

Jasna Lojk<sup>1</sup>, Mojca Pavlin<sup>2</sup>, Mateja Erdani Kreft<sup>3</sup>

# Vloga endocitotskih poti pri razvoju in zdravljenju bolezni

## *The Role of Endocytic Pathways in Development and Treatment of Disease*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** endocitoza, vstop patogenov, endosom, lizosom, nanodelci, zorenje veziklov

Celica je od okolja razmejena s plazmalemo, skozi katero sprejema zunajcelične signale in hrana iz okolja. Plazmalema omogoča tudi celični odziv na okoljske signale. Ključno vlogo pri celični komunikaciji z okoljem igra endocitoza, ki regulira in omogoča celično signaliziranje, vzpostavljanje celične polarnosti, rast in diferenciacijo celic. Znanih je več endocitotskih poti, ki se med seboj razlikujejo po tovoru, ki vstopa v celice in po molekulah, ki endocitozo omogočajo. Vsaka endocitotska pot se začne s selekcijo tovora na celični površini, sledi ji uvihavanje plazmaleme in nastanek endocitotskih veziklov. Ti preko kompleksnih interakcij z drugimi celičnimi predelki prinesejo svoj tovor in membranske proteine do različnih lokacij v celici. Endocitotske poti izkoriščajo tudi številni patogeni za vstop v celice, uporabimo pa jih lahko tudi v terapevtske namene za dostavo zdravilnih učinkovin. Spremenjene endocitotske poti so lahko razlog za številne bolezni, zato je njihovo poznavanje pomembno za učinkovitejše zdravljenje. V tem preglednem članku smo zbrali do sedaj znana dejstva o različnih vrstah endocitoze in endocitotskih poteh. Razpravljamo o njihovi vlogi pri razvoju bolezni in zdravljenju.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** endocytosis, entry of pathogens, endosome, lysosome, nanoparticles, vesicle maturation

A cell is separated from its environment by the plasma membrane through which it accepts signals and nutrients. The plasma membrane also allows cellular response to them. Endocytosis has a key role in these processes. It provides and regulates many cellular processes, including cell signalling, cell polarity establishment, cell growth and differentiation. Many entry pathways into cells have been identified, which differ in terms of different types of cargo internalized and specific molecules that allow the endocytic process. The endocytic pathway starts with the selection of cargo at the cell surface, and is followed by invagination of plasma membrane and formation of endocytic vesicles. These vesicles, through interactions with other cellular compartments, deliver its cargo and membrane proteins to different locations in the cell or recycle them back to the plasma membrane and the extracellular matrix. Endocytic pathways can be used for drug delivery for therapeutic purposes, but unfortunately they are also exploited by pathogens to enter the cells. Changes in endocytic pathways may be

---

<sup>1</sup> Jasna Lojk, univ. dipl. biol., Skupina za nano- in biotehnoške aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška cesta 25, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Doc. dr. Mojca Pavlin, univ. dipl. ing. fizike, Skupina za nano- in biotehnoške aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška cesta 25, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Izr. prof. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; mateja.erdani@mf.uni-lj.si

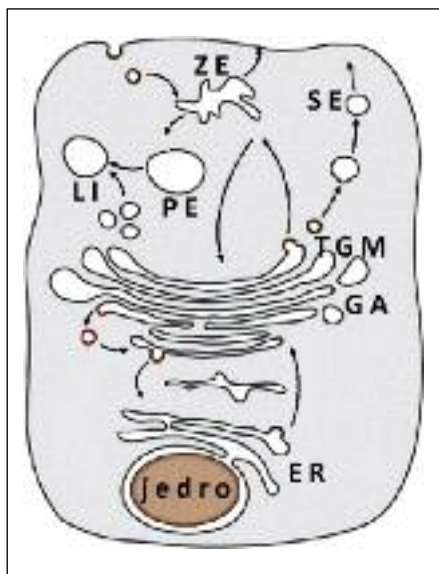
the reason for many diseases and their understanding is therefore important for effective treatment of these diseases. In this review article, we have gathered known facts about different types of endocytosis and endocytic pathways. We also discuss their role in the development of diseases and treatments.

