet statisztikailag a StatSoft Statistica 6.1. software felhasználásával elemeztük.

50

# 7. EREDMÉNYEK

# 7.1. Vizsgálatok makrofágokon

## 7.1.1. Elicitált makrofágok morfológiája

Annak eldöntésére, hogy a makrofágok aktivitási állapotának változása vezikulák befolyásolja-e а sejtfelszini számát és eloszlását részletes elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. 24 órás elicitálás (Freund adjuváns intraperitoneális injektálása) a peritoneális sejtek számát jelentős mértékben növelte: az adjuvánssal nem kezelt patkányok hasüregéből 10<sup>5</sup> sejt izolálható milliliterenként, ezzel szemben 1 ml adjuvánssal kezelt állatok hasüregének mosásával nyerhető sejtek száma 10<sup>7</sup>/ml. Az elicitált makrofágok elektronmikroszkópos vizsgálata során megállapítottuk, hogy ezen sejtek ultrastruktúrája, morfológiája lényegében megegyezik a rezidens sejtek morfológiájával. A Golgi készülék környezetében kisméretű, kerek, ill. hosszúkás, endogén peroxidáz aktivitást mutató vezikulákat figyeltem meg, azonban a durva felszinű endoplazmás retikulum ciszternáiban, a perinukleáris ciszternákban, és a Golgi készülék ciszternáiban ill. vezikuláiban endogén peroxidázt soha nem detektáltunk. Néhány esetben az endocitált adjuváns lipid cseppjeit tartalmazó nagy méretű vakuolumszerű struktúrákat találtunk a citoplazmában.

A clathrin-burkos vezikulák (d=0.10μm) mind a rezidens mind pedig az elicitált makrofágok membránján jelen vannak (10. ábra). Morfometriai eredményeink azt mutatják, hogy számuk elicitálás hatására nem változik (11. ábra). Makrofágok sejtfelszínének alapos vizsgálatával azonban megállapíthatjuk, hogy egy másik, a clathrin burkos vezikuláknál lényegesen kisebb átmérőjű (d=0.09μm), vezikula-populáció is megfigyelhető a plazmamembránon. Ezen vezikulák könnyen azonosíthatók a jellegzetes omega ill. palackra emlékeztető morfológiájuk alapján. Ezen omega- ill. palack-alakú membrán invaginációk a rezidens makrofágok sejtfelszínén is megtalálhatók (10. A ábra), elicitált plazmamembránján azonban igen

nagy számban jelennek meg (10. B ábra). Morfológiai megfigyelésünket morfometriai vizsgálataink kvantitatív adatokkal támasztják alá (11. B ábra).



**10. ábra: Rezidens (A) és elicitált (B) makrofág citoplazmájának részlete.** *A.) A clathrin-burkos vezikulumok nagy számban vannak jelen a sejtmembránon ill. annak közelében (nyilak). Kisebb méretű, omega alakú vezikulák (nyilfejek) szintén megfigyelhetők a sejtmembránon. B.) Az omega alakú membrán invaginációk igen nagy számban vannak jelen az elicitált sejtek membránján. Bar: 0.5µm* 



**11. ábra:** Clathrin burkos vezikulák (üres oszlopok) és a caveolák (sötét oszlopok) száma és méreteloszlása rezidens (A) és elicitált (B) makrofágokban. (N/coated: clathrin burkos vezikulák szám; N/cav: caveola-szerű strukrúrák száma)

#### 7.1.2. Caveolák, caveolin izoformák azonosítása makrofágokban

A makrofágok sejfelszínén jelenlévő palack-ill. omega alakú membrán invaginációk méretük és morfológiájuk alapján nagyon hasonlóak más sejtekben (endotél, simaizom, fibroblaszt, zsírsejt) leírt caveolákhoz. Annak eldöntésére, hogy ezen invaginációk valóban caveolák, fagyasztott ultravékony metszeteken caveolin kimutatást végeztünk, anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyag alkalmazásával. Az antigénhez kötött ellenanyagot kolloidális arannyal jelölt második ellenanyaggal (protein-A)-val azonosítottuk. A 12. ábrán, elicitált makrofág sejtfeszínéről készült kis (A) és nagy nagyítású (B) felvételen, a felszínnel összeköttetésben álló invaginációk membránjában jól láthatók a caveolin-1 jelenlétére utaló aranyszemcsék. Tekintettel arra, hogy a caveolák a caveolin-1 jelenlétével egyértelműen azonosíthatók, megállapíthatjuk, hogy a makrofágok omega alakú invaginációi valóban caveolák. A clathrin-coated vezikulák caveolin-1 elleni ellenanyaggal nem jelölődnek, ugyanakkor azonban a citoplazmában jelenlévő, lefűződött vezikula benyomását keltő kompartimentumok membránjában is megfigyelhetők az aranyszemcsék.

A rezidens és az elicitált makrofágokban előforduló caveolin izoformák azonosítására Western blot analízist és immunprecipitációt alkalmaztunk. Kontrolként szívizomés simaizomsejtek lizátumát használtunk. Anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyaggal kétféle, - egy ~ 20kDa és ~29kDa molekulatömegű - fehéjét tudtunk specifikusan jelölni. Rezidens makrofágokban csak kis mennyiségben fordul elő a ~20kDa molekulatömegű, anti-VIP21/caveolinnal jelölődő fehérje, ezzel szemben igen nagy mennyiségben van jelen a ~29kDa molekulatömegű fehérje (13. ábra R1, R2). Úgy tűnik, hogy ez a ~29 kDa tömegű fehérje a rezidens makrofágokra jellemző fehérje Elicitálás hatására a caveolin-1 (~20 kDa) izoforma expressziója jelentősen megnőtt (13. ábra E1, E2), ugyanakkor azonban a ~29 kDa fehérje is kimutatható ezekben a sejtekben. Rezidens makrofágokban anti-caveolin-2 ellenanyag csak a ~29 kDa fehérjével lépett reakcióba (14. A ábra). Immunprecipitációt követő immunoblot analízis eredményei azt mutatják, hogy csak a ~29 kDa molekulatömegű fehérje immunprecipitálódott az



12. ábra: VIP21/caveolin-1 immuncitokémiaia kimutatáse fagyasztott ultravékony metszetekek. A.) A felszinnel összeköttetésben álló omega alakú membrán invaginációk (nagyméretű nyilak) anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyaggal jelölődnek. Számos lefűződött vezikulumnak tűnő struktúra is VIP21/caveolin-1 pozitív (nyilfejek). A clathrin burkos vezikulumok membránján (kisméretű nyilak) jelölést nem találtunk. B.) A plazmamembránnal összeköttetésben álló vezikulumok nagyobb nagyitású képe. Bar: A.): 0.25µm; B.): 0.1 µm

anti-caveolin-2 ellenanyaggal, és az immunprecipitátum anti-caveolin-2-vel jelölődött (14. B ábra). Az anti-caveolin-1 ellenanyaggal elvégzett jelölés negatív eredményt adott.



**13. ábra: Reprezentatív Western blot analízis**: VIP21/caveolin-1 azonosítása rezidens (R) és elicitált (E) makrofágokban. U: uterus simamizom (kontrol)



**14. ábra:** *A.)* Immunoblot caveolin-2 kimutatására rezidens (R) és elicitált (E) makrofágokban. U: uterus simaizom, H: szívizom (kontrol). *B.*) Rezidens makrofágok lizátumából immunprecipitáció. Az immunprecipitátum kb. 29kDa molekulatömegű fehérje, amely erősen jelölődik anti-caveolin-2-vel.

Caveolin RT-PCR analízis: RT-PCR technika alkalmazásával mind az elicitált mind pedig a rezidens makrofágokban különböző molekulatömegű produktumokat sikerült azonosítanunk. PCR termékek közül egy kisebb, 368 bp mRNS mind az elicitált mind pedig a rezidens makrofágokban jelen van, úgy tűnik azonban, hogy elicitált makrofágokban ezen mRNS nagyobb mennyiségben expresszálódik, mint a rezidens makrofágokban (15. ábra). Szekvencia analízis során 90-100% homológiát találtunk ezen PCR termék és a már ismert caveolin mRNS szekvenciák között (II. táblázat)



**15. ábra: Caveolin RT-PCR.** *Mind rezidens (R) mind pedig elicitált (E) makrofágokban különböző RT-PCR terméket sikerült azonosítanunk. Bár a 368 bp mRNS mind a rezidens, mind pedig az elicitált makrofágokban megfigyelhető, úgy tűnik, hogy elicitált makrofágok nagyobb mennyiségben expresszálják.* 

### II. táblázat

Patkány peritoneális makrofágokban jelenlévő 368bp mRNS szekvenciájának összehasonlítása más fajok caveolin mRNS szekvenciájával (% a homológia mértéke).

Faj	százalék
Rattus norvegicus caveolin-1 mRNS	99%
Mus musculus caveola fehérje (22 kDa mRNS)	96%
Bos taurus caveolin-1 mRNS	94%
Homo sapiens caveolin-1 mRNS	92%
Canis familiaris	93%
Canis familiaris VIP21 gén	93%
Csirke caveolin-1 mRNS	87%!
Fugu rubripes caveolin-1 és -2 gén	80%
Mus musculus caveolin-3 mRNS	79%
Homo sapiens caveolin-3 mRNS	79%
Rattus norvegicus caveolin-3 mRNS	87%

## 7.1.3. A caveolin izoformák sejten belüli eloszlásának vizsgálata:

#### a.) Konfokális mikroszkópia

Ha összehasonlítjuk a rezidens és elicitált makrofágokban a caveolin izoformák eloszlását, jelentős különbségeket figyelhetünk meg. Fénymikroszkópos (konfokális) vizsgálataink azt mutatják, hogy az anti-caveolin-2 ellenanyaggal jelölt caveolin izoforma elsősorban a Golgi készüléknek megfelelő régióban van jelen a rezidens makrofágok citoplazmájában (16. A ábra). Anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyag alkalmazásával rezidens makrofágokban hasonló caveolin eloszlást tapasztaltunk (16. B ábra). Ezzel szemben elicitált makrofágok erőteljesen jelölődtek anti-VIP21/caveolin ellenanyaggal. Caveolin-1 izoforma mind a citoplazmában mind pedig a sejtfelszinen kimutatható volt (16. C ábra), ugyanakkor a caveolin-2 izoforma elsősorban a citoplazmában volt megfigyelhető (16. D ábra).



16. ábra: VIP21/caveolin-1 immuncitokémiai kimutatása konfokális mikroszkópiával. A és B: rezidens, C és D elicitált makrofágok. A.) Rezidens makrofágokban a VIP21/caveolin-1 a citoplazmában, a Golgi készülék környezetében van jelen. B.) A caveolin-2 hasonló eloszlást mutat. C.) elicitált makrofágokban a VIP21/caveolin-1 a sejtfelszinen és a citoplazmában is jelen van, míg kis mennyiségű caveolin-2 a citoplazmában detektálható (D.). Nagyítás.: 100x

(Dr Tímár József felvétele 2000)

#### b.) Ultrastruktúrális vizsgálatok

Annak eldöntésére, hogy az egyes caveolin izoformák a citoplazmában milyen jelen, kompartimentumokban vannak fagyasztott ultravékony metszeteken immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. Anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyaggal a rezidens makrofágok plazmamembránján szinte egyáltalán nem találtunk jelölést. A caveolin-2 nagyméretű vezikulákban ill. multivezikuláris testekben volt jelen a rezidens makrofágok citoplazmájában (17. A és B ábra), Néhány esetben a caveolin-2 azonosítható volt a sejtfelszínen is, azonban soha nem találtunk jelölést a caveolákhoz morfológiailag hasonló struktúrákban. Elicitált makrofágokban a caveolin-1 elsősorban a sejtfelszínen nagy számban jelenlévő caveolák membránjában azonosítható (18. A ábra), bár a citoplazmában jelenlévő kisméretű vezikulák membránja is caveolin-1 pozitív struktúrának bizonyult. Ugyanakkor azonban a caveolin-2 elicitált makrofágokban is inkább a citoplazmában, a Golgi készülék szomszédságában, kisméretű vezikulákban (18. B ábra) ill. a perinukleáris régióban multivezikuláris testekhez hasonló, nagyobb méretű vakuolumokban (18. C ábra) volt megfigyelhető.



**17. ábra: Caveolin-2 kimutatása rezidens makrofágokban**. *Caveolin-2 nagyobb méretű vezikulákban (A) és kifejezetten nagyméretű vakuolumokban, ún. multivezikuláris testekben (B) figyelhető meg a citoplazma mélyebb területein, a Golgi készülék közelében. Bar: 0.25µm* 



18. ábra: Caveolin izoformák előfordulása elicitált makrofágokban. A.) A felszinnel kapcsolatban álló caveolák (nyilak), ill. a citoplazmában jelen lévő vezikulák (nyílfejek) membránja caveolin-1 jelölést mutat. B.) A caveolin-2 a citoplazmában, a Golgi készülék környezetében, kisméretű vezikulákban (nyílfejek) és C.) nagyobb méretű vakuolumokban, multivezikuláris testekben (nyilak) van jelen. Bar: 0.5μm

### 7.1.4. A caveolák lefűződésének, endocitózisban betöltött szerepének vizsgálata

Annak eldöntésére, hogy a caveolák részt vesznek-e a makrofágok felvételi folyamataiban, a fluid fázisos felvétel és a receptor-mediált endocitózis folyamatát vizsgáltuk rezidens és elicitált makrofágokban.

*a.) Folyadék fázisos endocitózis: HRP felvétel:* Spektrofotometriás méréseink azt igazolták, hogy mind a rezidens mind pedig az elicitált makrofágok által felvett HRP mennyisége a felvételi folyamat első 5 percében, az idő függvényében arányosan nő (19. B ábra). Az ábrán jól látható, hogy elicitált makrofágok lényegesen nagyobb mennyiségű HRP-t akkumulálnak, mint a rezidens sejtek. Igen jelentős különbség figyelhető meg 5 perces felvétel után: elcitált makrofágok kb négyszer annyi peroxidázt endocitálnak, mint a rezidens társaik. 30 perces felvétel után mind a rezidens, mind pedig az elicitált makrofágokban némileg csökken a felvett HRP mennyisége.

A folyadék fázisos felvételben szerepet játszó vezikulák, citoplazmatikus kompartimentumok, azonosítása céljából hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Néhány esetben fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett kettős jelöléses immuncitokémiával HRP-t és caveolin-1-t mutattunk ki. A felvételi folyamat megindulása után 1 perccel a HRP a plazmamembránról lefűződő clathrin-coated vezikulákban figyelhető meg (20. A ábra), közülük néhány a citoplazmában meglévő nagyobb méretű, endoszómaszerű vakuolummal fúzionál. Számos, caveolákhoz hasonló méretű vezikula is megfigyelhető ezekben a sejtekben (20. C ábra), amelyek közül néhány HRP-t tartalmaz (nyilfejek). A felvételi folyamat ezen korai szakaszában még csak nagyon kevés HRP tartalmú caveolát találtunk az elicitált makrofágok sejtmembránján (20. B, valamint 21. A és B ábra).

Annak eldöntésére, hogy a citoplazmában megfigyelhető, önálló vezikulának látszó struktúrák valóban lefűződött, a sejtfelszínnel összeköttetésben nem álló stuktúrák-e, ultravékony (30nm vastagságú) sorozat-metszeteket készítettünk, és az egymást követő néhány metszeten, ugyanazon citoplazma terület egy következő szeletén, HRP-jelölt vezikulákat kerestünk, és vizsgáltuk, hogy az ezek a struktúrák az egymást követő szeleteken valóban összeköttetésben állnak-e a sejtfelszínnel. A 22.

ábra elicitált makrofág citoplazmájának részletét mutatja négy egymást követő metszeten. Jól látható, hogy vannak olyan HRP-jelölt struktúrák, amelyek egyik szeleten sincsenek összeköttetésben a sejtfelszínnel, tehát valóban lefűződött vezikulák.



**19. ábra**: **A.**) PAP kötődése és felvétele rezidens (üres oszlopok) és elicitált (sötét oszlopok) makrofágokban. "0" időpont: a ligand kötődése a sejtfelszinhez (1 óra 4C°). **B.**) HRP felvétele rezidens (üres oszlopok) és elicitált (sötét oszlopok) makrofágokban. Az internalizációt a sejtszuszpenzió lehűtésével, az aspecifikusan kötött ligandot pedig jéghideg PBS-ben való mosással távolítottuk el. SD: 0.05



20. ábra: HRP felvételének vizsgálata elicitált makrofágokban (1 perces internalizáció) A.) HRP a sejtfelszinről lefűződő clathrin-burkos vezikulákban (nyíl) azonosítható. B.) és C.) Számos omega alakú membrán invagináció (nyilak), és a caveolákhoz hasonló méretű vezikula is megfigyelhető ezekben a sejtekben, amelyek közül néhány HRP-t tartalmaz (nyilfejek). A (\*) endoszómát jelöl. Bar: 0.5µm



21. ábra: HRP és PAP felvétel elicitált makrofágokban. A.) A HRP kisméretű, caveola-szerű vezikulákban (nyíl) azonosítható. (A nyílfej egy membránnal összeköttetésben álló caveolát jelöl) B.) Kettős jelöléses immuncitokémiai technikával az HRP (nagyobb aranyszemcsék) tartalmú vezikulák membránjában caveolin-1 (kisebb méretű aranyszemcsék) is jelen van (nyíl). C.) PAP kötődése a sejtmembránhoz. A felszinnel összeköttetésben álló, lefűződő caveola-szerű struktúrák PAP-t tartalmaznak (nyilak). D.) A PAP-t clatrhin burkos vezikulák (nyifej) és caveola-szerű lefüződött vezikulák (nyilak) szállítják a citoplazma belsejébe. Bar: A.) C.) és D.): 0.25µm; B.): 0.1µm



**22. ábra: Sorozat-metszet analízis (1 perces HRP felvétel)**. A nyillal jelölt, HRP tartalmú, caveola méretű struktúrák az egymást követő négy metszési síkban sem állnak összeköttetésben a sejtfelszinnel, tehát a sejtmembránról lefűződött vezikulák. A metszetek vastagsága: 35-40nm. Bar: 0.5µm

*Szérum albumin felvétel:* Fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett kettős jelöléses immuncitokémiai vizsgálataink során szérum albumin anti-caveolin-1-el jelölt vezikulákban van jelen. Ezek a vezikulák a sejtfelszín közelében (23. A és B ábra), illetve a citoplazma belsejében is megfigyelhetők (23. C ábra).