## UVOD

Ena od najpomembnejših lastnosti, po kateri evkariontske celice ločimo od prokariotnih, je razdelitev njihove citoplazme na predelke. Mednje uvrščamo številne in raznolike mešičke oz. vezikle ter organele. Predelki so s selektivno prepustno membrano ločeni od citosola. To v njih omogoča vzpostavitev funkcionalnega notranjega okolja z značilnim pH in ionsko jakostjo ter kopičenje specifičnih proteinov – encimov in lipidov, kar omogoča opti-

malen potek določenih nalog in specifičnih reakcij (1, 2). Za vzdrževanje te specifične sestave, pa tudi za učinkovito celično homeostazo in signalno transdukcijo ima celica kompleksne mehanizme za transport izbranih proteinov iz enega predelka v drugega (1, 3).

Transport poteka med plazmalemo in organeli biosintezne, sekrecijske in endocitotске poti, kamor spadajo jedro, endoplazemski retikulum, Golgijev aparat, endosomi in lizosomi. Poteka preko dinamične izmenjave membran in proteinov v obliki majhnih, membranskih transportnih veziklov (slika 1) (4). Te poti so dolge in razvejane, nekatere potekajo tudi v obe smeri (3).

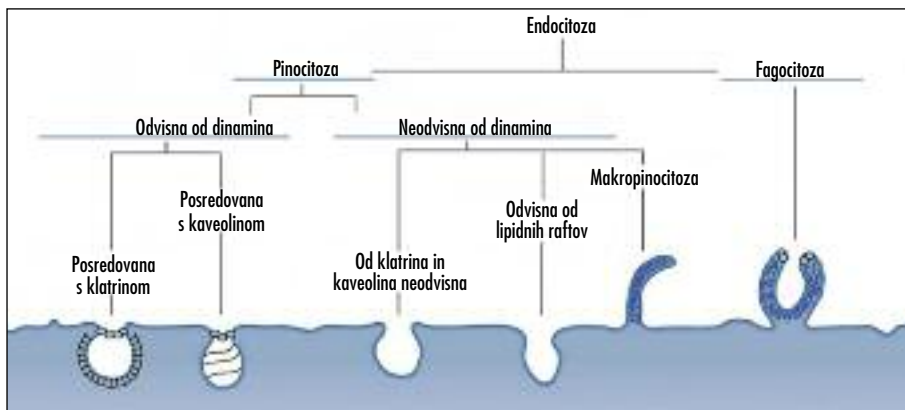


Slika 1. Vezikularni transport med celičnimi organeli in plazmalemo (5). Vezikli potujejo od plazmaleme proti središču celice in nazaj proti plazmalemi ob mikrotubulih in se na svoji poti po potrebi zlivajo z drugimi vezikli in organeli. S klatrinskim plaščem obdani vezikli se odcepljajo od plazmaleme in tudi od Golgijevega aparata kot del lizosomske in sekrecijske poti (označeno rdeče). ZE – zgodnji endosom, SE – sekrecijski vezikel, LI – lizosom, PE – pozni endosom, TGM – trans-Golgijeva mrežja, GA – Golgijev aparat, ER – endoplazemski retikulum.

## VRSTE ENDOCITOZE

Endocitoza je proces nastajanja novih notranjih membran, pri čemer plazmalema in del zunajceličnega prostora postaneta del celične notranjosti. Endocitoza je ključna za številne celične procese. Uravnava in omogoča celično signaliziranje, ki je ključno za rast in diferenciacijo celic. Omogoča tudi privzem hranil, utišanje receptorjev, citokinez, vzpostavljanje celične polarnosti in celične oblike (6, 7). V posebnih razmerah endocitotске poti izkoriščajo patogeni za okuženje celic, uporabimo pa jih lahko tudi v terapevtske namene, npr. za dostavo zdravilnih učinkovin (6).

Endocitozo v grobem razdelimo na fagocitozo, ki je prisotna predvsem v profesionalnih fagocitih, in pinocitozo, ki je prisotna v vseh celicah v telesu in kamor uvrščamo s klatrini posredovano endocitozo, s kaveolini posredovano endocitozo, makropinocitozo, od klatrina in kaveolina neodvisno endocitozo ter številne še slabo poznane poti vstopanja snovi v celice (slika 2) (tabela 1) (2).



Slika 2. Vrste endocitoze (6). Endocitozo v osnovi razdelimo glede na to, ali celica privzema večinoma večje delce (fagocitoza) ali večinoma tekočino in v njej raztopljene snovi (pinocitoza – celično pitje). Pinocitoza vključuje številne mehanizme, ki jih naprej razdelimo na odvisne ali neodvisne od dinamina, proteina, ki vezikel sprosti s plazmaleme. Dinamin je prikazan kot svetlo modri krogi na vratovih veziklov, aktin pa kot temno modre črte v izvihkih membrane.

## Fagocitoza

Fagocitoza je mehanizem privzema delcev, večjih od  $0,5\ \mu\text{m}$ . Enoceličarji jo uporabljajo za privzem hranil iz okolja. Pri mnogoceličarjih pa so fagocitoze sposobni predvsem profesionalni fagociti, kot so makrofagi in nevtrofilci. Ti iz telesa odstranjujejo patogene ter okužene in poškodovane celice in imajo pomembno vlogo pri imunskem odgovoru. V manjši meri fagocitozo opravljajo tudi fibroblasti, endotelijske in epitelijske celice, ki tako sodelujejo pri razvoju in obnovi tkiv (8).

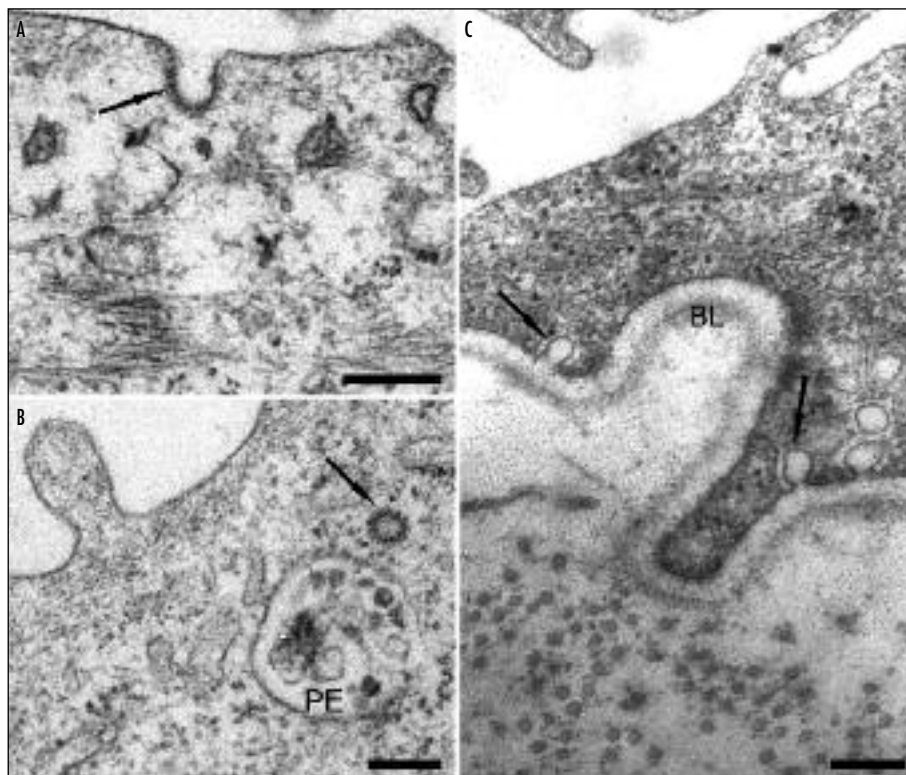
Fagocitozo sproži delec sam, ko z lastnimi molekulami ali opsonini aktivira posebne receptorje fagocitov. Aktivacija povzroči preureditev aktinskih filamentov in nastanek psevdopodijev, ki ob vezavi in aktivaciji novih receptorjev po sistemu zadrge tesno obdajo tujek, dokler se vrhovi teh membranskih izvihkov ne zlijejo in se nastali vezikel – fagosom odcepi od plazmaleme (2, 8, 9). Z zlivanjem in odcepljanjem veziklov membrana fagosoma in njegova vsebina postopoma zoriata, dokler se v končni fazi ne zlijeta z lizosomom, s čimer nastane zrel fagolizosom (8).