23. ábra: Kettős jelöléses immuncitokémia fagyasztott ultravékony metszeten. Szérum albumin (nagyobb aranyszemcsék) és caveolin-1 (kisebb aranyszemcsék) kimutatása. Számos, vezikulára emlékeztető struktúra (nyilak) kettősen jelölődött, igazolván, hogy ezek a szérum albumint tartalmazó vezikulák amelyek caveolák, nincsenek összeköttetésben a sejtfelszinnel. Ha ugyanis még mindig kapcsolatban állnának a környezettel, a mosások után a fluid fázisos marker, a szérum albumin bennük már nem lenne Néhánv kimutatható. esetben а VIP21/caveolin-1 és a szérum albumin endoszóma-szerű vakuolumokban (csillag) is megfigyelhető. Bar: 0.1µm



**24.** ábra: Receptor-mediált endocitózis (PAP) vizsgálata elicitált makrofágokban. A.) 30 másodperccel az internalizáció megindulása után a PAP clathrin-burkos vezikulákban (nyilak) és kisebb méretű "sima", clathrin burokkal nem rendelkező vezikulákban is detektálható. B.) és C.) 2 perces internalizáció után számos olyan vezikula találunk a citoplazmában, amelyekben PAP mutatható ki, és méretük, morfológiájuk alapján caveoláknak felelnek meg. Ebben az időpontban PAP már az endoszómákban (csillag) is jelen van. Bar: A és B: 0.5μm; C: 0.25μm

*b.)* Receptor-mediált endocitózis: spektrofotometriás vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy az elcitált makrofágok  $4C^0$ -on kb. kétszer annyi PAP immunkomplexet kötnek sejtmembránjukon, mint a rezidens sejtek. (19. A ábra). Ha a sejteket  $37^0$ C-ra felmelegítjük a PAP internalizációja megindul, és a felvett immunkomplex mennyisége mind a rezidens mind pedig az elicitált makrofágokban az idő előrehaladtával nő. Ha összehasonlítjuk a rezidens és az elicitált makrofágok által felvett PAP mennyiségét azt tapasztaljuk, hogy az internalizáció korai időpontjában az elicitált makrofágok jelentősen több immunkomplexet vesznek fel, mint a rezidens fagocita sejtek. Még 2 perces internalizáció után is igen jelentős különbség van a rezidens és az elicitált makrofágok között. A felvételi folyamat előrehaladtával ez a különbség fokozatosan csökken, 30 perc után a rezidens sejtek ugyanannyi PAP-t vesznek fel, mint azelicitált makrofágok.

Elektronmikroszkópos felvételeinken jól látható, 30 másodperccel a felmelgítés után a sejtfelszínhez kötött PAP felvétele megindul, PAP a sejtfelszínről lefűződő caveolákban, és clathrin-coated vezikulákban mutatható ki (21. C és D valamint 24. ábrák). A clathrin-burkos vezikulák mellett azonban kisebb átmérőjű, clathrin burok nélküli vezikulák is megfigyelhetők, amelyek jelentős mennyiségű immunkomplexet tartalmaznak. 2 perccel az internalizáció megindulása után egyre nagyobb számban fordulnak elő a citoplazmában PAP- tartalmú, clathrin burok nélküli vezikulák (24. ábra), amelyek méretük, morfológiájuk alapján caveoláknak felelnek meg.

*c.) Kísérletek filipinnel*: a caveolák endocitotikus szerepének további igazolására egy koleszterin-kötő vegyületet, filipint használtunk. A caveolákról ismert, hogy filipin kezelés hatására dezintegrálódnak. Ha elicitált makrofágokat 0.5  $\mu$ g/ml filipin jelenlétében 37C<sup>0</sup>-on különböző ideig (30, 60 és 90 perc) inkubáltuk, a caveolák száma drasztikusan lecsökkent (25. A ábra). 30 perces filipin kezelés után a caveolák gyakorlatilag teljesen eltűnnek a makrofágok sejtmembránjáról. Ugyanakkor filipinnel rövid ideig kezelt sejtekben a clathrin burkos vezikulák változatlan számban voltak jelen a sejtfelszinen és a citoplazmában, a koleszterin eltávolítása morfológiájukra nem volt hatással. 60 perces filipin kezelés viszont már jelentősen csökkentette a clathrin-coated vezikulák számát is az eliciált sejtek plazmamembránján. Ha összehasonlítjuk a filipin-előkezelt és filipin kezelést nem

kapott sejtek HRP és PAP felvételét (25. B és C ábra), megállapíthatjuk, hogy mindkét anyag felvétele csökken a filipin-előkezelt sejtekben. A filipin jelentősebb hatással volt a fluid fázisos felvételre: 5 perccel az internalizáció megindulása után a filipin előkezelt sejtekben 20%-al, a hosszabb ideig tartó (30 perc) felvétel során pedig csaknem a felére csökkent a sejtek által felvett HRP mennyisége. Ezzel szemben filipin előkezelés csak kis mértékben hatott a PAP felvételére, azaz a receptor-mediált endocitózisra.



**25. ábra: Filipin kezelés hatása:** *A.*) a clathrin-burkos vezikulumok és a caveolák sejtfelszini eloszlására (a függöleges tengelyen az egységnyi felszínre jutó vezikulák száma.) *B.*) 30 perces filipin előkezelés hatása a HRP felvételre és *C.*) a PAP internalizációjára elicitált makrofágokban (spektrofotometriás mérések).

#### 7.1.5. A caveolák lefűződésének szabályozása:

A foszforiláció/defoszforiláció hatásását a caveolák lefűződésének szabályozásában egy szerin/treonin foszfatáz-gátló, az okadánsav alkalmazásával vizsgáltuk. Kísérleteink során az okadánsav kezelések után sem rezidens, sem pedig elicitált makrofágokban nem észleltünk az alapvető funkciók károsodására vagy zavarára utaló ultrastruktúrális változásokat, amely azt bizonyítja, hogy a foszfatázgátló koncentrációja nem volt toxikus. Okadánsavat kétféle koncentrációban alkalmaztuk, a foszfatázgátló hatását a caveolák internalizációjára *morfológiai, morfometriai* és biokémiai vizsgálatokkal tanulmányoztuk. *Immunprecipitációt* követő *immunoblottal* próbáltuk azonosítani azokat a fehérjéket, amelyeknek foszforilációja befolyással lehet a caveolák internalizációjára és reciklizációjára.

*Morfológiai vizsgálatok:* Annak eldöntésére, hogy a sejtfelszín alatt elhelyezkedő vezikulák valóban lefűződött struktúrák-e, avagy a plazmamembránnal kapcsolatban állnak, a sejtfelszín jelölése széles körben elterjedt Ruténium-vörös festéket alkalmaztuk. A módszer lényege, hogy a sejtfelszínnel kapcsolatban álló, nyitott caveolák a Ruténium-vörös szemcséivel jelölődnek, míg a plazmamembránról korábban lefűződött vezikulákat a festék már nem jelöli. Okadánsavval nem kezelt elicitált makrofágok plazmamembránján nagyszámú, Ruténium-vörössel jelölt caveola fígyelhető meg (26. A ábra). Ruténium-vörös jelölést találhatunk olyan struktúrákban is, amelyek lefűződött vezikuláknak tűnnek, a sejtfelszínnel való kapcsolatukat azonban a Ruténium-vörös jelölés egyértelműen bizonyítja. 30 perces okadánsav kezelés után számuk jelentős mértékben csökken (26. B ábra). A citoplazmában számos vezikula látható, melyek membránja Ruténium-vörössel nem jelölődött, jelezvén, hogy ezen képletek már a felszín megjelölése előtt elvesztették kapcsolatukat a plazmamembránnal.



**26. ábra: Okadánsav hatása a sejtfelszínnel kapcsolatban álló vezikulák (caveolák) mennyiségére.** *A sejtfelszínnel kapcsolatban álló képleteket Ruténium-vörös festékkel jelöltük meg. A.*) *Okadánsavval nem kezelt makrofágok plazmamembránján (pm) számos nyitott caveola (nyilak) van jelen. B.*) *Okadánsav kezelés után a plazmamembrán (pm) nyitott caveoláinak mennyisége csökken (nyilak), a sejtfelszínhez közel számos zárt, Ruténium-vörös jelölést nem mutató, tehát lefűződött vezikula figyelhető meg (csillagozott nyilak). m: mitokondrium. Bar: 0.5µm*
*Morfometriai* eredményeink igazolják, hogy mind a rezidens, mind pedig az elicitált makrofágokban a sejtfelszínnel összeköttetésben álló clathrin-coated vezikulák és a caveolák száma okadánsav kezelés hatására jelentősen lecsökken (III. táblázat).

## III.táblázat

A makrofágok sejtfelszíni és lefűződött caveoláinak, és a clathrin burkos vezikulák százalékos megoszlása okadánsav kezelés után (szemikvantitatív vizsgálat).

	Caveola méretű vezikula	Clathrin-burkos vezikula
	(50-100nm)	(~120nm)
kontroll	23%	73 %
4nM	73%	23 %
100nM	98%	2 %

## Rezidens makrofágok

	Nyitott vezikula	Zárt vezikula
	(50-100nm)	(50-100nm)
kontroll	50%	50%
4nM	22%	78%
100nM	25%	75%

## Elicitált makrofágok

	Caveola méretű vezikula	Clathrin-burkos vezikula		
	(50-100nm)	(~120nm)		
kontroll	84%	26 %		
4nM	98%	2 %		
100nM	99%	1%		

	Nyitott vezikula	Zárt vezikula
	(50-100nm)	(50-100nm)
kontroll	76 %	24 %
4nM	13 %	87 %
100nM	20 %	80 %

*Rezidens makrofágok* plazmamembránján lévő endocitotikus struktúrák túlnyomó többsége, 73%-a clathrin-burkos invagináció illetve vezikula, és csupán 23%-a caveola. *Elicitált makrofágokban* ez az arány jelentősen eltér: a plazmamembrán invaginációinak 26%-a clathrin-burkos vezikula, 84%-a caveola. Az okadánsav kezelés hatására a rezidens és az elicitált sejtek clathrin-burkos vezikuláinak mennyisége drámaian lecsökken. Rezidens makrofágokban 4nM okadánsav kezelés után a *clathrin-burkos vezikulák* aránya 23%, elicitált makrofágokban pedig mindössze 2%. 100nM okadánsav kezelés után a clathrin-burkos invaginációban gyakorlatilag teljesen eltűnnek.

Okadánsavval nem kezelt (kontroll) *rezidens makrofágokban* a *caveola* méretű vezikulák 50%-a a sejtfelszínnel kapcsolatban álló ("nyitott vezikula"), 50%-a pedig lefűződött ("zárt vezikula"). 4nM okadánsav kezelés után ezeknek a struktúráknak már csak 22%-a áll összeköttetésben a felszínnel, 78%-uk lefűződött vezikula formájában figyelhető meg a plazmamembrán alatt. 100nM okadánsav kezelés rezidens makrofágokban a sejtfelszínnel kapcsolatban álló (25%) illetve lefűződött (75%) vezikulák eloszlásában további változást nem eredményezett. Okadánsavval nem kezelt (kontroll) *elicitált makrofágokban* a vezikulák 76%-a áll összeköttetésben a sejtfelszínnel és csak 24%-a lefűződött, önálló, szabad vezikula. Okadánsav kezelés hatására ez az arány jelentősen változik: 4nM okadánsavval 30 percig (37°C) kezelt elicitált makrofágokban a sejtfelszínnel már csak a vezikulák 13%-a áll összeköttetésben, 87%-uk pedig lefűződött. 100nM okadánsav kezelés nem növeli tovább a lefűződött vezikulák arányát (20% membránnal összefüggő, 80% lefűződött).

A caveolin-1 és caveolin-2 izoformák eloszlásának változása: Fagyasztott ultravékony metszeteken végzett immuncitokémát követően caveolin-1 és caveolin-2 izoformák sejten belüli előfordulását tanulmányoztuk. Az egyes caveolin izoformák jelenlétét az izoformát specifikusan felismerő ellenanyaghoz kötődő, kolloidális arannyal jelölt második ellenanyaggal detektáltuk, tehát a kolloidális aranyszemcsék a caveolin izoformák lokalizációját mutatták. Az aranyszemcsék százalékos megoszlását tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a caveolin izoformák eloszlása szoros összefüggésben áll az alkalmazott okadánsav kezeléssel (IV. táblázat).

74

Tekintettel arra, hogy rezidens makrofágokban jóval kevesebb caveola figyelhető meg, ezekben a sejtekben csak igen kevés caveolin-1 található a plazmamembránon. A caveolin-2 izoforma rezidens sejtekben főként a Golgi készülékhez közeli citoplazmában kisebb-nagyobb vezikulákban, vakuolumokban, valamint a már korábban említett multivezikuláris testekben mutatható ki. Hagyományos elektronmikoszkópos technikával készült felvételeken elicitált makrofágokban jóval nagyobb számban figyelhetők meg caveola méretű invaginációk. E sejtek plazmamembránján fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett immuncitokémiát követően nagyobb mennyiségű caveolin-1 mutatható ki, mint a citoplazmában. Okadánsav kezelést követően a plazmamembrán caveolin-1 tartalma lecsökken (70%-ról 5 illetve 4%-ra). A caveolin-1 lényegesen nagyobb mennyiségben mutatható ki a citoplazmában, elsősorban olyan, rozetta-szerű, caveolacsoport formában mutatkozó organellumokban, melyeket az irodalom caveoszómaként említ, illetve multivezikuláris testekhez hasonló struktúrákban. Elicitált makrofágokban a caveolin-2 izoforma az okadánsavval nem kezelt és kezelt sejtekben egyaránt a caveolin-1 fehérjével együtt van jelen a plazmamembránon és a különböző sejtorganellumok membránján, eloszlása követi a caveolin-1 eloszlási mintázatát.

Ezt követően arra kerestük a választ, hogy az okadánsav kezelés hogyan befolyásolja az endocitózisra specializálódott makrofágok felvételi folyamatait. Ebből a célból a már említett folyadékfázisú markert, a tormaperoxidázt (HRP) alkalmaztuk. A makrofágok által internalizált tormaperoxidázt diamino-benzidin reakcióval (DAB technika) mutattuk ki. DAB technika alkalmazásával készült elektronmikroszkópos felvételeink azt mutatják, hogy az *okadánsavval nem kezelt* rezidens (27. A ábra) és az elicitált makrofágokban (28. ábra) a felvett peroxidáz nagyméretű vakuólumokban, és számos kisebb vezikulában figyelhető meg.

# IV.táblázat

A caveolin-1 és a caveolin-2 izoformák megoszlása okadánsav kezelést követően makrofágok különböző kompartimentumaiban (szemikvantitatív vizsgálat).

	CTR		4nM		100nM	
	cav-1	cav-2	cav-1	cav-2	cav-1	cav-2
<u>Rezidens makrofág</u>						
plazmamembrán	2%	1%	1%	1%	1%	1%
citoplazma (vezikulák, vakuolumok)	72%	80%	74%	78%	75%	79%
"caveoszómák", endoszómák/ multivezikuláris testek	25%	17%	24,95%	20%	23,95%	19%
mitokondrium, sejtmag	1%	2%	0,15%	1%	0,05%	1%
<u>Elicitált makrofág</u>		_			-	
plazmamembrán	70%	70%	5%	5%	4%	4%
citoplazma (vezikulák, vakuolumok)	15%	15%	25%	24%	20%	19%
"caveoszómák", endoszómák/ multivezikuláris testek	14%	14,9%	69%	70,1%	75%	76%
mitokondrium, sejtmag	1%	0,1%	1%	0,9%	1%	1%



27 ábra: Okadánsavv hatása rezidens makrofágok tormaperoxidáz felvételére. A.) Okadánsavval nem kezelt rezidens makrofágokban az internalizált tormaperoxidáz kisebb-nagyobb endoszómákban (E) mutatható ki. A kisebb méretű, elektron-sűrű vakuolumok a Golgi készülék közelében feltehetőleg lizoszómák. B.) 4nM okadánsav hatására a makrofágok kevesebb tormaperoxidázt vesznek fel, mely endoszómákban (E) jelenik meg. C.) A plazmamembránról (pm) lefűződő caveola méretű membrán betüremkedések (nyilak) 100nM okadánsav kezelés ellenére is jelen van. m: mitokondrium; G: Golgi hálózat; ly: lizoszóma; N: sejtmag. Bar:0.5µm



**28.** ábra: *Elicitált* makrofágok tormaperoxidáz felvételére. A.) 30 perc tormaperoxidáz kezelést követően a folyadékfázisú marker az elicitált makrofágok endoszómáiban (E) mutatható ki. B.) Okadánsav jelenlétében az elicitált makrofágok jelentősen kevesebb tormaperoxidázt vesznek fel. A sejtfelszínen (pm) számos caveola figyelhető meg (nyíl), a lefűződő caveolák egyesével, vagy virág formájú csoportba rendezetten jelennek meg a plazmamembrán (pm) alatt (kettős nyilak). m: mitokondrium; G: Golgi hálózat; ly: lizoszóma; N: sejtmag. Bar:0.5μm

A nagyméretű vakuolumok feltehetően endoszómák, amelyek közelében peroxidázzal teli transzport vezikulák is láthatók. Abban az esetben, ha a 30 perces tormaperoxidázzal végzett inkubáció előtt 4 illetve 100nM okadánsav előkezelést végeztünk, mind a rezidens (27. B és C ábra), mind pedig az elicitált makrofágokban (28. B ábra) nagy számban figyelhetők meg endoszómák.

Morfológiai adataink kvantitatív alátámasztása céljából nyugvó állapotban lévő (rezidens) és az aktivált (elicitált) makrofágokat okadánsavval előkezeltük, majd okadánsav jelenlétében tormaperoxidázt adtunk a sejtszuszpenzióhoz. A felvett tormaperoxidáz mennyiségét spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk. Méréseinkkel arra kerestük a választ, vajon van-e lényeges különbség a rezidens és elicitált sejtek folyadék fázisos endocitotikus aktivitásában, valamint, hogy a caveolák lefűződését stimuláló okadánsav befolyásolja-e, - s ha igen, hogyan - a makrofágok tormaperoxidáz felvételét.

Ha az okadánsavval előkezelt sejtek tormaperoxidáz (HRP) felvételét vizsgáltuk, meglepő eredményt kaptunk. A várakozással ellentétben az okadánsav kezelés után nem nőtt, hanem éppen ellenkezőleg csökkent a sejtek által felvett peroxidáz mennyisége. 4nM koncentrációban az okadánsav mind rezidens mind pedig elicitált sejtekben kb felére csökkentette a felvett HRP mennyiségét (29. ábra), 100nM koncentrációban az okadánsav kis mértékben ugyan, de tovább csökkentte HRP felvételt.



**29.** ábra: Okadánsav hatása az internalizált tormaperoxidáz mennyiségére rezidens (A) és elicitált (B) makrofágokban. Okadánsavval nem kezelt makrofágok tormaperoxidáz felvételéhez képest 4nM okadánsav közel a felére csökkentette a fluid fázisos felvételt mindkét sejtpopulációban. 100nM okadánsav még erőteljesebben csökkentette a rezidens makrofágok által felvett HRP mennyiségét, azonban elicitált makrofágokra további hatást nem gyakorolt. \*: SD<0,05 a nem kezelt, kontroll (CTR) sejtekkel szemben.