## S klatrini posredovana endocitoza

S klatrini posredovana endocitoza je najbolje raziskana vrsta endocitoze. V preteklosti so jo poimenovali kar z receptorji posredova-

na endocitoza ali receptorska endocitoza, ker z vezavo na receptorje omogoča internalizacijo specifičnega tovora, kot so npr. lipoproteini majhne gostote (angl. *low density lipoproteins*, LDL), epidermalni rastni faktor (angl. *epidermal growth factor*, EGF) ali transferin. Z njo pa se med drugim lahko internalizirajo tudi toksini, kot je npr. toksin antraksa. Danes vemo, da specifični receptorji lahko sodelujejo tudi pri drugih vrstah endocitoze, zato se izraz receptorska endocitoza opušča.

Klatrinski vezikli nastanejo iz klatrinskih jamic, ki prekrivajo 0,5–2% celične površine in se nahajajo na specifičnih predelih membrane, bogatih s fosfatidilinozitolfosfati (slika 1, slika 2, slika 3). Jamice na mikrofografijah presevnega elektronskega mikroskopa prepoznamo kot elektronsko goste predele na notranji strani plazmaleme. Sestavljene so iz nakopičenih integralnih membranskih receptorjev, na katere je lahko že vezan tovor za internalizacijo, in iz klatrinskega plašča. Osnovne enote klatrina, zaradi svoje oblike imenovane tudi triskelioni, se na membrani med seboj povežejo v košari podobno strukturo, ki ob tem membrano ukrivi in stabilizira. Premer nastajajočega klatrinskega vezikla je 85–120 nm (10, 11). Nastali vezikel se od membrane odcepi s pomočjo dinamina, GTPaze, ki se s svojo helikalno strukturo ovije okrog



Slika 3. S klatrini posredovana endocitoza (A in B) in s kaveolini posredovana endocitoza (C) na mikrogramih presevnega elektronskega mikroskopa. Klatrinska jamaica z elektronsko gostimi klatrini (puščica) na citosolni strani plazmaleme (A). Endocitotski vezikel (puščica), ločen od plazmaleme, a še vedno obdan s klatrinskim plaščem. Pozni endosom (PE) v citoplazmi epitelijske celice v bližini endocitotskega vezikla (B). Številne stekleničasto oblikovane kaveole (puščice) na bazolateralni plazmalemi epitelijskih celic. Bazalna lamina (BL) ločuje epitelij od spodaj ležečega vezivnega tkiva (C). Merila ustrezajo velikosti 200 nm.

vratu vezikla in ga ob hidrolizi gvanozin-5'-trifosfata (GTP) odcepi od plazmaleme (2, 11). S klatrinskim plaščem obdani vezikli se odcepljajo tudi od Golgijevega aparata kot del lizosomske in sekrecijske poti (slika 1).

S klatrini posredovana endocitoza je konstitutivna ali pa jo sproži ustrezen signal. S konstitutivno endocitozo večinoma poteka privzem receptorjev, ki se neprestano internalizirajo in reciklirajo, ob tem pa iz okolja privzemajo makromolekule ali iz obtoka odstranjujejo virusne delce (11). S stimulirano endocitozo se večinoma internalizirajo s signalno molekulo aktivirani receptorji ter se s tem ali odstranijo iz membrane in razgradijo ali reciklirajo, internalizacija pa je lahko tudi nujen korak za pravilno signaliziranje (11, 12).

### **S kaveolini posredovana endocitoza**

Pri s kaveolini posredovani endocitozi poteka internalizacija preko kaveol, majhnih stekleničasto oblikovanih membranskih uvihkov s premerom 50–100 nm, ki so z zunajceličnim prostorom povezani z vratu podobno strukturo (slika 2, slika 3) (13). Pojavljajo se v številnih sesalskih celicah, posebej pogoste pa so v adipocitih in celicah kapilarnega endotela, kjer lahko predstavljajo tudi tretjino celotne površine membrane (2, 13, 14). Kaveole so, podobno kot lipidni rafti, na detergente odporne membranske domene, bogate z glikosfingolipidi, sfingomielinom in holesterolom, med seboj povezanimi in stabiliziranimi z integralnimi membranskimi proteini kaveo-

lini (14). Približno 100–200 molekul kaveolina je potrebnih za oblikovanje enega kaveolinskega vezikla (2). Kaveolin najverjetneje zavira internalizacijo, saj so kaveole sorazmerno statične strukture, njihovo internalizacijo pa lahko sproži vezava ligandov (npr. albumina) na receptorje v kaveolah, kar sprosti inhibicijo (15, 16). Vezikel od membrane odcepi GTPaza dinamin, lahko pa se oblikuje dolge s kaveolinom bogate membranske invaginacije, ki segajo globoko v notranjost celice in so še vedno povezane z zunajceličnim prostorom. Vezikli, ki se odcepijo od membrane, potujejo v notranjost celice v perinuklearno regijo, kjer se zlijejo v endosom, imenovan kaveosom (17). Zadnje raziskave namigujejo, da so lahko tudi kaveosomi povezani z zunajceličnim prostorom, spet druge pa trdijo, da ti membranski predelki kot taki sploh ne obstajajo, pač pa so artefakt eksperimentalno povečane ekspresije kaveolina (18, 19). Kaveosomi naj bi tako bili zgolj endosomi, v katerih naj bi se z namenom razgradnje v lizosomih pojavil prekomerno izraženi kaveolin (20, 21).

Ena od glavnih lastnosti internalizacije s kaveolami je, da se s tem mehanizmom nastali vezikli pogosto ne vključijo v lizosomsko razgradno pot, pač pa jo celica uporablja predvsem za transcitozo molekul, ki morajo na poti skozi celico ostati nedotaknjene in biološko aktivne (2, 13, 14, 18). To izkoriščajo tudi številni patogeni za svojo invazijo (npr. mikobakterije, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*) (14). Pot je zanimiva tudi z vidika dostave zdravilnih učinkovin, ki bi se sicer razgradile v lizosomih.

## Makropinocitoza

Makropinocitoza je vrsta endocitoze, ki omogoča internalizacijo velikih delcev tudi celicam, ki sicer niso sposobne fagocitoze. V primerjavi z drugimi tipi pinocitoze makropinocitozo zaznamuje intenzivno izvihavanje plazmaleme v obliki ploščatih izvihkov – lamelipodijev, skodeličasto oblikovanih krožnih izvihkov in v nekaterih primerih v obliki membranskih mehurčkov (slika 2). Izvihavanje plazmaleme običajno sproži zunanji signal, npr. rastni faktor, pa tudi bakterije, virusi, apoptotska telesa in nekrotske celice, omogoči pa jo prerazporeditev aktinskih fila-







mentov tik pod plazmalemo celice (10). Izvihki oblikujejo z zunajceličnim matriksom napolnjeno jamico, iz katere nastane vezikel makropinosom (6). Ker v tem procesu ne sodelujejo plaščni ali kakšni drugi proteini, ki bi vodili ali stabilizirali nastajajoči vezikel, so makropinosomi zelo heterogeni tako v svoji obliki kot tudi v velikosti (0,5–10 µm v premeru), njihova membrana pa je po strukturi enaka plazmalemi. Ker so tako veliki, celici omogočajo zelo učinkovit, vendar neselektiven privzem zunajceličnih molekul in ionov. Pomembno vlogo imajo pri imunskem odzivu. Makropinocitoza namreč omogoča zajem večje količine antigenov in nato njihovo predstavljanje. Sodeluje tudi pri celični migraciji in odstranjevanju apoptotskih teles, ta mehanizem pa mnogokrat izkoristijo tudi bakterije in virusi za vstop v celico (npr. *Salmonella typhimurium*) (6, 10, 16).

Makropinocitozi podobno vrsto endocitoze, prav tako s številnimi membranskimi izvihki – invadopodiji, izkoriščajo rakave celice. Rakave celice iztegujejo invadopodije v zunajcelični matriks, kjer s pomočjo topnih in transmembranskih metaloproteinaz razgradijo molekule zunajceličnega matriksa. Invadopodiji nato endocitirajo sestavine matriksa, ki se prenesejo do lizosomov. Takšna vrsta endocitoze močno pripomore k hitrejši invaziji rakavih celic (2, 22).