Okadánsav kezelések után a makrofágok citoplazmájában nagyméretű vakuolumok figyelhetők meg (30. ábra), amelyek morfológiai sajátságaikban a multivezikuláris testekbez hasonlítanak. Ezekben a vakuolumokban számos kisebb, a caveolákhoz méretben, megjelenésben nagyon hasonló vezikula látható, sokszor a HRP tartalmú endoszómák közvetelen közelében (30. A ábra). Fagyasztott ultravékony metszeteket anti-caveolin-1 ellenanyaggal inkubálva ezen struktúrák belsejében, a kisebb méretű vezikulák membránjában caveolin-1 mutatható ki (30. B ábra).



**30.** ábra: Multivezikuláris testek elicitált makrofágokban okadánsav kezelést követően. A.) 4nM okadánsav kezelés után egy multivezikuláris test egy tormapeoxidáz tartalmú endoszómával (E) szoros közelségben helyezkedik el. B.) Fagyasztott ultravékony metszeten anti-caveolin-1 ellenanyaggal végzett immunjelölés. Az okadánsavval kezelt sejtekben a multivezikuláris testek vezikuláinak membránja caveolin-1 (10nm aranyszemcse) jelenlétét mutatja (mvb\*). pm: plazmamembrán; m: mitokondrium; N: sejtmag. Bar:0.5µm

*Okadánsav hatása a makrofág caveolin-2 foszforilációjára*. Kísérleteinket megelőzően az irodalomban számos utalást találtunk arra, hogy a caveolin-1 foszforilációs módosulásainak jelentős szerepe van a caveolák lefűződésének szabályozásásban. Munkám során arra is kerestem a választ, hogy a szerin/treonin protein-foszfatázokat gátló okadánsav a caveolák lefűződését a caveolin izoformák valamelyikének foszforilálása révén indukálja-e. A kérdés megválaszolására a kísérleteket követően kezelt sejtek lizátumából anti-caveolin-1 és anti-caveolin-2 ellenanyaggal immun-precipitációt végeztünk, majd anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blot analízist végeztünk.

Ha a makrofágok lizátumát anti-caveolin-1 és anti-caveolin-2 ellenanyaggal immunprecipitáltuk, majd megfelelő caveolin izoformák elleni ellenanyaggal, illetve anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blot analízist végeztünk, az alábbi eredményt kaptuk. A poliklonális anti-caveolin-1 ellenanyaggal egy ~29kDa molekulatömegű fehérje immunprecipitálódott, amely az okadánsav koncentrációjának függvényében erőteljesen foszforilálódott tirozin aminosav-származékokon, de monoklonáris anti-caveolin-1 ellenanyaggal nem jelölődött (31. A ábra). Ha az immunprecipitációt anti-caveolin-2 ellenanyaggal végeztük, mind a rezidens, mind pedig az elicitált makrofágok immunprecipitátumában egy ~29 kDa molekulatömegű fehérjét találtunk, amely amellett, hogy okadánsav kezelés hatására (koncentrációtól függően) erőteljesen tirozinfoszforilált, anti-caveolin-2 ellenanyaggal is erős immunreakciót adott. Úgy véljük, hogy ez a ~29 kDa molekulasúlyú, anti-caveolin-2 ellenanyaggal jelölhető fehérje egy makrofág-specifikus caveolin izoforma, mely a foszfatázgátló okadánsav hatására indirekt módon tirozin-foszforilálódik.



**31. ábra: Immunoprecipitáció anti-caveolin-2 ellenanyaggal, majd Western blot analízis anti-foszfotirozin ellenanyaggal**. *Rezidens (A panel) és elicitált (B panel) makrofágokban egy ~29 kDa molekulatömegű fehérje tirozin foszforilációját detektáltuk, mely az alkalmazott okadánsav koncentráció emelésével arányosan növekedett. Az immunprecipitátum anti-caveolin-2 ellenanyaggal Western blot analízis során jelölhető (A/a; B/a), mely bizonyítja, hogy a ~29 kDa molekulatömegű fehérje caveolin-2.* 

dc\_1278\_16

#### 7.2. Vizsgálatok HepG2 sejteken

# 7.2.1. Okadánsav hatása HepG2 sejtek caveoláinak internalizációjára, valamint a caveolin izoformák eloszlására

#### 7.2.1.1. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A caveolin-1 jelenlétét és eloszlását HepG2 sejtekben immunfluorescens jelölés után konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Mivel makrofágokkal elvégzett kísérleteink eredményei azt sugallták, hogy a caveolin-2 izoformának fontos szerepe lehet a caveolák lefűződésének szabályozásában, vizsgáltuk a caveolin-2 sejten belüli eloszlását is. Vizsgálataink során néhány esetben a caveolák mobilitását befolyásoló aktin-citoszkeletont is jelöltük.

Okadánsavval nem kezelt (kontroll) sejtekben a *caveolin-1* (32. ábra) és a *caveolin-2* (33. ábra) jelenlétére utaló fluorescens jel diszkrét pontok formájában figyelhető meg, a plazmamembránon valamint a citoplazmában. A plazmamembrán mentén elhelyezkedő pontszerű jel a sejtfelszíni caveolák jelenlétére utal, mintegy kirajzolja a sejtek kontúrját. 30 perc okadánsav (4nM) kezelés után a caveolin-1-et detektáló fluorescens jel mellett nagyobb, flourescens aggregátumok figyelhetők meg a sejtek citoplazmájában (32. D ábra). Ugyanezen kezelés a caveolin-2 izoforma eloszlását nem változtatta meg jelentősen. (33. D ábra). Magasabb koncentrációjú (100nM) 30 perc okadánsav kezelést követően azonban mind a caveolin-1, mind pedig a caveolin-2 eloszlásában jelentős változások alakultak ki (32. és 33. G ábrák). Mindkét izoforma nagy, flourescens aggregátumok formájában azonosítható a sejtek citoplazmájában a plazmamembrán alatt, illetve a sejtmag körül. Ezen caveolin pozitív aggregátumok feltehetőleg az okadánsav kezelés hatására lefűződött, csoportba gyűlt caveoláknak, illetve az internalizációt követően kialakuló, caveolin tartalmú intracelluláris kompartimentumnak felelhetnek meg.

Érdemes megjegyeznünk, hogy a plazmamembránon még az erőteljes internalizációt stimuláló hatású, magas koncentrációjú okadánsav kezelés után is jelen vannak a caveolin izoformák illetve caveolák. A plazmamembrán caveolái alatt az aktint specifikusan felismerő phalloidinnel kimutatott aktin citoszkeleton finom

84

hálózata mind az okadánsavval kezelt, mind a kezeletlen sejtekben megfigyelhető (32. és 33. C,F,I ábrák). Míg kezeletlen sejtekben az aktinfilamentumok jól láthatóan finom hálózatot alkotnak (32. B és 33. B ábrák), okadánsav kezelések hatására a sejtfelszíni aktinhálózat kismértékben átépül, erőteljesebb kötegekbe rendeződik, vagy rövid, vonalszerű képleteket alkot a citoplazmában (32. E, H és 33. E,H ábrák).

#### 7.2.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Kontrol HepG2 sejtekről készült hagyományos elektronmikroszkópos felvételeken (34. A ábra) a caveolák kisebb-nagyobb, a sejtfelszín felé nyitott csoportjai a rájuk jellemző elrendeződésben láthatók a sejtek plazmamembránján. 30 perc, 4nM okadánsav kezelést követően (34. B ábra) a caveola méretű vezikulák csoportjai bonyolult, labirintikus képleteket alkotnak, mely az okadánsav hatására bekövetkező fokozott internalizácó következménye. A bonyolult, rozetta-szerű, virágfűzérre emlékeztető struktúrák mellett számos lefűződött caveola helyezkedik el a plazmamembrán közelében (34. B ábra). A caveolák alatt a citoszkeleton mikrofilamentumai húzódnak (34. C ábra). 100nM okadánsavval kezelt sejtekben jól látható, hogy a citoplazma plazmamembrántól távolabbi területein a már nagy valószínűséggel lefűződött caveolák a citoszkeleton filamentumai mentén sorakoznak (35. B ábra) Ugyanakkor számos caveola még mindig jelen van a plazmamembránon (35. C ábra).

HepG2 sejtekben nagy számban fordulnak elő heterogén morfológiájú multivezikuláris testek (késői endoszómák) (34. D és 35. A ábra). Megfigyelhetünk szabályos membránnal határolt, legalább 9-10 vezikulát tartalmazó képleteket, de találhatunk olyan organellumot is, melynek bennéke több apró vezikulából és lemezes membránokból áll. Ezen sejtalkotók morfológiai jegyeik mellett molekuláris markerekkel is azonosíthatók. Ilyen jellegzetes marker a multivezikuláris testek belső membránjain jelenlévő CD63 (LIMP-1) (Eskelinen és mtsai 2003). Fagyasztott ultravékony metszeteken anti-CD63 és/vagy anti-caveolin-1 ellenanyaggal végzett immun-arany jelölést követően olyan multivezikuláris testeket azonosíthatunk, melyek belső membránjai anti-caveolin-1 ellenanyaggal jelölődnek (36. ábra).



32. ábra: Okadánsav hatása a caveolin-1 fehérje eloszlására HepG2 sejtekben. (Konfokális felvételek egyetlen optikai szeletről). Caveolin-1: zöld; aktin: piros; sejtmag: kék. A.) A caveolin-1 apró fluorescens pontok formájában látható részben a sejtfelszínen (nyílfejek), részben a citoplazmában. D.) 4nM okadánsav kezelés után a citoplazmában aggregált fluorescens jelcsoportok (nyilak) jelennek meg. G.) 100nM okadánsav kezelést követően ezen aggregátumok (nyilak) nagyobb mennyiségben mutatkoznak a plazmamembrán alatt valamint a sejtmaghoz közeli területeken. Ugyanakkor az aktin-citoszkeleton átrendeződése is megfigyelhető (B: nem kezelt, E: 4nM okadánsav; H: 100nM okadánsav). C, F és I: egyesített képek.



**33.** ábra: Okadánsav hatása a caveolin-2 fehérje eloszlására HepG2 sejtekben. (Konfokális felvételek egyetlen optikai szeletről.) Caveolin-2: zöld; aktin: piros; sejtmag: kék. A.) Nem kezelt sejtekben a caveolin-2-t detektáló fluorescens jel (nyílfejek) a plazmamembrán mentén, valamint a citoplazmában mutatható ki. D.) 4nM okadánsav nem változtatta meg a caveolin-2 eloszlást. G.) Aggregált fluorescens jelcsoportok (nyilak) jelennek meg a citoplazmában 100nM okadánsav kezelést követően. B.) nem kezelt sejtekben a finom hálózatba rendeződött aktin-citoszkeleton okadánsav hatására (E, H) vaskosabb kötegekbe rendeződött. C, F és I: egyesített képek.



34. ábra: HepG2 sejtekről készült elektronmikroszkópos felvételek kontrol és okadánsav kezelés után. A.) Kontrol sejt plazmamembránján (pm) a caveolák egyesével, vagy kis csoportokban figyelhetők meg. B.) 4nM okadánsav kezelés után caveolák csoportjai (\*) láthatók a sejtfelszín alatt. C.) Az aktin-citoszkeleton kötegei (kettős nyilak) a plazmamembrán caveolái alatt (4nM okadánsav kezelés). D.) 4nM okadánsav kezelést követően multivezikuláris testek (mvb) mutatkoznak a sejtek citoplazmájában. N: sejtmag. Bar: 0.2µm



**35. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek 100nM okadánsav kezelés után.** *A.) A sejtek citoplazmájában gyakran figyelhetők meg multivezikuláris testek (mvb). B.) A citoszkeleton filamentumai (kettős nyilak) a caveolák csoportja (\*) alatt. C.) Ezek a citoszkeletális kötegek (kettős nyilak) szoros közelségben láthatók a plazmamembrán caveolái (nyilak) alatt is. N: sejtmag; m: mitokondrium; cc: clathrin-burkos vezikulák. Bar: 0.2µm* 



36. ábra: Fagyasztott ultravékony metszeteken végzett immunjelölés 100nM okadánsav kezelés után. Anti-CD63 ellenanyaggal (10nm aranyszemcse) és anticaveolin-1 ellenanyaggal (15nm aranyszemcse, nyilak) kettősen jelölt multivezikuláris testek (mvb\*) detektálhatók nem kezelt (A) illetve okadánsavval kezelt (B) sejtben is. pm: plazmamembrán; mvb: multivezikuláris test; G: Golgi készülék; N: sejtmag. Bar:0.5µm



**37. ábra: Okadánsav kezelés után rozetta formájú organellumok (caveoszómáknak tartott struktúrák) jelenléte HepG2 sejtekben.** Fagyasztott ultravékony metszeteken immunjelölést követően ezen képletek membránjában caveolin-1 (10nm aranyszemcse, nyilak) fedezhető fel. A plazmamembránon (pm) egyedi caveolák is megfigyelhetők. c: caveosoma; N: sejtmag. Bar:0.5µm

Okadánsav kezelés után HepG2 sejtekben a multivezikuláris testektől eltérő morfológiájú képletek megjelenését is észleltük (37. ábra). Ezek jellemzően rozetta, virág-, vagy szőlőfürt-szerű struktúrák, melyeket egy nagyobb vakuólumba csoportosan nyíló caveolák alkotnak a plazmamembránhoz közeli citoplazmában. Fagyasztott ultravékony metszeteken ezen komplexek membránjában caveolin-1 detektálható. Ezek a képletek morfológiájukat és caveolin-1 pozitivitásukat tekintve az irodalomban caveoszómáknak nevezték el.

#### 7.2.1.3. Morfometriai számítások és statisztikai elemzés

Megfigyeléseink kvantitatív adatokkal való alátámasztására fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett immuncitokémia után morfometriai vizsgálatokat végeztünk. A caveolin-1 jelenlétét az első specifikus ellenanyaghoz kötődő, kolloidális méretű (10 illetve 15nm) aranyszemcsékkel jelölt második ellenanyag mutatja ki, tehát az ultravékony metszeteinken látható aranyszemcsék caveolin-1 fehérje jelenlétére utalnak. Morfometriai méréseink során ezen aranyszemcséket számláltuk meg és használtuk fel statisztikai analízishez.

A HepG2 sejtekben a multivezikuláris testek/késői endoszómák azonosítására ezen sejtalkotók membrán-markere, a CD63 ellen termeltetett ellenanyaggal is immunjelölést végeztünk. Egyes multivezikuláris testek belsejében látható vezikulák membránja anti-caveolin-1 ellenanyaggal is jelölést mutat. Tekintettel arra, hogy caveolin-1 ezen CD63 jelölt multivezikuláris testekben is detektálható, a caveolin-1 eloszlását nem csak a plazmamembrán nyitott, valamint lefűződött caveoláinak membránjában, hanem a citoplazma multivezikuláris testjeiben is vizsgáltuk.

Morfometriai méréseink eredményei (V.táblázat) azt mutatják, hogy kezeletlen HepG2 sejtekben a caveolin-1 45%-ban a plazmamembrán nyitott caveoláinak membránjában helyezkedik el, csupán 9,5%-ban látható a sejtfelszín alatti, lefűződött caveolákban illetve 6,5% caveola csoportokban. A teljes caveolin-1 mennyiségnek 11,5%-a a citoplazmában, további 26% a multivezikuláris testek vezikuláinak membránján található. 30 perc, 4nM okadánsav kezelést követően a plazmamembrán caveolin-1 mennyisége jelentősen csökken (31%), ezzel párhuzamosan a megnövekszik a lefűződött vezikulák membránjában található össz caveolin-1 mennyisége (22,5%).

92

Töményebb, 100nM okadánsav hatására ugyanez a tendencia tapasztalható: a plazmamembrán caveoláiban a caveolin-1 30,5%-a, míg a lefűződött caveolákban 22%- a mutatható ki. A multivezikuláris testekben jelenlévő caveolin-1 mennyisége 4nM, illetve 100nM okadánsavval történő kezelést követően a nem kezelt sejtekhez képest lényegesen nem változik.

#### V. táblázat

**Caveolin-1 százalékos eloszlása HepG2 sejtek különböző kompartimentumaiban.** Okadánsav kezelés után a plazmamembrán caveoláinak száma szignifikánsan csökkent, a lefűződött caveolák száma jelentősen megnövekedett. Az anti-CD63 ellenanyaggal azonosított endoszómák (multivezikuláris testek) caveolin-1 mennyiségét az okadánsav kezelés nem befolyásolta.

	nem kezelt sejt (kontroll)	4nM okadánsav	100nM okadánsav
plazmamembrán caveolák	45%	31%	30,5%
lefűződött caveolák	9,5%	22,5%	22%
caveola csoportok / "caveoszómák"	6,5%	9%	12%
CD63 jelölt multivezikuláris test	26%	25%	22%
citoplazma	11,5%	10,5%	11,%
mitokondrium, sejtmag	2,5%	2%	2,5%

Összehasonlítva tehát a caveolin-1/CD63 kettősen jelölt, valamint a csak anti-CD63-al jelölt multivezikuláris testek számát megállapíthatjuk, hogy a 4 illetve 100nM okadánsavval kezelt sejtekben a csak CD63 pozitív multivezikuláris testek száma nőtt, de a kontroll sejtekhez képest a caveolin-1/CD63 kettős jelölést mutató struktúrák számában szignifikáns eltérés nem mutatkozott (38. ábra).



**38. ábra: A caveolin-1 pozitív multiveziluláris testek számának változása okadánsav kezelés hatására.** *Morfometriai eredményeink azt mutatják, hogy az okadánsav kezelés után az anti-caveolin-1/anti-CD63 ellenanyaggal kettősen jelölt multivezikuláris testek száma (kék oszlopok) szignifikánsan nem változik, bár a CD63-jelölt multivezikuláris testek száma (bordó oszlopok) is nő. SD>0.005* 

# 7.2.2. A caveolák lefűződésének stimulálása albuminnal; a caveolin izoformák eloszlásának változása

A szerin-treonin foszfatázgátló okadánsavról ismert, hogy számos jelátviteli útvonalat befolyásol, így egyidejüleg a caveolák lefűződését több ponton befolyásolhatja. Nem tudjuk tehát, hogy az okadánsav milyen útvonalon, milyen mechanizmus(ok) révén indukálja a caveolák internalizációját. A caveolák közreműködésével végbemenő felvételi folyamat egyes lépéseinek tisztázása céljából hasznosabbnak látszott olyan ligand alkalmazása, amelynek a caveolák lefűződését kiváltó hatása specifikusabb. Az endotélsejtekben egy természetes ligand, az albumin, a caveolin-1 tirozin foszforilációját, és ennek következményeként a caveolák lefűződését stimulálja (Minshall 2003, Shajahan 2004). Amennyiben az albumin HepG2 sejtekben is fokozza caveolák internalizációját, mód nyílhat a caveolák (és az albumin) citoplazmatikus sorsának nyomonkövetésére is. Mindezek figyelembe vételével további kisérleteinkben a HepG2 sejtek albumin felvételét vizsgáltuk. Albuminnal rövidebb és hosszabb ideig inkubáltuk a sejteket. A rövid idejű internalizációs vizsgálatainkat három kísérleti csoportban végeztük. Az első kísérleti csoportban a sejtjeket 30mg/ml albuminnal (15 perc), a másodikban egy tirozin-foszfatáz gátlóval, nátriumortovanadáttal (10µM, 15 perc) kezeltük. A harmadik csoportban a HepG2 sejteket a nátrium-ortovanadátos (15 perc) előkezelés után 30mg/ml albuminnal 15 percig inkubáltunk, 10µM nátrium-ortovanadát jelenétében. A hosszabb idejű kísérleteinkben 1 és 3 órás inkubációs időket választottunk.