## Od klatrinov in kaveolinov neodvisna endocitoza

Poleg že naštetih, dokaj dobro opisanih endocitotskih poti so poznane še številne poti, o katerih pa vemo manj. Nekatere so od klatrina in kaveolina neodvisne, nekatere so neodvisne tudi od dinamina, pogosto pa so odvisne od holesterola oz. lipidnih raftov (slika 2). Njihove poti se lahko na nekaterih delih tudi prepletajo (2). Tako se lahko podenota B toksina kolere in GPI-vezani proteini, ki se po navadi nahajajo v lipidnih raftih in so na membrano vezani preko glikozilfosfatidilinozitolnih sider, internalizirajo tako z endocitozo preko poti, neodvisne od klatrina, povezane z zgodnjimi endosomi, bogatimi z GPI-vezanimi proteini (angl. *clathrin independent carrier/GPI-AP-enriched early endosomal compartment pathway*, CLIC/GEEC), kot tudi s floti-

Tabela 1. Pregled mehanizmov endocitoze, njihove morfologije in tovora (2, 23–25). LDL – lipoproteini majhne gostote, EGF – epidermalni rastni faktor (angl. epidermal growth factor), GLIC/GEEC – angl. clathrin independent carrier/GPI-AP-enriched early endosomal compartment pathway.

Vrsta endocitoze	Morfologija	Tovor	Vstop patogenov	Slika
S klatrini posredovana endocitoza	vezikularna	receptor protein-kinaza, s proteini G povezani receptorji, transferin, LDL, EGF	toksin antraksa, podenota B šiga toksina, virus gripe tipa A, <i>Listeria monocytogenes</i>	
S kaveolini posredovana endocitoza	vezikularna, tubulovezikularna	GPI-vezani proteini	toksin kolere, mikobakterije, <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>	
Fagocitoza	oblike tovora	patogeni, apoptotska telesa, celični fragmenti	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , brucele, <i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella flexneri</i>	
Makropinocitoza	membranski izvihki	označevalci tekoče faze, receptor protein-kinaza	adenovirus B tipa 3, <i>Salmonella typhimurium</i>	
Endocitoza preko poti CLIC/GEEC	tubularna, obročasta	označevalci tekoče faze, GPI-vezani proteini	toksin kolere	
Od flotilina odvisna endocitoza	vezikularna	protektin CD59, proteoglikani	toksin kolere	

linom ter celo s klatrini in kaveolini posredovano endocitozo (18).

Odkrite so bile še številne druge poti, ki so poimenovane po prisotnosti ali odsotnosti klatrina, kaveolina, adapterskega proteina 2 (angl. *adapter protein 2*, AP2), dinamina, epsina, adenozin-5'-difosfat (ADP) ribozilacijskega faktorja 6 (angl. *ADP-ribosylation factor 6*, ARF6) ali holesterola, vendar so slabo raziskane in v celicah manj pogoste, povezane le z internalizacijo specifičnih membranskih receptorjev (2). Taka je npr. od proteina RhoA odvisna endocitoza, s katero poteka internalizacija receptorja za citokin interleukin-2 (16, 18).

## ENDOCITOTSKE POTI

Endocitotske poti vodijo v nastanek različnih endocitotskih veziklov – endosomov, ki lahko preko kompleksnih interakcij z drugimi celičnimi predelki prinesejo svoj tovor in membranske proteine do različnih lokacij v celici. Vezikle lahko med seboj ločimo po prisotnosti ali odsotnosti določenih zanje značilnih proteinov – markerskih proteinov. Ta

način določevanja pa ni povsem zanesljiv, saj noben od mehanizmov razporejanja proteinov v vezikle ni povsem učinkovit in markerski proteini se tako lahko znajdejo tudi v drugih veziklih in poteh. To je v veliki meri otežilo raziskovanje znotrajceličnih endocitotskih poti, kljub temu pa lahko endocitotsko pot opišemo z naslednjimi organeli s specifičnimi funkcijami (26):

- zgodnji endosom, ki pravzaprav opisuje dva endosomska organela: sortirajoči zgodnji endosom (SE) in reciklirajoči zgodnji endosom (RE),
- pozni endosom ali multivezikularno telo in
- lizosom.