#### 7.2.2.1. Konfokális és elektronmikroszkópos vizsgálatok

Fedőlemezre tapasztott sejteken a fent leírt kezeléseket követően anti-caveolin-1 ellenanyaggal fluorescens immunjelölést végeztünk. Nem kezelt sejtek konfokális mikroszkópos képein (39. A ábra) a plazmamembránt apró pontok formájában kirajzoló caveolin-1 jel a sejtfelszíni caveolák jelenlétére utal. Mind a 15 perces 30mg/ml albumin (39. B ábra), mind a 10µM nátrium-ortovanadát kezelés hatására (39. C ábra) a citoplazmában néhány nagyobb, fluoreszkáló aggregátum jelenik meg. Ezek az eredmények hasonlóak a 30 perces, 4nM okadánsavval történt kezelést követően észlelt változásokhoz (32. D ábra). Ha a sejteket 15 perc, 10µM nátrium-ortovanadátos

előkezelés után, nátrium-ortovanadát jelenlétében további 15 perc, 30mg/ml koncentrációjú albuminnal kezeltük (39. D ábra), a plazmamembránhoz közeli citoplazma területeken nagy csoportokat formáló, a caveolin-1 jelenlétére utaló fluorescens jel látható.



nátrium-ortovanadát és albumin kezelés

39. ábra: Albumin és nátrium-ortovanadát kezelés hatása a caveolin-1 eloszlására HepG2 sejtben. (Zöld: caveolin-1; kék: sejtmag.) A. kontrol) A caveolin-1 jelenlétét mutató flurescens jel a plazmamembránon illetve a citoplazmában finom eloszlásban helyezkedik el. B.) 30mg/ml albumin hatására nagyobb fluorescens aggregátumok jelennek meg a sejtek citoplazmájában. C.) Nátrium-ortovanadát kezelés a B képhez hasonló eloszlást eredményez. D.) Nátrium ortovanadáttal végzett előkezelést követő albumin inkubáció hatására a plazmamembránhoz közeli területeken tömör fluorescens aggregátumok (nyilak) mutatják a caveolin-1 fehérje elhelyezkedését.



40. ábra: HepG2 sejtekről készült elektronmikroszkópos felvételek nátriumortovanadát előkezelést követő albumin inkubáció után. A.) A plazmamembránnal (pm) vékony membráncsatorna segítségével (nyilfejek) kapcsolatban álló, caveola méretű vezikulákkból felépülő, szőlőfürt-szerű struktúra figyelhető meg. B.) A sejtfelszín közelében számos lefűződött caveola (nyilak) látható. m: mitokondrium; mvb: multivezikuláris test. Bar:0 2µm

Ezen kísérletek eredményeinek finomabb részleteire adnak felvilágosítást elektronmikroszkópos vizsgálataink: a caveolák intenzív lefűződésére utaló, szőlőfürtszerűen rendezett, caveola méretű vezikulákból álló csoportok is megfigyelhetők (40. A ábra), a citoplazma plazmamembrán alatti területein egyedi, lefűződött vezikulák láthatók (40. B ábra). A konfokális mikroszkópos képeken látottakkal összevetve ezek a nagy citoplazmatikus caveola-csoportok valószínűséggel a fluorescens aggregátumoknak felelnek meg (39. D ábra). Elektronmikroszkópos megjelenésük alapján e strukturákat nevezi az irodalom caveosomáknak. Egyes esetekben azonban jól látható, hogy e szőlőfürt-alakú caveola-csoport megtartja kapcsolatát а plazmamembránnal (40. A ábra).

# 7.2.2.2. Okadánsav, albumin és nátrium-ortovanadát kezelés hatása a caveolin foszforilációjára HepG2 sejtekben

Okadánsav, albumin valamint nátrium-ortovanadát kezeléseket követően HepG2 sejtek lizátumából, anti-caveolin-1 ellenanyaggal immunprecipitációt, majd ezt követően anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blot analízist végeztünk (41. ábra). Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy 4 illetve 100nM okadánsav kezelést követően az immunprecipitátumokban tirozin foszforiláció szintje a kezeletlen sejtekhez képest csak elenyésző mértékben emelkedett. 15 perc albuminnal vagy nátriumortovanadáttal történő inkubáció hasonlóan csekély változást eredményezett.

Makrofágokkal végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott okadánsav koncentrációjának függvényében egy ~29kDa molekulatömegű, feltételezhetően caveolin-2 izoforma erőteljesen foszforilálódik a tirozin aminosavcsoportokon. Felvetődik a kérdés, hogy vajon az internalizációt indukáló rövid idejű kezelések, valamint a tirozin-foszfatáz gáltó ortovanadát hatására HepG2 sejtekben is hasonlóan változik-e valamelyik caveolin izoforma tirozin foszforilációjának mértéke. A kérdés megválaszolása céljából HepG2 sejtek lizátumából anti-caveolin-1 illetve anticaveolin-2 ellenanyaggal immunprecipitációt, majd ezt követően követően anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blot analizist végeztünk. Eredményeink azt mutatták, hogy HepG2 sejtekben az okadánsav kezelések hatására mind a caveolin-1, mind pedig a caveolin-2 izoforma tirozin-foszforilációjának szintje kis mértékben emelkedik.



**41. ábra: Western blot analízis anti-caveolin-1 ellenanyaggal végzett immunprecipitációt követő anti-foszfotirozin ellenanyaggal.** Okadánsavval (A panel), ill. albuminnal és/vagy nátrium-ortovanadáttal (B panel) kezelt HepG2 sejtekben kis mértékben emlekedett a caveolin-1 tirozin-foszforilációjának mértéke

# 7.2.3. A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai HepG2 sejtekben

A caveolák közreműködésével végbemenő endocitózis lassú folyamat, amelyet a jelen lévő ligand indukál. A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásainak azonosítása, valamint az internalizált caveolák sorsának nyomon követésére céljából a HepG2 sejteket a caveolák lefűződését specifikusan indukáló albuminnal hosszabb ideig (1 és 3 óra) inkubáltuk. A következő lépésben kísérleteim során arra kerestem a választ, hogy mi lesz a lefűződött caveolák (és a caveolin-1) sorsa, milyen útvonalon, milyen citoplazmatikus organellumok közvetítésével, érintésével vándorolnak a sejtben. Igaz-e az az állítás, hogy a caveola-mediált endocitózis organellumai önálló, a klasszikus clathrin burkos felvételi folyamat organellumaitól teljesen eltérő citoplazmatikus struktúrák, avagy a két útvonal állomásai kapcsolatba kerülhetnek egymással.

#### 7.2.3.1. Morfológiai és morfometriai vizsgálatok

a.) A plazmamembránon jelenlévő, illetve az internalizált caveolák számának változása albumin kezelés hatására

Kísérleteinkben olyan sejteket használtunk kontrollként, amelyeket albuminmentes tenyésztői médiumban neveltünk. 24 órás albumin megvonás hatására HepG2 sejtek plazmamembránján jelen lévő caveolák száma erősen lecsökkent (42. ábra). Ha az albumin megvonást követően 30mg/ml albuminnal 1 órát inkubáltunk (43. ábra), a plazmamembránon jelenlévő caveolák száma ugrásszerűen megnőtt. 3 órás albumin kezelés nem növelte tovább a sejtfelszinen jelenlévő caveolák számát, azonban a plazmamembrán alatti citoplazmában nagyobb mennyiségben voltak jelen zárt, lefűződött caveolák. A hosszabb idejű albumin-kezelést követően az egyedi, lefűződött vezikulák mellett caveola-aggregátumok, caveola-csoportok is nagy számban figyelhetők meg a plazmamembránhoz közeli citoplazmában (44. ábra). Egyes caveolacsoportok morfológiájuk, illetve membránjuk caveolin-1 tartalma alapján az irodalomban leírt caveoszómaknak felelnek meg (44. A, B és C ábra). Fagyasztott ultravékony metszeten anti-caveolin-1 és anti-albumin ellenanyaggal végzett kettős jelölést követően az internalizált albumint nem csak a lefűződött egyedi caveolákban, hanem ezekben a caveola-csoportokban, illetve caveosoma-szerű struktúrákban is megfigyelhetjük. (44. C ábra) Ezen caveoszóma-szerű struktúrák némelyike vékony membráncsatorna révén a plazmamembránnal kapcsolatban áll (44. A ábra), azonban láthatók olyanok is, melyek a plazmamembrántól szabadon, önálló sejtalkotóként azonosíthatók (44. A és C ábra). Morfometriai vizsgálataink kvantitatív adatokkal támasztják alá elektronmikroszkópos megfigyeléseinket (45. ábra). 1 órás albumin inkubációt követően a plazmamembránon számolható, valamint a plazmamembrán alatt látható zárt, lefűződött caveolák mennyisége a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan megnövekedett, 3 óra múlva kismértékű, további növekedést tapasztaltunk. A clathrinburkos vezikulák száma nem változott albumin jelenlétében, számukat, megjelenésüket tehát az albumin inkubáció nem befolyásolta.



42. ábra: Fagyasztott ultravékony metszeten végzett caveolin-1 (10nm aranyszemcse) immunjelölés albumin megvonást követően. A.) és B.) HepG2 sejtek plazmamembránján (pm) 24 órás albumin megvonást követően a caveolák (nyilak) száma jelentősen csökken (pm). A multivezikuláris testek (mvb) nem jelölődtek anti-caveolin-1 ellenanyaggal. Bar: 0.2µm



43. ábra: Fagyasztott ultravékony metszeten végzett caveolin-1 (10nm aranyszemcse) immunjelölés albumin inkubációt követően. A.) 1 óra albumin inkubáció után számos caveola (nyilak) jelent meg a plazmamembránon (pm). Lefűződött caveolák csoportja (\*) figyelhető meg a sejtfelszínhez közeli citoplazmában.
B.) Multivezikuláris testben caveolin-1 detektálható (mvb). N: sejtmag; cc: clathrinburkos vezikula. Bar:0.2µm



**44.** ábra: Albumin inkuáció hatására megjelenő caveola-csoportok HepG2 sejtekben. A.) A szőlőfürt formájú, caveosoma-szerű caveola csoport egy vékony membráncsatorna (nyílhegyek) segítségével kapcsolatban áll a plazmamembránnal (pm), mellette caveosomaként leírt struktúra (c). B.) E szőlőfürt formájú képletek nem jelölődnek anti-CD63 ellenanyaggal (a látható aranyszemcsék csak a caveolin-1 jelölést mutatják). C.) Caveolin-1 (15nm aranyszemcse) mellett ezen caveola csoportokban (\*), és caveoszóma-szerű struktúrákban a caveolák által felvett albumin (10nm aranyszemcse) kimutatható. N: sejtmag. Bar: 0.2μm



**45. ábra:** A sejtfelszíni és lefűződött caveolák számának változása hosszabb idejű albumin kezelés hatására. Az albumin megvonás (kontroll) hatására detektálható caveolák mennyiségéhez képest a plazmamembrán caveoláinak száma szignifikáns emelkedést mutat 1 illetve 3 óra albuminkezelés után. Albumin jelenlétében a lefűződött caveolák száma is emelkedik. A clathrin-burkos vezikulák megjelenésére albumin hiánya illetve jelenléte nem volt hatással. (\*, \*\*: p<0,005 a kontrolhoz (0h albumin) képest)

#### b.) Caveoszóma: lenni vagy nem lenni?

Elektronmikroszkópos felvételeinken jól láható, hogy a caveolák internalizációját követően a plazmamembránhoz közeli citoplazma területeken az irodalomban caveoszómaként leírt képletek közül számos vékony membráncsatorna segitségével a plazmamembránnal kapcsolatban áll. Ezek a felvételek felvetik annak lehetőségét, hogy az elektronmikroszkópos képeken önálló organellum képében megjelenő struktúrák talán nem is a membrántól független, lefűződött organellumok, sejtmembrántól független megjelenésük csupán a metszési sík eredménye. Annak eldöntésére, hogy valóban kapcsolatotban vannak-e a sejtfelszínnel, egy, a plazmamembránt jelölő extracelluláris markert, Ruténium-vörös festéket alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a legtöbb szőlőfürt-szerű képlet Ruténium- vörössel jelölődött (46. ábra), amely egyértelműen bizonyítja, hogy nyitott, a sejtfelszínnel még kapcsolatban álló struktúrák. Egyes esetekben a Ruténium vörös jelölés nagyon gyenge, csak néhány festékszemcse látható a nagy nagyítású képeken (46. B ábra) jelezvén, hogy a felszínnel kapcsolatot tartó membráncsatorna valószínűleg nagyon szűk. Fagyasztott ultravékony metszeteken számos esetben dinamin jelenlétét detektáltuk ezen tubuláris membrán invaginációk mentén.

#### c.) A lefűződött caveolák sejten belüli útja

Normál tenyésztési feltételek között, 10% FBS tartalmú médiumban nevelt HepG2 sejtekben számos késői endoszóma figyelhető meg. A késői endoszómák megjelenésük alapján multivezikuláris testek, melyek képesek lizoszómákkal való fúzióra, bennékük a lizoszómális emésztés áldozatául esik. Jellemző morfológiai bélyegeik mellett azonosításukat a belső membránokban kimutatható markerük, a CD63 (LIMP1, lizoszóma integráns membrán protein 1) fehérje is segíti. Albumin kezelés hatására a kontroll sejtekhez képest megnövekedett azon multivezikuláris testek száma, melyek anti-CD63 és anti-caveolin-1 ellenanyaggal kettősen jelölődtek (48.ábra). Érdemes megjegyeznünk, hogy ezen sejtelkotókban anti-albumin ellenanyaggal albumin nem mutatható ki.

Morfometriai vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy albumin kezelés hatására a kettősen jelölt multivezikuláris testek nagy számban jelennek meg a HepG2 citoplazmájában, számuk az alkalmazott inkubáció idejével egyenes arányban nő. 3 órás albumin inkubáció után a kontroll csoporthoz képest a különbség statisztikailag szignifikáns (47. ábra). Ha a caveolin-1 jelenlétére utaló kolloidális aranyszemcsék eloszlását vizsgáljuk a különböző sejtkompatimentumokban (VI. táblázat), azt tapasztaljuk, hogy albumin-kezelés után több caveolin-1 mutatható ki a lefűződött caveolákban, illetve a caveoszómákra emlékeztető képletekben. Az albumin inkubáció idejével egyenes arányban egyre több aranyszemcsét detektálhatunk a CD63 jelölést mutató multivezikuláris testekben is (47. ábra)



**46. ábra:** A sejtfelszín jelölése Ruténium-vörös festékkel. A.) A Ruténium-vörös festék megjelöli a plazmamembrán (pm) nyitott caveoláit (nyilak), valamint a sejtfelszín közelében elhelyezkedő, morfológiailag caveoszómaként azonosítható képletet is. B.) Ezen képletekben, egyes esetekben csak nagyon kevés mennyiségű Ruténium-vörös festékszemcse látható (nyílfejek). A Ruténium vörös jelenléte azonban egyérterlműen arra utal, hogy ezek a struktúrák a felszínnel összeköttetésben állnak. Pm: plazmamembrán, cc: clathrin-burkos vezikula Bar: 0.5μm

### VI. táblázat

Caveolin-1 százalékos eloszlása a különböző sejt-kompartimentumokban hosszú idejű albumin internalizációt követően. (szemikvantitatív vizsgálat)

	0 perc albumin	60 perc albumin	180 perc albumin
plazmamembrán	22,6%	18,75%	15%
lefűződött caveolák	13,3%	18,01%	24,5%
lefűződött caveolák	5,1%	9,8%	7,2%
alkotta caveola-csoport			
("caveoszóma")			
CD63-jelölt késői	30,2%	32,72%	39,73%
endoszómák			
citoplazma	20%	12,8%	12,24%
mag	4%	3,8%	1%
mitokondrium	4%	3,67%	1%



**47. ábra:** Albumin inkubáció hatása a caveolin-1 tartalmú multivezikuláris testekre. Morfometriai analízisünk szerint 1 és 3 órás albuminkezelést követően caveolin-1 és CD63 tartalmú multivezikuláris testek száma (kék oszlopok) albumin hatására szignifikánsan emelkedik. (\*:p<0,005 az albuminmegvonás (0 h albumin) utáni állapothoz képest.)



**48. ábra: Caveolin-1 tartalmú multivezikuláris testek jelenléte HepG2 sejtekben albuminkezelés után.** Albumin inkubációt követően a CD63 (10nm aranyszemcse) markerrel azonosított multivezikuláris testek (mvb) mellett caveolin-1 (15nm aranyszemcse, nyilak) tartalmú multivezikuláris testek (mvb\*) is láthatók. pm: plazmamembrán; ly: lizoszóma, N: sejtmag. Bar: 0.5µm
Ezen morfológiai és morfometriai eredményeink azt sugallják, hogy az albumin indukálta internalizáció a caveolin-1 fehérjét a klasszikus endocitózis állomásai - késői endoszómák (multivezikuláris testek) - felé irányítja.

d.) A caveolin-1 megoszlása a különböző membránfrakciókban albumin kezelés után

Biokémiai vizsgálatainkhoz HepG2 sejtekből plazmamembránt illetve intracelluláris membránokat izoláltunk Smart (1995) és Conrad (1995) módszere alapján. A membránizolátumok frakcióinak caveolin-1 tartalmát Western blot analízissel vizsgáltuk (49.ábra). A kontrol sejtekből izolált plazmamembránban kimutatható caveolin-1 mennyiségéhez képest (A panel, *Oh alb*) 1 óra albumin inkubáció a caveolin-1 tartalom szignifikáns növekedését eredményezte (A panel *1h alb*). Hosszabb, 3 óra albumin inkubáció (A panel *3h alb*) után csak kis mértékben nő a plazmamembrán caveolin-1 szintjét. Az intracelluláris membránok (beleértve a multivezikuláris testek membránjait is) caveolin-1 tartalma (B panel) 1 órás albumin inkubáció után a kezeletlen sejtekhez képest megnövekedett (B panel *1h alb*), 3 órás inkubáció után (B panel *3h alb*) azonban lecsökkent (jelezvén, hogy a caveolin-1 fehérje feltehetőleg lizoszómákba kerül, ahol lebomlik).

A fenti adatok azt mutatják, hogy 3 órával az internalizáció megindulásása után a caveolin-1 fehérje degradálódik, azonban a plazmamembránban (A panel *3h alb*) a fehérje mennyisége, és elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján a sejtfelszíni caveolák száma magas. Annak eldöntésére, hogy a caveolák plazmamembránon való pótlása *de novo* fehérjeszintézis eredménye-e, transzlációt gátló vegyületet, a cycloheximidet használtunk (Lusska és mtsai 1992). A fehérjeszintézis gátlással egyidejüleg a caveolák lefűződését albuminnal indukáltuk.  $200\mu$ g/ml cycloheximiddel gátolva a fehérjeszintézist, 1 óra múlva a plazmamembrán (A panel *1h alb+cyc*) illetve az intacelluláris membránok frakcióiban (B panel *1h alb+cyc*) a caveolin-1 fehérje mennyisége a kontroll sejtekéhez viszonyítva még magas. 3 órás szimultán albumin és cycloheximid kezelés azonban mindkét membránfrakcióban szignifikánsan csökkentette a caveolin-1 mennyiségét (A és B panelek *3h alb+cyc*).



**49. ábra:** A caveolin-1 eloszlása a plazmamembrán és az intracelluláris membrán frakciókban. A plazmamembrán caveolin-1 tartalma megnövekedett 1 illetve 3 óra albuminkezelést követően. A fehérje mennyiségében jelentős csökkenést tapasztaltunk akkor, ha a sejteket albumin jelenlétében 3 óra cycloheximid kezelésben részesítettük. (3h alb+cyc) Az intracelluláris membránokat tartalmazó frakció (Golgi hálózat, endoplazmás retikulum, endoszómák, multivezikuláris testek és lizoszómák membránjai) caveolin-1 tartalma 3 órás albuminkezelés után csökkent. A caveolin-1 fehérje mennyisége a postnukleáris (össz-membrán) felülúszóban cycloheximid kezelés hatására csökken (3h alb+cyc). Az utolsó panelen igazoltuk a membránfrakció eredetét a HepG2 plazmamembrán markere ellen termeltetett, anti-syndecan-1 (CD138) ellenanyaggal. A plazmamembrán frakciókban (PM) syndecan-1 detektálható, míg az intracelluláris membránokból (IM) az a fehérje hiányzik.

# 8. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

#### 8.1. A caveolák és caveolin izoformák peritoneális makrofágokban

A makrofágok a mononukleáris fagocita rendszer legfontosabb, differenciált elemei, amelyek mind funkcionálisan, mind pedig eredetüket illetően meglehetősen heterogén sejtpopulációt képviselnek (Ginsel, és mtsai 1985 és 1986; Ginsel 1993). A külső környezeti tényezők hatására aktivitásuk változik: rezidens, "nyugvó" (szöveti) makrofágokból, elicitált és aktivált fagocitasejtekké alakulhatnak át (Van Furth és mtsai, 1972; Van Furth 1988). Makrofágok endocitózisra, fagocitózisra differenciálódott sejtek, könnyen izolálhatók a hasüregből, foszfát pufferes mosást követő diszkontinuus grádiens-centrifugálással (Hester és mtsai 1981). Kiváló objektumok az endocitózis folyamatának morfológiai és biokémiai tanulmányozására, az endocitotikus folyamatok lépéseinek feltérképezése elengedhetetlenül szükséges az immunfolyamatokban játszott szerepük megértéséhez.

Régóta ismert, hogy rezidens makrofágokban a clathrin-burkos vezikulák kulcs szerepet játszanak az immunkomplexek felvételében, amely Fc-receptorok segítségével megy végbe (Kiss és Röhlich 1984). Ha azonban K<sup>+</sup>-deplécióval a clathrin-burkos vezikulumok keletkezését gátoljuk (Larkin és mtsai, 1983), és a HRP (fluid fázisos felvétel) ill. immunkomplex (receptor-mediált endocitózis) felvételét vizsgáljuk, azt tapasztaljuk, hogy a K<sup>+</sup>-depletált makrofágok felszínén a HRP és PAP sima felszínű, clathrin burokkal nem rendelkező, omega-ill. palack alakú membrán invaginációkban akkumulálódik (Kiss és mtsai 2002). Ezen membrán-invaginációk megjelenésükben, morfológiájukban nagyon hasonlítanak a caveolákhoz, amelyek számos sejttípusban igen nagy számban figyelhetők meg a sejtmembránon. Ez a megfigyelés, valamint az az irodalmi adat, amely szerint a limfociták sejtmembránján nincsenek jelen caveolák (Fra és mtsai 1995) irányította a caveolák felé érdeklődésünket. A kérdés tehát az volt, hogy ezek a vezikulumok csak K<sup>+</sup>-depléció hatására jelennek meg a makrofágok sejtmembránján, vagy pedig a makrofágok sejtfelszínén meglévő, a makrofágokra jellemző struktúrák. A probléma felvetése különösen izgalmas volt, mivel nem voltak eredmények, adatok arra vonatkozóan, hogy a monocita/makrofág rendszerhez tartozó sejtek membránján jelen vannak-e a caveolák. Munkánk első szakaszában tehát arra kerestünk választ, hogy a makrofágok sejtfelszínén valóban jelen vannak-e a caveolák. Ebből a célból alapos és részletes morfológiai és morfometriai vizsgálatokat végeztünk rezidens és elicitál makrofágok sejtfelszínén. Elicitált makrofágokat 1ml komplett Freund adjuvánssal kezelt patkányok hasüregéből izoláltunk, az intraperitoneális injekció után 24 órával. Összehasonlítva a rezidens és elicitált makrofágokat, megállapithatjuk, hogy a clathrin-coated vezikulák mindkét sejtben igen nagy számban vannak jelen (10. ábra). Ha azonban gondosan megvizsgáljuk a sejtfelszínt, egy másik, a clathrin-coated vezikuláknál kisebb méretű, jellegzetes omega- ill. palack alakú populációt is megfigyelhetünk, amelyeknek membránján kosár-szerű burok nem látható. A rezidens sejtekben a sejtfelszín labirintikus nyúlványai miatt meglehetősen nehezen észrevehető, csak kis számban jelenlévő struktúrák. Elicitálás hatására azonban számuk igen jelentősen megnő (Kiss és Kittel, 1995). A következő lépésben igazolnunk kellett, hogy ezen palack- ill. omega alakú membrán invaginációk caveolák. Bár az elmúlt tíz évben a caveolák membránjában számos molekulát sikerült kimutatni, egyértelmű azonosításuk a caveolin-1 izoforma jelenléte alapján lehetséges, azaz caveoláknak csak azon membrán invaginációk nevezhetők, amelyek membránjában a caveolin-1 izoforma jelen van. Ezen izoforma kimutatása céljából anti-caveolin-1/VIP21 ellenanyaggal fagyasztott ultravékony metszeteken immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. A sejtfelszínhez kötött ellenanyagot kolloidális arannyal jelölt protein-A-val tettük láthatóvá. Elektronmikroszkópos felvételeinken (12. ábra) arany szemcsék jól láthatóak a felszínnel összeköttetésben lévő omega alakú membrán befűződések membránján, és számos olyan vezikula membránján is, amelyek nincsenek kapcsolatban a sejtfelszínnel (Kiss és Geuze 1997). Ezen eredményeink alapján az irodalomban elsőként megállapítottuk, hogy a makrofágok sejtfelszínén jelenlévő omega-ill. palack alakú membrán invaginációk valóban caveolák. Az a megfigyelésünk, hogy rezidens makrofágokban elenyésző számban vannak jelen, és számuk elicitálás hatására több nagyságrenddel megnő, arra utal, hogy a caveolák megjelenése, kialakulása szigorúan szabályozott folyamat, számuk nagymértékben függ a sejtek fiziológiás állapotától.

Morfológiai eredményeinkből egyértelműen adódik a kérdés: mi lehet az oka annak, hogy rezidens makrofágokban a caveolák alig, vagy csak elenyészően kis mennyiségben vannak jelen a sejtfelszínen, elicitálás hatására azonban számuk megsokszorozódik. Jól ismert, hogy a caveolin-1 izoforma expressziója, jelenléte elengedhetelen és szükséges feltétel ahhoz, hogy a caveolák megjelenjenek, kialakuljanak a sejtmembránon (Fra és mtsai 1995). Ha heterogén, más sejttípusból származó caveolin-1 mRNS-t juttatunk be olyan limfocitákba, amelyekben endogén cavolin-1 mRNS nincs jelen, ezekben a sejtekben caveolin-1 szintetizálódik, és ez önmagában elegendő ahhoz, hogy a caveolák kialakuljanak a sejtmembránon (Fra és mtsai 1995; Li és mtsai 1996). A mofológiai eredményeink alapján kézenfekvőnek tűnik az a feltételezés, hogy a caveolin-1 izoforma expressziója, jelenléte vagy hiánya lehet felelős azért, hogy caveolák nem azonos mennyiségben fordulnak elő a rezidens és elicitált makrofágok sejtfelszínén. Felmerült tehát az a kérdés, hogy rezidens és elicitált makrofágokban milyen izoformák expresszálódnak, illetve változik-e az egyes izoformák expressziója elicitálás hatására. A kérdés megválaszolása céljából Western blot analízist és immunprecipitációt végeztünk. Western blot vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy rezidens makrofágokban a cveolin-1 izoforma csak nagyon kis mennyiségben van jelen, elicitálás hatására azonban ezen izoforma expressziója jelentősen megnő. Meglepő módon egy, a caveolin-1 izoformánál nagyobb, kb. 29 kDa molekulatömegű fehérjét is sikerült azonosítanunk, amely anti-caveolin-1/VIP21 ellenanyaggal jelölődött, és bár ez a fehérje elicitált makrofágokban is detektálható, úgy tűnik, hogy rezidens makrofágokban nagy mennyiségben van jelen, jelenléte, expressziója a rezidens makrofágokra jellemző. Ezen 29 kDa molekulatömegű fehérje további karakterizálása céljából az egyes caveolin izoformák ellen termeltetett ellenanyagok alkalmazásával immunprecipitációt és Western blot amalízis végeztünk. Eredményeink azt mutatták, hogy ez a fehérje monoklonális anti-caveolin-2 ellenanyaggal jelölődik. Ha ugyanezzel az ellenanyaggal, azaz anti-caveolin-2-vel immunprecipitációt végeztünk, csak ezt a kb. 29 kDa molekulatömegű fehérjét sikerült azonosítanunk az immunprecipitátumban. A kérdés ezután az volt, mi is lehet ez a ~29 kDa fehérje? Nem zárható ki, hogy makrofágokban a caveolin expressziója során módosulások történnek, amelyek nagyobb molekulatömegű fehérje kialakulását eredményezik. Logikusnak tűnik azonban az az elképzelés is, hogy ez a fehérje egy új, makrofág-specifikus caveolin-asszociált fehérje, esetleg egy caveolin izoforma lenne. Bár ez a fehérje a poliklonális anti-VIP21/caveolin-1 ellenanyaggal jelölődött, monoklonális anti-caveolin-1 ellenanyaggal azonban nem. Immunprecipitációs eredményeink egyértelműen azt igazolják, hogy ez a fehérje a makrofágokban előforduló caveolin-2 izoformának felel meg. Az irodalomban *elsőként sikerült tehát igazolni, hogy rezidens makrofágok jellegzetes caveolin izoformája a caveolin-2.* Kísérleti eredményeink publikálása után Macekova és munkatársai (2015) igazolták, hogy a csontvelő eredetű makrofágok kizárólag caveolin-2 izoformát expresszálnak, amely fontos szerepet játszik a pro-inflammatorikus válaszok szabályozásában.

Ezt követően arra voltunk kiváncsiak, hogy az egyes izoformák ellen termeltetett ellenanyagokkal jelölődő caveolin milyen sejtalkotókban van jelen a rezidens és az elicitált makrofágokban. Mind a konfokális mind pedig az elektronmikroszkópos felvételeink azt mutatják, hogy rezidens makrofágokban a caveolin (1 és 2 izoforma egyaránt) a citoplazmában, elsősorban a Golgi készülék környezetében, nagyobb vakuolumokban, multivezikuláris testekben van jelen. Néhány esetben találtunk caveolin jelenlétére utaló kolloidális arany szemcsét a sejtmembránon is, azonban soha nem caveolákban, ill. caveola-szerű membrán invaginációban. Az elicitálás eredményeként a cavolák száma a sejtmembránon jelentősen megnő (Kiss és Kittel, 1995; Kiss és Geuze 1997). Fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett immuncitokémiai vizsgálatlaink azt mutatják, hogy ezekben a sejtekben a caveolin elsősorban a sejtmembránon detektálható. A felszínnel összeköttetésben álló omega- ill. palack alakú membrán invaginációk, valamint a citoplazmában jelenlévő, a sejtfelszínről már lefűződött vezikulumok benyomását keltő struktúrák is intenzíven jelölődtek caveolin-1 ellen termeltetett ellenanyaggal. Ezzel szemben caveolin-2 a citoplazmában, a Golgi készülék környezetében jelenlévő kisebb vezikulumokban, ill. multivezikuláris testekben azonosítható.

Mivel magyarázható tehát, hogy rezidens makrofágokban nincsenek jelen (ill csak elvétve azonosíthatók a caveolák? Irodalmi adatokból ismert, hogy a caveolin-1 expressziójának mértéke közvetlenül felelős a caveolák kialakításáért. A caveolák kialakulása során első lépésben caveolin-1 homo-oligomerek keletkeznek, úgy, hogy az egyik caveolin-1 izoforma kölcsönhatásba lép a másik caveolin-1 N-terminális doménjével (Sargiacomo és mtsai 1995), míg a molekula C-terminális része hídként funkcionál, két ciszteinjéhez zsírsav (általában palmitinsav) kapcsolódik, amellyel ez a domén a plazmamembránhoz rögzül. Ily módon caveolinben gazdag "scaffold"-ok

dc\_1278\_16

jönnek létre (Tang és mtsai 1994). Bár a caveolin-2 elsősorban monomerekben fordul elő (Scherer és matsai 1996), a két caveolin (caveolin-1 és caveolin-2) egymással összekapcsolódva hetero-oligomert is létrehozhat (Scheiffele és mtsai, 1998). Feltételezik, hogy a caveolin-2 mint "járulékos fehérje" részt vehet a caveolák kialakulásában, de önmagában soha nem képes a caveolák kialakításra. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy miután a caveolin-1 izoforma nem, illetve csak nagyon kis mennyiségben expresszálódik rezidens makrofágokban, ezekben a sejtekben a caveolák kialakulásának egyik lényeges, elengedhetetlen feltétele hiányzik. Bár a *caveolin-2* izoforma nagy mennyiségben van jelen rezidens sejtekben, ez az *izoforma önmagában nem elegendő a caveolák kialakításához*. Elicitálás hatására a caveolin-1 expressziója igen jelentősen megnő, amely a sejtfelszínen caveolák megjelenését indukálja.

Makrofágokon elvégzett kísérleteink eredményei azt sugallják, hogy a caveolák kialakulása, megjelenése a sejtmembránon egy szigorúan szabályozott folyamat, amely elsősorban a caveolin expresszió szabályozásán keresztül valósul meg. Annak eldöntése céljából, hogy vajon ez a szabályozás a transzláció vagy pedig a transzkripció szintjén történik-e RT PCR analízist végeztem. Mind a rezidens, mind pedig az elicitált makrofágokban ugyanolyan méretű (368 bp) RT PCR terméket sikerült azonosítani. Úgy tűnik, azonban, hogy ez a 368bp termék nagyobb mennyiségben expresszálódik az elicitált makrofágokban. Eredményeim alapján úgy vélem, hogy a szabályozás transzkripció szintjén valósul meg. Ezen RT PCR termék szekvenciáját összehasonlítva a már ismert caveolin mRNS szekvenciákkal (humán, patkány, kutya, csirke,) 80-100%-os homológiát találtunk.

#### 8.2. A caveolák szerepe makrofágokban

Az egyes sejttípusok plazmamembránján jelenlévő caveolák feladata még ma sem teljesen tisztázott. Nincsenek egyértelmű bizonyítékok arra vonatkozóan sem, hogy a különböző sejtekben előforduló caveolák azonos feladatot látnak-e el, avagy működésük sejttípustól függően eltérő. Az eddig rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján meglehetősen heterogén funkcióval rendelkeznek. Magas lipid és koleszterin tartalmuk következményeként a caveolák erősen hidrofób, merev, rigid membrán domének. Sokáig tartotta magát az az elképzelés, hogy a sejtmembrán immobilis képletei, amelyek semmilyen körülmények között sem fűződnek le a sejtmembránról. Az elektronmikroszkópos felvételeken a caveolák változatos megjelenési formája, a szűk nyakú, csaknem teljesen zárt, nyitottabb, sekélyebb öblök, membrán befűződések egyidejű előfordulása erőteljesen sugallja, hogy ezen membrán invaginációk dinamikus, alakjukat változtató, tehát a sejtmembránról lefűződő strukturák. Az utóbbi időben megjelent publikációk azt is sugallják, hogy a caveolák változatos megjelenési formája (sekélyebb membrán invaginációk, vagy majdnem tejesen lefűződött omega- illetve palack alak) a sejten belüli nyomásváltozások eredménye, és a caveolák nyomás változásokat pufferoló rendszert képvisel(het)nek a plazmamembránon. A stressz filamentumokhoz való kapcsolódásuk révén, a nyomásváltozások alatt, lokálisan regulálják a stressz filamentumokkal kapcsolatos jelátviteli útvonalakat (elsősorban a RhoA jelátvitelt), molekuláris kapcsolatot biztosítva a mechanotranszdukciós utak és az aktin-irányította változások között. Ilyen módon biztosítják a sejtek stressz-tűrő képességét, anélkül, hogy a membrán integritása megváltozna (Echarri és mtsai 215).

Ha a caveolák a membránról lefűződnek, akkor feltehetően szerepük van a sejtek felvételi folyamataiban (Cupers és mtsai 1994). Munkám során tehát választ kerestem arra a kérdésre, hogy vajon a caveolák részt vesznek, részt vehetnek-e a professzionális fagocita sejtek, a makrofágok endocitotikus folyamataiban. Ebből a célból a fluid fázisos és receptor-mediált endocitózist vizsgáltam rezidens és elicitált makrofágokban (Kiss és Kittel 1995). Ha kvantitatív (spektrofotometriás) méréssel összehasonlítjuk a rezidens és elicitált makrofágok által felvett HRP (fluid fázisos marker) és a PAP immunkomplex (receptor-mediált endocitózis) mennyiségét, azt tapasztaljuk, hogy az elicitált sejtek lényegesen nagyobb mennyiségben vesznek fel peroxidázt és immunkomplexet is, mint rezidens társaik. Fluid fázisos felvétel során különösen a felvételi folyamat korai szakaszában (5 perc) észlelhető jelentős különbség. Elicitált makrofágok kétszer annyi immunkomplexet kötnek a sejtfelszinükön, mint a rezidens sejtek. A fluid fázisos felvételi folyamat során tapasztaltakhoz hasonlóan, az elicitált makrofágok a receptor-mediált endocitózis korai (2 perc) szakaszában vesznek fel nagyobb mennyiségű immunkomplexet, jelezvén, hogy a korai időpontokban állnak rendelkezésre olyan struktúrák, amelyek közreműködésével ezek a sejtek képesek nagyobb mennyiségű anyagokat felvenni a környezetükből. A kérdés tehát az volt, hogy

van-e összefüggés az elicitált makrofágok megnövekedett endocitotikus aktivitása, és a caveolák számának jelentős növekedése között, azaz az elicitált makrofágok számban jelenlévő caveolák alternatív sejtmembránján nagy endocitotikus kompartimentumokként részt vesznek-e a felvételi folyamatokban. Hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatokkal és fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett kettős jelöléses immuncitokémiával azonositottuk azokat a vezikulákat, amelyek elsődleges szállítóként szerepelnek mind a fluid fázisos, mind pedig a receptor-mediált endocitózis folyamatában. A HRP és a PAP felvétel korai időpontjaira fókuszálva azt tapasztaltam, hogy mindkét folyamat során a clathrin burkos vezikulák mellett igen nagy számban voltak megfigyelhetők HRP és PAP tartalmú "sima", a membrán citoplazmatikus oldalán kosár-szerű burkot nem tartalmazó, vezikula-szerű struktúrák (Kiss és Kittel 1995, Kiss és Geuze 1997). Kettős jelöléses immuncitokémiai módszerrel ezen vezikulák többsége caveolin-1-el is jelölődött, tehát caveolának bizonyult. Ezen omega- ill. palack alakú, caveolin-1 jelölt vezikulák átmérője 85-90 nm (Kiss és Geuze 1997). Ha a szérum albumin felvételét követően kettős jelöléses immuncitokémiát végeztünk, hasonló eredményt kaptunk: az albumin-tartalmú vezikulák többsége caveolin-1 ellen termeltetett ellenanyaggal is jelölődött (Kiss és Geuze 1997, Kiss és mtsai 2002).

Ezt követően igazolnunk kellett, hogy azok a vezikulák, amelyek már lefűződött, "szabad", a sejtfelszinnel összeköttetésben nem álló struktúrának látszanak, valóban lefűződött vezikulák. A hagyományos elektronmikroszkópos metszetek tanulmányozása során mindig gondolnunk kell arra, hogy a "szabad", lefűződött vezikulának látszó struktúrák valójában összeköttetésben állhatnak a sejtfelszinnel, és az önálló vezikula megjelenés csupán a metszési sík következménye. Joggal merül fel tehát a kérdés, hogy azok a vezikula-szerű képletek, amelyeknek membránnal való összefüggése az adott metszési síkban nem látható, valóban a membránról lefűződött struktúrák-e. Ha azonban sorozat-metszeteket készítünk, és az adott vezikula-szerű struktúra egymást követő néhány metszeten, egyetlen metszési síkban sincs kapcsolatban a sejtfelszinnel, biztosak lehetünk abban, hogy lefűződött, önálló vezikulákat vizsgálunk. Annak bizonyitására tehát, hogy a caveolák a sejtfelszinről lefűződnek sorozat metszeteket készítetünk, és az irodalomban az elsők között sikerült bizonyítanunk, hogy a *caveolák valóban* 

HRP és PAP kimutatható, a módszer alkalmazásával igazoltuk azt is, hogy a caveolák az elicitált makrofágokban az *endocitózisban részt vevő, alternativ szállító kompartimentumok* (Kiss és Geuze 1997).

Napjainkra már széles körben elfogadott nézet, hogy a caveolák a klasszikus, clathrin-burkos vezikulumok közvetitésével végbemenő endocitózissal párhuzamosan, alternatív endocitotikus struktúrákként működnek közre különböző membránkomponensek és az extracelluláris tér molekuláinak felvételében (Anderson és mtsai 1998, Montessano és mtsai 1982, Parton és mtsai 1994, Pelkmans és Helenius 2002., Rothberg és mtsai 1990, Schnitzer és mtsai 1994, Kiss és Geuze 1997; Kiss és mtsai 2002). A caveola-mediált endocitózis azonban nem konstitutív, igen jelentős mértékben szabályozott felvételi folyamat, melyet a felvételre szánt ligand jelenléte indukál.

#### 8.3. A caveolák lefűződésének szabályozása

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a caveolák lefűződését szabályozó molekuláris változások hátterében a foszforilációs és a defoszforilációs folyamatok fontos szerepet játszanak (Pelkmans és mtsai 2005). Munkánk következő részében patkányok peritoneális üregéből kimosott rezidens és elicitált makrofágokon, valamint egy hepatocelluláris karcinóma sejtvonal sejtjeiben (HepG2) a caveolák internalizációját szerin/treonin protein-foszfatáz gátló okadánsavval stimuláltuk. Arra kerestük a választ, hogy az okadánsav kezelést hatására megemelkedett foszforiláció milyen hatással van a caveolák sejtfelszini megjelenésére, lefűződésére. Makrofágokról és HepG2 sejtekről készült elektronmikroszkópos felvételeinken azt láthattuk, hogy okadánsav kezelés hatására a sejtfelszíni nyitott caveolák száma csökkent, ezzel párhuzamosan a plazmamembrán alatti, zárt, lefűződött caveolák száma megnövekedett. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a caveolák lefűződését a szerin/treonin protein-foszfatáz gátló okadánsav jelentős mértékben fokozta. Ha az okadánsav a caveolák lefűződését stimulálja, azt várnánk, hogy okadánsav kezelés hatására a sejtek által felvett endocitotikus markerek mennyisége nő. Meglepődve tapasztaltam azonban, hogy a mind a rezidens, mind az elicitált makrofágok az alkalmazott okadánsav koncentrációjával fordított arányban egyre kevesebb folyadék-fázisú markert

internalizálnak. Ezt az ellentmondást magyarázza az a tény, hogy az okadánsavval a liganddal való inkubáció előtt 30 perces előkezelést végeztünk, amelv elektronmikroszkópos képeinken jól láthatóan drámaian csökkentette a sejtfelszíni caveolák számát. Fontos megemlíteni azt is, hogy okadánsav kezelés hatására a clathrinburkos vezikulák csaknem teljesen eltűnnek a rezidens és elicitált sejtek felszínéről. Ismert, hogy rezidens makrofágokban csupán kevés caveola van a plazmamembránon (Kiss és Kittel 1995), és a folyadékfázisú felvétel legfontosabb endocitotikus struktúrái a clathrin-burkos vezikulák (Kiss és Geuze 1997). Mivel rezidens makrofágokban az okadánsav kezelés után ezen struktúrák száma nagymértékben lecsökkent, a sejtek már nem rendelkeztek a tormaperoxidáz felvételére alkalmas képletekkel. Elicitált makrofágokban az okadánsav kezelés után a csökkent fluid fázisos felvétel másképpen magyarázható. Elictált sejtek plazmamembránján sokkal nagyobb számban találhatók caveolák, és ezekben a makrofágokban a fluid fázisos felvételért a caveolák felelősek (Kiss és Geuze 1997). Morfológiai és morfometriai eredményeinkből jól látható, hogy okadánsav kezelés hatására a caveolák intenzív lefűződése miatt az elicitált makrofágok sejtfelszínéről elfogynak a felvételre alkalmas nyitott, sejtfelszíni caveolák. Irodalmi adatokból ismert továbbá, hogy az okadánsav nemcsak a vezikulumok lefűződését serkenti, hanem gátló hatással van a caveolák reciklizációjára is (Parton és mtsai 1994). Valószínűnek látszik tehát, hogy az internalizáció intenzitásával a plazmamembrán caveoláinak utánpótlása elmarad, feltehetőleg a reciklizáció gátlása miatt.

Ha a caveolák lefűződését az okadánsav hatására kialakuló emelkedett foszforilációs szint indukálja, felmerül a kérdés, változik-e és ha igen hogyan a caveola burkát alkotó fehérjék, különösen a caveolin izoformák foszforilációjának mértéke. A kérdés megválaszolása céljából *makrofágok* és *HepG2* sejtek lizátumából immunprecipitációval, majd Western blot analízissel vizsgáltuk a *caveolin izoformák foszforilációját*. Okadánsav kezelés után makrofágokban egy ~29kDa molekulatömegű, feltehetőleg caveolin-2 izoforma emelkedett tirozin foszforilációját detektáltuk. Ezen izoforma tirozin foszforilációjának mértéke az okadánsav koncentrációjával arányosan növekszik. Úgy tűnik tehát, hogy ez a ~29kDa molekulatömegű fehérje egy olyan *makrofág specifikus caveolin-2 izoforma, amely makrofágokban fontos szerepet játszik a caveolák lefűződését szabályozó folyamatokban*. HepG2 sejtekben az okadánsav kezelések után emelkedett ugyan a caveolin izoformák tirozin foszforilációjának szintje, ez azonban nem volt jelentős mértékű.

Ha az okadánsav egy *szerin/treonin* protein-foszfatáz gátló, hogyan magyarázható, hogy ezen foszfatáz gátló a caveolin izoformák *tirozin*-foszforilációját eredményezi? Ismert, hogy a szerin/treonin protein-foszfatáz 1 (PP1) és 2A (PP2A) enzimek hatékonyan gátolják az Src tirozin-kinázt (Marinessen és Gutkind 2001). Az Src-kináz a caveolákban akkumulálódik (Anderson 1998), és a caveolák lefűződését indukáló jelátviteli kaszkád fontos tagja (Minshall és mtsai 2003). Azáltal, hogy az okadánsav gátolja az Src-kinázt gátló PP1 és PP2A enzimeket, a *gátlás gátlása* révén az Src kináz aktivitását fokozza. Az aktivált Src-kináz a caveolák lefűződését.

A tirozin-foszforiláció mértékének szabályozó szerepét bizonyítják a tirozinfoszfatáz gátló nátrium-ortovanadáttal, valamint egy, a caveolák lefűződését specifikusan indukáló fiziológiás liganddal, az albuminnal végzett kísérleteink is.

A szerin/treonin foszfatázokat gátló okadánsav illetve a tirozin -foszfatáz gátló nátrium-ortovanadát minden valószínűség szerint egyéb jelátviteli folyamatokat is befolyásolnak a sejtekben. Aspecifikus hatásuk eredményeképpen tehát hatással lehetnek a caveola-mediált endocitózistól független intracelluláris útvonalakra is. Velük ellentétben az albumin csak a caveolák internalizációját indukálja. HepG2 sejtek morfológiai vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a nátrium-ortovanadát és az albumin csaknem olyan intenzív caveoláris internalizációt okoz, mint amilyent az



**50. ábra:** A caveolák internalizációjában a tirozin foszforilációnak fontos szabályozó szerep jut. Kísérelti elrendezéseinkben az okadánsav indirekt módon, az albumin G-fehérje kapcsolt jelátviteli úton, a nártium-ortovanadát pedig a tirozin protein-foszfatáz gátlásának megakadályozásával eredményeznek emelkedett tirozin foszforilációt, s így a caveolák lefűződését.

okadánsav kezelések után láthattunk. A különböző kezelések tehát közös hatásmechanizmussal, tirozin-foszforiláció fokozása révén fejtik ki hatásukat, és vezetnek a caveolák internalizációjához. (50. ábra).

A plazmamembrán caveoláinak stabilitását a kortikális aktin hálózat biztosítja, ugyanakkor a citoszkeleton fontos szerephez jut a caveolák lefűződésében is (Stalhut és van Deurs 2000). Bár a citoszkeleton elemeinek változását nem követtük nyomon

részletesen, a caveolák internalizációja során gyakran láthattuk a citoszkeleton aktinfilamentumainak kötegeit a plazmamembrán caveoláinak citoplazmatikus felszínéhez közel, illetve a lefűződött caveolák közvetlen közelében. Érdemes megjegyeznünk, hogy okadánsav kezelés hatására bekövetkező intenzív internalizáció ellenére is a plazmamembránon változatlanul előfordulnak nyitott, nem lefűződő caveolák, melyek feltehetőleg az irodalomból ismert össz-caveola populáció immobilis, le nem fűződő képviselői (Parton és Simons 1995)

### 8.4. A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai

Munkám további szakaszában az internalizált caveolák citoplazmán belüli sorsát vizsgáltam, választ keresve arra a kérdésre, hogy a caveola-mediált endocitózis egy, a korábban részletesen leírt és jól ismert, a klasszikus útvonaltól eltérő felvételi folyamate bizonyos ligandok számára. A caveolák révén végbemenő endocitózis folyamatának ez a legkevésbé tisztázott, legvitathatóbb, ellentmondásokkal teli fejezete. A caveolák lefűződésüket követő sorsa akkor vált különösen érdekessé, amikor Pelkmans és Helenius 2002-ben SV40 vírus felvételét tanulmányozva azt tapasztalták, hogy a caveolák segítségével a sejtbe bejutó vírusrészecskék egy olyan kompatimentumban akkumulálódnak, amely hosszú idő múltán sem olvad össze a lizoszómákkal, így tartalma, a vírus, megmenekül a lizoszómális enzimek hidrolizáló, bontó hatásától. Ezt a kompartimentumot, mint a caveola-mediált endocitózis első állomását, caveoszómának nevezték el. Bár a caveoszómákat a klasszikus endocitotikus útvonal korai endoszómáival ekvivalens struktúráknak tartják, nem rendelkeznek a korai endoszómák morfológiai és biokémiai jellemzőivel. (Pelkmans és Helenius 2002.). A caveoszómákban nem mutathatók ki a clathrin-burkos vezikulumok által felvett ligandok és azok receptorai. A membránjukban jelenlévő caveolin-1 alapján azonosították őket.

A caveoszómák valódi szerepe, önálló sejtorganellum léte sokáig intenziv vita tárgya volt. Részletes és alapos ultrastruktúrális vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a caveoszómaként azonosítható képletek közül számos olyan rozetta-szerű caveola-csoport, amely még mindig kapcsolatban áll a plazmamembránnal. Elektronmikroszkópos felvételeinken jól láthatók azok a vékony membrán

122

invaginációk, amelyek segítségével a szőlőfürtszerű caveola-halmazok valóban összeköttetésben állnak a sejtfelszinnel. Valószínű, hogy jóval több ilyen caveoszómának vélt struktúra áll közvetlen kapcsolatban a plazmamembránnal, mint amennyi az elektronmikroszkópos képeken látható, azonban a bonyolult térbeli elrendeződés miatt ez a membránkapcsolat nem esik bele az ultravékony metszet síkjába. Ha a sejtfelszínt jelölő Ruténium-vörös festéket alkalmaztuk, számos caveoszóma morfológiájú caveola-csoportról vált bizonyossá, hogy а plazmamembránnal kapcsolatban álló képletek. Mivel a caveolák lefűződését indukáló kezelések után ezen caveoszóma-szerű, Ruténium-vörössel jelölt képletek gyakrabban láthatóak a sejtekben, feltételezzük, hogy nem mások, mint az intenzív caveoláris internalizáció során tömegesen lefűződő caveolák halmazai. Tekintettel arra, hogy néhány esetben a plazmamembránnal kapcsolatot tartó membrán invaginációk mentén dinamint detektáltunk (Kiss és Botos 2008), nem zárható ki, hogy vannak önálló, a plazmamembrántól független caveola halmazok, amelyek megfelelnek caveoszómákként leírt struktúráknak. Ebben az esetben a nyitott, caveoszómának tetsző caveola-csoportok a zárt (valódi) lefűződött caveola halmazok kialakulásának egy közbülső állomását jelentik.

Számos irodalmi adat szól amellett (Pelkmans és mtsai 2001, Nichols és mtsai 2001, Pelkmans, és Helenius 2002), hogy a caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásia eltérnek a clathrin-burkos felvétel útvonalától. Ezt az elképzelést támasztja alá az az adat, hogy az SV40 vírust tartalmazó caveoszómáknak nevezett kompartimentumok soha nem olvadnak össze a lizoszómákkal, így a vírus "elkerüli" a lebontó hatású lizoszómális fürdőt. Az a tény, hogy számos, caveolák közreműködésével felvett ligand (SV40 vírus) a felvételt követő néhány óra után az endoplazmás retikulumba szállítódik (Pelkmans és mtsai 2001), míg mások, például a ceramid (Nichols és mtsai 2001), vagy GPI-kötött fehérjék (Puri és mtsai 2001) a Golgi készülékbe kerülnek, arra utal, hogy a caveolák közreműködésével végbemenő endocitózis külön útvonalon megy végbe. Felvetődik azonban a kérdés, hogy valóban nincs kapcsolat, átjárás a két útvonal között? A caveolák segítségével felvett ligandok nem jelenhetnek meg a klasszikus, clathin-burkos vezikulumok közreműködésével végbemenő endocitotikus organellumokban? A klasszikus, clathrin-mediált endocitózis jól ismert sejtalkotói, és a caveola-mediált útvonal érinthetik-e egymást? A caveolák

123

dc\_1278\_16

által felvett ligandok célállomásai minden esetben az ún. caveoszómák, avagy a caveola-mediált endocitózis elvezethet a klasszikus, késői endoszóma-lizoszóma degradációs útvonalhoz is?

Újabb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a caveolák illetve caveoszómák egy kis molekulasúlyú, GTP hidrolízisére képes molekula, a Rab5 jelenlétében képesek kapcsolatba lépni a korai endoszómákkal (Stenmark és mtsai 1994). A caveolák illetve a caveolin további intracelluláris sorsáról azonban hosszú ideig keveset tudtunk. Munkám során célul tűztem ki az internalizált caveolák, és jellegzetes fehérjéjük, a caveolin-1 sejten belüli sorsának nyomon követését. A rövid idejű internalizációs kísérleteket követően elektronmikroszkópos képeken membránnal határolt, vezikulákat és néhány esetben membránlemezeket tartalmazó képleteket figyelhettünk meg a sejtekben. Morfológiájuk alapján e sejtalkotókat multivezikuláris testeknek tekinthetjük, amelyeket molekuláris markerük, a CD63 (LIMP-1; Eskelinen 2003) kimutatásával azonosítottunk. Ezen organellumok a klasszikus endocitotikus útvonal degradációs vonalát követve, lizoszómával fúzionálva kínálják fel tartalmukat a lizoszómális emésztőenzimek számára. Meglepő és érdekes megfigyelés volt, hogy makrofágokban és HepG2 sejtekben az okadánsav kezelés után fagyasztott ultravékony metszeten elvégzett immun-arany jelölés segítségével a multivezikuláris testekben caveolin-1 is kimutatható. Ez a jelenség azt sugallja, hogy a lefűződött caveolák burkát alkotó caveolin-1 fehérje a multivezikuláris testek közbeiktatásával lizoszómákba kerül, ahol a lizoszómális enzimek áldozatául esik. Morfometriai méréseim eredményei azonban azt mutatják, hogy ezen kettősen jelölt organellumok száma az okadánsav kezelések időtartamával arányosan nem változik, jelezvén, hogy az okadánsavval kezelt sejtekben caveolin-1 lebontásának mértéke ugyanakkora, mint a nem kezelt sejtekben. Ha azonban a caveolák internalizációját hosszú időn át alkalmazott albuminnal stimuláltuk, a caveolin-1 tartalmú multivezikuláris testek számának szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Ez a jelenség azt sugallja, hogy a lefűződött caveolák burkát alkotó caveolin-1 fehérje a multivezikuláris testek érésének befejeztével lizoszómákba kerül, ahol a lizoszómális enzimek áldozatául esik. Morfológiai adatatokon kívül biokémiai vizsgálataink eredménye is azt igazolja, hogy a caveolin-1 fehérje degradálódik. Detergens-mentes membránizolálással nyert intracelluláris membránfrakció caveolin-1 tartalmát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az albumin inkubáció idejével egyenes

arányban csökkent ezen membránfrakció caveolin-1 tartalma. Az albumin jelenléte tehát a lefűződött caveolákat a lizoszómák irányába tereli, és a caveolin-1 fehérje degradációját eredményezi. Bár elektronmikroszkópos képeinken nem találtunk olyan köztes (intermedier) struktúrát, amely a caveolák illetve a caveoszómákként leírt struktúrák, valamint a multivezikuláris testek közös markerével rendelkezik, mégis úgy véljük, hogy természetes ligandok esetében a klasszikus és *a caveola-mediált felvételi útvonal citoplazmatikus állomásai azonosak és a lefűződött caveolák a multivezikuláris testek közbeiktatásával végül is a lizoszómákkal kerülnek kapcsolatba* (51. ábra).

Hogyan magyarázható, hogy bár az okadásav kezelés a caveolák lefűződését stimulálja, a kezelések után a caveolin-1lebontásának, degradációjának mértéke a kezeletlen sejtekhez képest nem változik? Eredményeink alapján úgy véljük, hogy okadánsav kezelés hatására a caveola-multivezikuláris test fúzió elmarad, a caveoláris transzport valahol a caveoszóma-szerű struktúrák, caveola halmazok szintjén megragad, és nem következik be fokozott mértékű caveolin-1 degradáció (Kiss és Botos, 2008, Kiss és Botos 2009). A magyarázat az lehet, hogy az endoszómák éréséhez, és a késői endoszómákba való transzporthoz szükséges szortírozó szignál kialakulásában a PP2A enzim fontos szerepet játszik (Schapiro és mtsai 2004). Mivel kísérletünk során okadánsavval a PP2A működését hatékonyan gátoltuk, befolyásoltuk az endoszómák érését, a lizoszómákkal való fúzióját, feltehetően a szortírozó feladatot ellátó szignál kialakulásának gátlása révén. Irodalmi adatokból ismert, hogy a caveolin-1 80. és 168. poziciójában lévő szerin foszforilációja is befolyásolja a caveolin-1 sejten belüli transzportját (Schlegel és mtsai 2001). Nem zárható ki tehát az sem, hogy okadánsav ezen aminosavak hiperfoszforilációja révén változtat(hat)ja meg, gátolhatja a caveoszóma-szerű struktúrák szintjén a caveolák/caveolin-1citoplazmatikus útvonalát.

Az SV40 vírus "elakadása" a caveoszómáknak nevezett ill. caveoszóma-szerű struktúrákban, a lizoszómális degradáció elkerülése valószinüleg azzal magyarázható, hogy a virus T-antigénje a PP2A-hoz kötődve gátolja annak aktivitását (Rundell és Parakati 2001), és a szortírozó szignálok kialakulását. A PP2A pedig (amint azt már említettem) fontos szerepet játszik az endoszómák érési folyamatában, az endoszóma-lizoszóma szortirozó szignál kialakulásában (Schapiro és mtsai 2004). A vírus tehát nem egy önálló internalizációs útvonalat "talált" ill. használ, hanem a klasszikus

útvonalat "fagyasztja" be egy olyan sejtalkotó szintjén, amelyben a lizoszómális degradációt elkerülheti.



**51. ábra: A PP2A feltételezett szerepe a caveola-mediált endocitózisban**. Az endoszómák éréséhez, és a késői endoszómákba való transzporthoz szükséges szortírozó szignál kialakulásában a PP2A enzim fontos szerepet játszik (Schapiro és mtsai 2004). Az okadánsav, a PP2A hatékony gátlószere, befolyásolja az endoszómák érését, a lizoszómák kialakulását, gátolja a szortírozó feladatot ellátó szignál kialakulását is. c: caveoszóma; EE: korai endoszóma; RE: reciklizáló endoszóma; MVB: multivezikuláris test; Ly: lizoszóma; sötét gömbö: foszfát csoportok

Mivel hosszú idejű albumin internalizáció után is nagy számban vannak jelen caveolák a sejtfelszínen, és a plazmamembrán frakcióban detektált caveolin-1 mennyisége is magas, az a kérdés, hogy honnan származik az újonnan felépített caveolák burkához szükséges caveolin-1 fehérje, ha a caveolin-1 degradálódik? Van-e a sejtekben egy citoplazmatikus raktár, amely folyamatosan kielégíti a caveolin-1 szükségletet, vagy újonnan szintetizált fehérje épül be a plazmamembrán új caveoláinak membránjába? A kérdés megválaszolására fehérjeszintézis gátló cycloheximidet alkalmaztuk (Lusska és mtsai 1992.). Albumin jelenlétében végzett cycloheximid kezelés után azt tapasztaltuk, hogy 3 óra kezelés után a plazmamembrán frakció és az intracelluláris membránfrakció (beleértve az endoplazmás retikulum és a Golgi hálózat membránjait is) caveolin-1 tartalma is jelentősen csökken. Eredményeim alapján úgy vélem, hogy *a megnövekedett igény kielégítésére a sejtek de novo szintetizált caveolin fehérjét használnak fel.* 



**52. ábra: A caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásai.** A lefűződött caveolák, caveola halmazok a felvett ligandot a Golgi készülékbe, endoplazmás retikulumba és közvetve vagy közvetlenül a korai endoszómákban szállítják. A korai endoszóma útvonalra kerülő caveola az érési folyamt során késői endoszómává alakul, majd a lizoszómákkal fúzionál.

Összefoglalva erlmondhatjuk, hogy a caveolák közreműködésével felvett ligandok útja az endoplazmás retikulumba vagy a Golgi készülékbe vezethet. A lefőződött caveolák, illetve a caveoszóma-szerű caveola halmazok azonban a korai endoszómákkal is összeolvadhatnak. Saját eredményeim azt mutatják, hogy a caveolák lefűződését követően a caveolin-1 multivezikuláris testekbe transzportálódik, majd degradálódik (a transzportot lebonyolító organellumot nem sikerült azonosítani). Caveolin-1 degradációját okadánsav gátolja a szortírozó szignál kialakításásnak illetve az endoszómák érésének befolyásolása révén. А plazmamembrán caveoláinak felépítéséhez szükséges caveolin-1 forrása a sejtek által de novo szintetizált fehérje.

dc\_1278\_16

## 9. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

- Munkánk során az irodalomban elsőként sikerült igazolni, hogy a makrofágok sejtfelszinén jelen vannak caveolák. Megállapítottuk, hogy számuk, megjelenésük a sejtek fiziológiás (aktivitási) állapotának függvénye.
- 2.) A caveolák kialakulása szabályozott folyamat, amely a caveolin-1 expressziójának függvénye. Rezidens makrofágok csak nagyon kis mennyiségben expresszálnak caveolin-1 izoformát, ez magyarázhatja azt a tényt, hogy sejtfelszinükön csak elenyésző mennyiségben vannak jelen caveolák. Elicitálás hatására a caveolin-1 expressziója igen jelentősen megnő, és ezzel párhuzamosan a sejtfelszinen 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 van jelen. 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 sejtfelszinről lefűződő, 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. Bár a caveolák közreműködésével végbemenő ligand felvétel lassú folyamat, az endocitózisra specializálódott makrofágokban a caveolák lefűződése is gyorsabban megy végbe.
- 5.) Kísérleteink során megállapítottuk, hogy mind makrofágokban, mind pedig HepG2 sejtekben a sejtfelszínen lévő caveolák lefűződését foszfatáz gátlók (okadánsav és nátrium-ortovanadát), valamint egy természetes ligand, az albumin is stimulálja. Mások eredményeihez hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy a *caveolák lefűződésének szabályozásásban makrofágokban és HepG2 sejtekben is a caveolin izoformák tirozin foszforilációja játszik szerepet.* Makrofágokban a caveolák lefűződése során a caveolin izoformák közül 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 lefűződésében.

- 6.) Lehetséges modellt állítottunk fel annak magyarázatára, hogy a szerin/treoninfoszfatáz gátló okadánsav milyen lépéseken keresztül eredményez(het)i a caveolin tirozin foszforilációját.
- 7.) Az irodalomban elsők között vizsgáltuk a caveola-mediált endocitózis citoplazmatikus állomásait. Hosszú idejű internalizációs kísérleteinkben a caveolin-1 útját követve morfológiai és biokémiai adatokkal igazoltuk, hogy a caveolák membránjának jellegzetes fehérjéje, a caveolin-1 multivezikuláris testekbe (késői endoszómákba) kerül, majd degradálódik. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a clathrin-burkos és caveola-mediált endocitózis nem egymástól független felvételi folyamat, hanem a késői endoszómák szintjén kapcsolatba kerül egymással. Bár elektronmikroszkópos képeinken nem találtunk olyan köztes (intermedier) struktúrát, amely a caveolák illetve a caveoszómák, valamint a multivezikuláris testek közös markerével rendelkezik, mégis úgy véljük, hogy természetes ligandok esetében a klasszikus és a caveola-mediált felvételi útvonal citoplazmatikus állomásai azonosak, és a lefűződött cvaveolák a multivezikuláris testek közbeiktatásával végül is a lizoszómákkal kerülnek kapcsolatba.
- 8.) A caveola-mediált endocitózis lépéseit nyomon követve megállapítottuk, hogy a fokozott caveola lefűződéssel párhuzamosan mindkét settípusban olyan struktúrák jelennek meg, amelyek az irodalomban caveoszóma néven ismertek. Ezen struktúrákat önálló sejtalkotóként, a caveolák közreműködésével lejátszódó endocitózis köztes, illetve végső állomásaként írták le. Hagyományos és Ruténiumvörös felszíni jelöléssel kombinált elektronmikroszkópos vizsgálataink azonban egyértelműen azt mutatják, hogy ezen caveoszómáknak tűnő struktúrák többsége a plazmamembránnal összeköttetésben álló caveola-csoport, és nem önálló sejtorganellum.
- 9.) Morfológiai, morfometriai vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a caveolin-1és CD63 (multivezikuláris test marker) kettősen jelölt organellumok száma az okadánsav kezelések időtartamával arányosan nem változik. Feltételezzük tehát, hogy okadánsav kezelés hatására a caveola-multivezikuláris test fúzió elmarad, a caveoláris transzport valahol a caveoszóma-szerű, lefűződött caveola halmaz

szintjén megreked, nem következik be fokozott mértékű caveolin-1 degradáció. Irodalomból ismert, hogy az endoszómák éréséhez, és a késői endoszómákba való transzporthoz szükséges szortírozó szignálok kialakulásában a PP2A enzim fontos szerepet játszik. *Az okadánsav a caveolák lefűződését indukáló hatása mellett tehát 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.*
- 11.) Kísérleti eredményeink nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy Ari Helenius (akinek nevéhez a caveoszóma fogalom bevezetése fűződik) 2010-ben a *Traffic* c. folyóiratban megjelent cikkében visszavonta eredeti hipotézisét. Ebben a cikkében Helenius elismeri, hogy a caveolák közvetítésével lejátszódó endoctózis 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.)

## IRODALOMJEGYZÉK

Ali, N., Evans, W.H. (1990) Priority targeting of glycosyl-phosphatidilinositol-anchored proteins to the bile canalicular (apical) plasma membrane of hepatocytes. *Biochem J* 271: 193-199.

Anderson, R.G.W. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.

Bastiani, M., Liu, L., Hill, M.M., Jedrychowski, M.P., Nixon, S.J., Lo, H.P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M.R. et al. (2009) MURC/cavin-4 and cavin family members from tissue-specific caveolar complexes. J Cell Biol 185: 1259-1273.

Bist, A., Fielding, P.E., Fielding, C.J. (1997) Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 94: 10693-10698.

Boland, M.P., Taylor, M.F., Holmes, C.F. (1993) Identification and characterisation of a type-1 protein phosphatase from the okadaic acid-producing marine dinoflagellate Prorocentrum Lima. *FEBS Letters* 334: 13-17.

Botos, E., Klumperman, J., Oorschot, V., Ígyártó, B., Magyar, A., Oláh, M., Kiss, A.L. (2008) Caveolin-1 is transported to multivesicular bodies after albumin-induced endocytosis of caveolae in HepG2 cells *J Cell Mol Med* 12: 1632-1639.

Brown, D., London, E. (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Co* 240: 1-7.

Briand, N., Dugail, I., Lay, S.L. (2011) Cavin proteins: new players in the caveolae field. *Biochimie* 93: 71-77.

Bucci, M., Gratton, J.-P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., Sessa, W.C. (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and redues inflammation. *Nature Med* 6:1362-1367.

Carver, L.A. and Schnitzer, J.E. (2003) Caveolae: minning little caves for new cancer targets. *Nature Reviews/Cancer* 3:571-581.

Chang, W.J., Ying, Y.S., Rothberg, K.G., Hooper, N.M., Turner, A.J., Gambiel, H.A., DeGunzburg, J., Mumby, S.M., Gilman, A.G., Anderson, R.G.W. (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol* 126: 127-138.

Chidlow, J.H Jr., Sessa, W.C. (2010) Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovascular Res* 86: 219-225.

Chun, M., Liyange, U.K., Lisanti, M.P., Lodish, H.F. (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor is caveolae. *Proc Nat Ac Sci USA* 91: 11728-11732.

Cohen, A., Hnasko, R., Schubert, W., Lisanti, M.P. (2003) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev* 84: 11341-1370.

Conrad, P., Smart, E.J., Ying, Y.S., Anderson, R.G.W., Bloom, G.S. (1995) Caveola cycles between plasma membrane caveolae and Golgi complex by microtubule dependent and microtubule independent steps. *J Cell Biol* 131: 1421 -33.

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., Lisanti, M.P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. *J Biol Chem* 272: 6525-6533.

Cupers, P., Veithen, A., Kiss A.L. Baudhuin, P., Courtoy, P. (1994) Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat foetal fibroblasts. *J Cell Biol* 727: 725-735.

Das, K., Lewis, R.Y., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (1999) The membrane spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. *J. Biol. Chem* 274: 18721-18728.

Dietzen, D.J., Hastings, W.R., Lublin, D.M. (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. *J. Biol. Chem* 270: 6838-6842.

Drubin, D.G., Nelson, W.J. (1996) Origines of cell polarity. Science 84: 335-344.

Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurchalia, T.V., Simons, K. (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12:1597-1605.

Echarri, A., Muriel, O., Pavon, D.M., Azegrouz, H., Escolar, F., Terron, M.C., Sanchez-Cabo, F., Martinez, F., Montoya, M.C., Llorca, O., et al. (2012) Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J Cell Science* 125: 3097-3113.

Echarri, A., Del Pozo M.A. (2015) Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *J Cell Science* 126: 2747-2758.

Engelmann, J.A., Zhang, X.L., Galbiati, F., Lisanti, M.P. (1998a) Chromosomal localization, genomic organisation, and developmental expression of the murine caveolin gene family (cav-1, -2, and -3). *FEBS Letters* 429: 330-336.

Engelmann, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P. (1998b) Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co.localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is ferquently deleted in human cancers. *FEBS Letters* 436: 403-410.

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-45.

Fan, J.Y. (1983) Morphological changes of the 3T3-L1 fibroblast plasma membrane upon differentation to adipocyte form. *J Cell Sci* 6: 219-230.

Fernandez, I., Ying, Y., Albanesi, J., Anderson, R.G.W. (2002) Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11193-11198.

Fielding, C.J., Bist, A., Fielding, P.E. (1997) Caveolin mRNA levels are upregulated by free cholesterol and downregulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3753-3758.

Fielding, C.J., Fielding, P.E. (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationship. *Biochem Biophis Acta* 1529: 210-222.

Forbes, M.S., Rennels, N.L., Nelson, E. (1979) Caveolar system and sarcoplasmic reticulum in coronary smooth muscle. *J Ultrastruct Res* 67: 325-339.

Fra, A.M., Massini, M., Palestini, P., Sonnins, S., Simons, K. (1995) A photoreactive derivative of ganglioside GM1 specifically crosslinks VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Letters* 375: 11-14.

Friedrichson, T., Kurchalia, T.V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells releaved by crosslinking. *Nature* 394: 802-805.

Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E.H., DeCamilli, P., Unger, V.M. (2008) Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 132: 807-817.

Frost, A., Unger, V.M., DeCamilli, P. (2009) The BAR domain superfamily: membrane-folding macromolecules. *Cell* 137: 191-196.

Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K., Nomura, R. (2001) Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* 152: 1079-1085.

Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikosuiba, K., Ogawa, K. (1992) Localisation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 119: 1509-1513.

С

Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R.G., Lisanti, M.P. (1998) Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17: 6633-6648.

Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H. Jr. Kneitz, B., Edelmann, W., Lisanti, M.P. (2001) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276: 21425-21433.

Gervasio, O.L., Philips, W.D., Cole, L., Allen, D.G. (2011) Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *J Cell Science* 124: 3581-3590.

Ginsel, L.A. (1993) Origin of macrophages. In Horton, M.A. (ed) *Blood Cell Biochemistry* Vol 5. 87-113. New York Plenum Press

Ginsel, L.A., de Water, R., van der Meer, J.W.M., Daems, W.T. (1986) Heterogenity of 5'-nucleotidase activity and wheat-germ agglutinin binding *in* mononuclear phagocytes. In: van Furth, R. and Novikoff, M. (ed)*: Mononuclear phagocytes*. Academic Publisher Group Dordrecht, Boston, Lancaster 99-113.

Ginsel, L.A., Rijfkogel, L.P. Daems, W.T. (1985) A dual origin of macrophages? Review and hypothaesis. *Macrophage Biology* 621-649.

Glenney, Jr. J.R., Soppet, D. (1992) Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10517-10521.

Hansen, C.G., Bright, N.A., Howard, G., Nichols, B.J. (2009) SDPR induces membrane curvature and function in formation of caveolae. *Nat Cell Biol* 11: 807-814.

Hansen, C.G., Nichols, B.J. (2010) Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20: 177-186.

Hansen, C.G., Howard, G., Nichols, B.J. (2011) Pacsin2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J Cell Sci* 124: 1777-1785.

Hayer, A., Stoeber, M., Bissing, C., Helenius, A. (2010) Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic* 11: 361-382.

Head, B.P., Insel, A.P. (2006) Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol:* 17: 51-57.

Hester, B.R., Veit, B.C., Walke, W.S. (1981) Discontinous density gradient technique. In: N. Rose (ed): *Manual of macrophage methodology*. Marcel Dekker, New York, Basel pp. 93-111.

Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankawa, D., Oorschot, V., Martin, S., Hancock, J.F., Parton, R.G.W. (2008) PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formantion and function. *Cell* 132: 113-124.

Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:483-519.

Ikonen, E., Tagaya, M., Ullrich, O., Montecucco, C., Simons, K. (1995) Different requirements for NSF, SNAP and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells. *Cell* 81: 571-580.

Joliot, A., Trembleau, A., Raposo, G., Calvet, S., Volovitch, M., Prochiantz, A. (1997) Association of engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* 124: 1865-1875.

Kiss, A.L., Röhlich, P. (1984) Receptor-mediated pinocytosis of IgG and immune complex in rat peritoneal macrophages: an electron microscopic study. *European J Cell Biol* 34: 88-95.

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

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. *Micron* 33: 75-93.

Kiss, A.L. Botos, E., Turi, A., Müllner, N. (2004) Ocadaic acid causes tyrosine phophorylation of caveolin-2 and induces internalization of caveolae in rat peritoneal macrophages. *Micron* 35: 707-715.

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

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.

Koch, D., Westermann, M., Kassels, M.M., Qualmann, B. (2012) Ultrastructural freezefracture immunolabeling identifies plasma membrane-localized syndapinII as a crucial factor in shaping caveolae. *Histochem Cell Biol* 138: 215-230.

Kogo, H., Ishiguro, K., Kuwaki, S., Fujimoto, T. (2002) Identification of a splice variant of mouse caveolin-2 mRNA encoding an isoform lacking the C-terminal domain. *Arch. Biochem. Biophys* 401: 108-114.

Koleske, A.J., Baltimore, D., Lisanti, M.P. (1995) Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 92: 1381-1385.

Kozera, L., White, E., Calaghan S. (2009) Caveolae act as membrane reseves which limit mechanosensitive I (CI, swell) channel activation during swelling in rat ventricular myocyte. *PLOS ONE* 4. e8312.

Krajewska, W.M., Maslowska, I. (2004) Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 9: 195-220.

Kurchalia, T., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnerta, M., Simons, K. (1992) A 21 kDa membrane proteins is an integral component of trans-Golgi network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118: 1003-1014.

Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Monier, S. (1994) VIP21-caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Letters* 346: 88-91.

Larkin, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. (1983) Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33: 273-285.

Le Gall, A.H., Yeman, C., Muesch, A., Rodriguez-Boulan, E. (1995) Epithelial cell polarity: new prospectives. *Semin-Nephrol* 15: 272-284.

Lee H, Park DS, Wang XB, Scherer PE, Schwartz PE, Lisanti MP (2002) Src-induced phosphorylation of caveolin-2 on tyrosine 19. *J Biol Chem* 277: 34556-34567.

Lee, H., Volonté, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D.M., Bregman, D.B., Wilson, M.T., Campos-Gonzales, R., Bouzahzah, B., Pestell, R.G., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (2000) Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: Identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14: 1750-1775.

Lee, H., Woodman, S.E., Engelman, J.A., Volonté, D., Galbiati, F., Kaufman, H.L., Lublin, D.M., Lisanti, M.P. (2001) Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 276: 35150-35158.

Li, W.P., Liu, P., Pilcher, B.K., Anderson, R.G.W. (2001) Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 114: 1397-1408.

Li, S., Couet, J., Lisanti, M.P. (1996) Src tyrosine kinases, Ga subunits, and h-ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases *J Biol Chem* 271: 29182–29190.

Li, S., Song, K.S., Koh, S.S., Kikneki, A., Lisanti, M.P.: Baculovirus-based expression of mammalian caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. (1996) *J Biol Chem* 271: 3863-3868.

Liou W, Geuze HJ, Slot JW (1996) Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* 106:41

Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., Sargiacomo, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains from an endothelial-rich surface: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 11-126.

Liu, P., Anderson, R.G.W. (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem* 270: 27179-28185.

Liu, L., Pilch, P.F. (2008) A critical role of cavin (polimerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem* 283: 4314-4322.

Liu, P., Ying, Y., Ko, Y.-G., Anderson, R.G.W. (1996) Localization of the PDGFstimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol Chem* 271: 10299-10303.

Liu, P., Rudick, M., Anderson, R.G. (2002) Multiple function of caveolin-1. *J Biol Chem* 277: 41295-41298.

Lusska, A., Wu, L., Whitlock, J.P. Jr. (1992) Superinduction of CYP1A1 transcription by cycloheximide. Role of the DNA binding site for the liganded Ach receptor. *J Biol Chem* 267: 15146-51.

Macekova, M., Martiskova, H., Koudelka, A., Kubala, L., Lojek, A., Pekarova, M. (2015) Bone marrow-derived macrophges exclusively expressed caveolin-2: The role of inflammatory activators and hypoxia. *Immunobiology* 220: 1266-1274.

Marinissen, M.J., Gutkind, S.J. (2001) G-protein coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22: 368-376.

Masserini, M., Palestini, P., Pitto, M. (1999) Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J Neurochem* 73: 1-11.

Matter, K., Mellman, I. (1994) Mechanism of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6: 545-554.

Matveev, S., Uittenbogaard, A., van der Westhuyzen, D., Smart, E.J. (2001) Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high density lipoproteinderived cholesteryl ester. *Eur J Biochem* 268: 5609-5616.

McMahon, K.A., Zajicek, H., Li, W.P., Peyton, M.J., Minna, J.D., Hernandez, V.J., Luby-Phelps, K., Anderson, R.G. (2009) SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J* 28: 1001-1015.

Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., Michel, T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthetase by Ca-calmodulin and caveolin *J Biol Chem* 272: 15583-15596.

Minshall, R.D., Sessa, W.C., Stan, R.V., Anderson, R.G.W., Malik, A.B. (2003) Caveolin regulation of endothelial function. *Am. J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:1179-1183.

Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., Kurzchalia, T.V. (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6: 911-927.

Montessano, R., Roth, J., Robert, A., Orci, L. (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296: 651-653.

Mora, R., Bonilha, V.L., Marmorstein, A., Scherer, P.E., Brown, D., Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulan, E. (1999) Caveolin-2 localizes to the Golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274: 25708-25717.

Mostov, K.E., Apodaca, G., Aroeti, B., Okamoto, C. (1992) Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 116: 577-583.

Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurchalia, T.V., Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:10339-10343.

Nichols, B.J., Kenworthy, A.K., Polishuchuk, R.S., Lodge, R., Roberts, T.H., Hirschberg, K., Phair, R.D., Lippincott-Schwartz, J. (2001) Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 153: 529-641.

Nomura, R., Fujimoto, T. (1999) Tyrosine-phosphorylated caveolin-1: immunolocalization and molecular characterization. *Mol Biol Cell* 10: 975-986.

Nyshijama, K., Trapp, B.D., Ikezu, T., Ranshoff, R.M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., Hsiao, K., Lisanti, M.P., Okamoto, T. (1999) Caveolin-3 upregulation activates  $\beta$ -secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19: 6538-6548.

Oh, P., Schnitzer, J.E. (2001) Segregation of heterotrimeric G protein in cell surface microdomains: Gq binds caveolin to concentrate in caveolae whereas Gi and Gs target lipid rafts by default. *Mol Cell Biol* 12: 685-689.

Oh, P., McIntosh, P.D., Schnitzer, E.J. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to from transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141: 101-111.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "Preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 5419-5422.

Palade, G.E. (1953) Fine structure of blood capillaries. J Appl Phys 24: 1424.

Park, D.S., Razani, B., Lasorella, A., Schreiber-Agus, N., Pestell, R.G., Iavarone, A., Lisanti, M.P. (2001) Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry* 40: 3354-3362.

Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J.A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P.E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C., Lisanti, M.P. (1999) Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 274: 25718-25725.

Parton, R.G., Joggers, B., Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 127: 1199-1215.

Parton, R.G., Simons, K. (1995): Digging into caveolae. Science, 269. 2-3.

Parton, R.G., Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. Nat Reviews 8: 185-94.

Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N., Stang, E. (1997) Caveolin-3 associated with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136: 137-154.

Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., Hancock, J.F. (2006) Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* 119: 787-796.

Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., Zerial, M. (2005) Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436: 78-86.

Pelkmans, L., Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. Traffic 3: 311-320.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nat. Cell. Biol* 3: 473-483.
Pelkmans, L., Pürterer, D., Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296: 535-539.

Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118: 767-780.

Peters, K.R., Carley, W.W., Palade, G.E. (1985) Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure *J Cell Biol* 101:2233-2238.

Pike, L. J. (2004) Lipid rafts: heterogenity on the high seas Biochem J 378: 281-292

Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., Horber, J.K. (2000). Sphingolipidcholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148: 997-1008.

Predescu, S.A., Predescu, D.N., Palade, G.E. (2001) Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell* 12: 1019-1033.

Puri, V., Watanabe, R., Singh, R.D., Dominguez, M., Brown, J.C., Wheatley, C.L., Marks, D.L., Pagano, R.E. (2001) Clathrin-dependent and –independent interlization of plasma membrane sphingolipids iniciates two Golgi targeting parthways. *J Cell Biol* 154: 535-547.

Radu, V.S. (2005) Structure of cavelae. Biochem Biophys Acta 1746: 334-348.

Razani, B., Altshuler, Y., Zhu, L., Pestell, R.G., Mostov, K.E., Lisanti, M.P. (2000) Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppress HPVmediated cell transformation. *Biochemistry* 39: 13916-13924. Rizzo, V., McIntosh, D.P., Oh, P., Schnitzer, J.E. (1998) In situ flow activates Endothelial Nitric Oxide Synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273: 34724–34729.

Rothberg, K.G., Ying, Y.-S., Kamne, B.A., Anderson, R.G.W. (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol* 111: 1931-1938.

Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.-S., Glenney, J.R., Anderson, R.G.W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coat. *Cell* 68: 673-682.

Röhlich, P., Allison, A.C., (1976) Oriented pattern of membrane-associated vesicles in fibroblasts. *J Ultrastruct Res* 57: 94-103.

Rundell, K., Parakati, R. (2001) The role of the SV40ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Cell Biol* 11: 5-13.

Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kübler, E., Song, K.S., Sanders, M.C., Lisanti, M.P. (1995) Oligomeric structure of caveolin: Implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9407-9411.

Safari, F., Suetsugu, S. (2012) The BAR domain superfamily proteins from subcellular structures to human diseases. *Membranes* 2: 91-117.

Sanna, E., Miotti, S., DeSantis, G., Canevari, S., Tomasetti, A. (2007) Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 313: 1307-1317.

Schapiro, F.B., Soe, T.T., Mallet, W.G., Maxfield, F.R. (2004) Role of cytoplasmic doamin serines in intracellular trafficing of furin. *Mol Biol Cell*, 15: 2884-2894.

Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A.M., Virta, H., Simons, K., Ikonen, E. (1998) Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 140: 795-806.

Schenoy-Scaria, A.M., Dietzen, D.F., Kwong, J., Link, D.C., Lublin, D.M. (1994) Cystein3 of Src family protein tyrosine kinases determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol* 126: 353-363.

Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonté, P., Engelman, J.A., Galbianti, F., Couet, J., Kohtz, D.S., VanDonselaar, E., Peters, P., Lisanti, M.P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolin-1 and caveolin-2 colocalize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272: 29337-29346.

Scherer, P.E., Lisanti, M.P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Coley-Mastic, C., Lodish, H.F. (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and assotiation of GLUT-4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127: 1233-1243.

Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, J., Lodish, H.F., Lisanti, M.P. (1996) Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a gene family. *Proc Nat Ac Sci USA* 93: 131-135.

Scherer, P.E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H.F., Lisanti, M.P. (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. *J Biol Chem* 270: 16395-16401.

Schlegel, A., Lisanti, M.P. (2000) A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. *J Biol Chem* 275: 21605-21617.

Schlegel, A., Arvan, P., Lisanti, M.P. (2001) Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 4398-4408.

Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport to endothelium: reduced transcytosis scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-1232.

Schnitzer, J.E., Liu, J., Oh, P. (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexin and GTPase. *J Biol Chem* 270: 14399-14404.

Senju, Y., Rosenbaum, E., Shah, C., Hamada-Nakahara, S., Itoh, Y., Yamamoto, K., Hanawa-Suetsugu, K., Daumke, O., Seutsugu, S. (2015) Phophorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane. *J. Cell Sci* 128: 2766-2780.

Shajahan, A.N., Timblin, B.K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A.B., Minshall, R.M. (2004) Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 20392-20400.

Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L. et al. (2007) Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* 129:761-772.

Shyng, S.L., Heuser, J.E., Harris, D.A. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125: 1239-1250.

Simons, K., Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569-572.

Simonescu, N., Simonescu, M., Palade, G.E. 1972. Permeability of intstinal capillares. *J Cell Biol* 53: 365-392.

Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stanb, R.V., Butler-Browne, G., Johannes L., et al. (2011) Cell respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144: 402-413.

Slot, JW, Geuze, HJ, Gigengack, S, Lienhard, GE, James, DE (1991) Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 113: 123-35.

Smart, E.J., Ying, Y. Anderson, R.G.W. (1995) Hormonal regulation of caveolae internalization. *J Cell Biol* 131: 929-938.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., Anderson, R.G.W. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10104-10108.

Song, K.S., Scherer, P.E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D.S. and Lisanti, M.P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 15160-15165.

Sotgia, F., Lee, J.K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T.C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F.D., Minetti, C., Sudol, M. and Lisanti M.P. (2000) Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of α-dystroglycan. *J Biol Chem* 275: 38048-38058.

Sotgia, F., Minetti, C. and Lisanti, M.P. (1999) Localization of the human caveolin-3 gene to the D3S18/D3S4163/D3S4539 lous (3p25), in close proximity of the human oxitocyn receptor gene. *FEBS Letters* 452: 177-180.

Sowa, G., Pypaert, M., Fulton, D., Sessa, W.C. (2003) The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6511-6516. Stahl, A., Mueller, B.M. (1995). The urokinase-type plasminogen activator, a GPIlinked protein is localised in caveolae. *J Cell Biol* 129: 335-344.

Stahlhut, M., van Deurs, B. (2000) Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1 associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11: 325-337.

Steer, C.J., Heuser, J. 1991. Chlatrin and coated vesicles: citrical determinats of intracellular trafficking. In: Steer, C. J., Hanover, J. (ed): *Intracellular trafficking of proteins*. 47-102. Cambridge University Press London.

Steinman, R.M., Cohn, Z.A. (1972) The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. *J Cell Biol* 55: 186-204.

Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994) Inhibition of Rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 13: 1287-1296.

Strippoli, R., Loureiro, J., Moreno, V., Benedicto, I., Lozano, M.L.P., Barreiro, O., Pellinen, T., Minguet, S., Foronda, M., Osteso, M.T., Calvo, E., Vázquez, J., Cabrera, M.L., delPozo, M.A. (2015) Caveolin-1 deficiency induces a MEK-ERK1/2-Snail-1-dependent epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis. *EMBO Mol Med.* 7: 102-123.

Suetsugu, S. (2010) The proposed functions of membrane curvatures mediated by the BAR domain superfamoly proteins. *J Biochem* 148. 1-12.

Suetsugu,S., Toyooka, K., Senju, Y. (2010) Subcellular membrane curvature mediated by Bain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol* 21: 340-349.

Suetsugu, S., Kurisu, S., Takenawa, T. (2014) Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol Rev.* 94: 1219-1248.

Tang, Z.-L., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (1994) The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C. *Gene* 147: 299-300.

Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., Lisanti, M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271: 2255-2261.

Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F, Hutter, W.B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysisn and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol* 2: 42-49.

Thomson, C.T. (2004) Metastasis-related Genes in Prostate Cancer: The Role of Caveolin-1. *Cancer Met Rew* 17: 439-442.

Uittenbogaard, A., Ying, Y., Smart, E.J. (1998) Characterization of a cytosolic heatchock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 273: 6525-6532.

Uittenbogaard, A., Smart, E.J. (2000) Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 275: 25595-25599.

van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M., Sandvig, K. (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms of the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 13: 92-100.

Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphry, J.H., Spector, W.G., Langevoort, J.H. (1972) The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes and their precursors. *Bull WHO* 46: 845-852.

Van Furth, R. (1988) Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in mormal steady state and inflammation. In: Gallin, J.L., Goldstein, I.M., Snyderman, R. (ed) *Inflammation. Basic principles and clinical correlates*. 281-295. New York Raven Press

van Meer, G. (2001) Caveolin, cholesterol and lipid droplets? J Cell Biol 152: 29-34.

Wang, X.M., Kim, H.P., Song, R., Choi, A.M.K. (2006) Caveolin-1 confers antiinflammatory effect in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 434-442.

Way, M. and Parton, R.G. (1995) M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Letters* 376: 108-112.

Weibel, E.R., Kiseler, G.S., Scherle, W.F. (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30: 23-38.

Wera, S., Hemmings, A.B. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *J Biochem* 311: 17-29.

Wilson, J.M., Fasel, N., Kraehenbuhl, J.-P. (1990) Polarity of endogenous glycosylphosphatidilinositol-anchored membrane protein in Madin Darby Canine Kidney cells. *J Cell Sci* 96: 143-149.

Wong, H., Jeong, K., Hwang, E.M., Park, J-Y., Hong, S-G., Choi, W-S., Par, Y. (2009) Caveolin-2 regulates of STAT3 transcriptional activation in reponse to insulin. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1325-1333.

Woodman, S.E., Park, D.S., Cohen, A.W., Cheung, M.W.-C., Chandra, M., Shirani, J., Tang, B., Jelicks, L.A., Kitsis, R.N., Christ, G.J., Factor, S.M., Tanowitz, H.B., Lisanti, M.P. (2002) Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277: 38988-38997.

Woodman, S.E., Schlegel, A., Cohen, A.W., Lisanti, M.P. (2002) Mutational analysis identifies a short atypical membrane attachment sequence (KYWFYR) within caveolin-1. *Biochem* 41: 3790-3795.

Yamada, E. (1955) The fine structure of gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 445-458.

Yamamoto, M., Toya, Y., Jensen, R.A., Ishikawa, Y. (1999) Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res* 247: 380-383.

Zhu, W., Smart, E.J. (2003) Caveolae, estrogen and nitric oxid. *Trends Endocrinol Metab* 3: 114-117

Zhu, Y., Liao, H.L., Wang, N.P., Yuan, X., Ma, K.S., Verna, T., Lisanti, M.P., Stemerman, M.B. (1999) Regulation of caveolin-1 by low density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation* 100: 6945.

Zundel, W., Swiesz, L.M., Giaccia, A. (2000) Caveolin-1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide-*Mol Cell Biol* 20: 1507-1514.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom mentoromnak **Prof. Dr. Röhlich Pálnak**, aki bevezetett az endocitózis rejtelmeibe, szigorú, kemény elvárásaival, hozzáállásával megtanított a szakmai igényességre, a precizitásra, 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 lehetővel 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 megosztoztunk; **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, lelkileg mellettem álltak, nyugodt, kiegyensúlyozott családi háttér biztosításával lehetővé tették számomra, hogy a tudományos munkára megfelelő mennyiségű időt és figyelmet szentelhessek.