## Sortirajoči zgodnji endosom

Ko se novonastali endocitotski vezikel odcepi od plazmaleme, se zlije z drugimi na novo nastalimi endocitotskimi vezikli in z že obstoječim SE, pri čemer sodelujejo proteini SNARE (angl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), ki omogočajo specifično zlivanje membran (26). SE se običajno nahajajo na celični periferiji. Sestavlje-

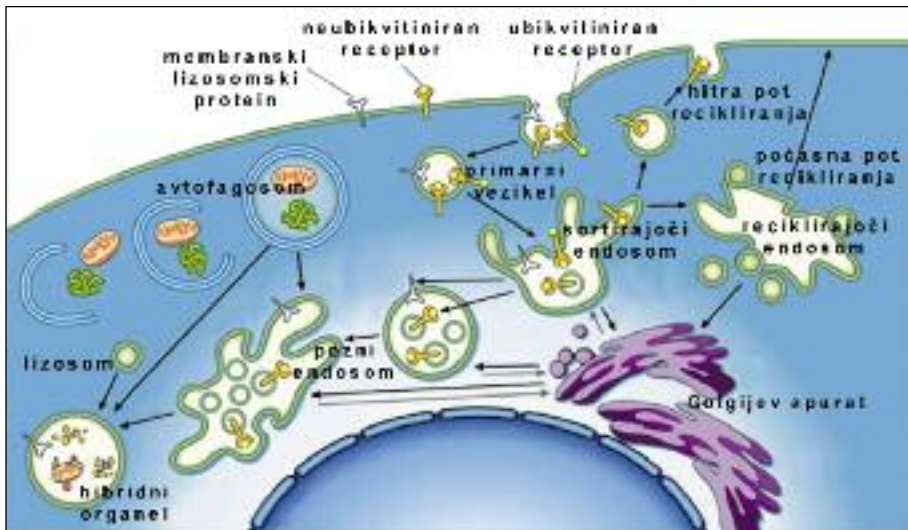
ni so iz vezikla s premerom okoli 400 nm in tubularnih izrastkov s premerom okoli 60 nm, v njihovi svetlini je pH približno 6,0 (27, 28). SE je prvo razvejšče endocitotske poti, kjer se zbirajo vezikli iz različnih endocitotskih poti in se endocitirane molekule usmerjajo na ustrezne lokacije (27). Iz njega se lahko molekule vrnejo na plazmalemo ali pa potujejo naprej v notranost celice bodisi v pozni endosom bodisi v RE (slika 4) (26, 29, 30).

Zaradi sorazmerno nizkega pH, ki povzroči konformacijske spremembe določenih receptorjev, se večina ligandov sprosti v svetlino SE. To je prvi korak v procesu sortiranja, saj omogoča recikliranje receptorjev. Medtem internalizirani tovor in deli membran, namenjeni razgradnji, zorijo v pozni endosom, ne da bi pri tem zapustili svetlino organela (9, 26, 31). Preden se zoreči SE pomakne v osredje celice, se iz njega odstrani večina molekul, namenjenih recikliranju, pri tem pa se reciklira tudi veliko membrane, ki se učinkovito odceplja iz temu namenjenih tubularnih struktur organela (26, 27). Pot recikliranja iz SE direktno na plazmalemo imenujemo hitra pot recikliranja in lahko poteče že nekaj minut po inter-

nalizaciji (31). Endocitirani receptorji, ki jih celica reciklira, imajo posebno sortirajočo domeno, na katero se vežejo specifični proteini in jih vključujejo v reciklirajoče dele membrane. Tako se reciklirajo številni receptorji za privzem makromolekul (27). Proteini, namenjeni v pozni endosom, npr. s specifičnim signalom aktivirani receptorji, pa imajo na citoplazemsko domeno vezan ubikvitin, 76 aminokislinskih ostankov velik protein, ki je splošen signal za razgradnjo proteinov (26, 27). Z njihovo internalizacijo in razgradnjo se signaliziranje prekine, celica pa je do sinteze novih receptorjev neodvisna na specifičen signal – ligand (26). V razgradnjo v poznem endosomu se usmeri tudi večina internaliziranih ligandov, predvsem hranil (30).

### Reciklirajoči zgodnji endosom

Reciklirajoči zgodnji endosom (RE) je dolgoživ nabor tubularnih organelov s premerom okoli 60 nm (slika 4). Proteini, ki se znajdejo v RE, niso namenjeni razgradnji (28). Iz njega molekule potujejo na različne lokacije, večinoma pa se vrnejo na plazmalemo, kar



Slika 4. Znotrajcelično potovanje veziklov (33). Različni membranski proteini se internalizirajo v procesu endocitoze in zberejo v sortirajočem endosomu, od koder glede na svoje lastnosti (ubikvitinirani in neubikvitinirani proteini) potujejo na različne lokacije v celici. Nekateri receptorji, kot so npr. različni receptorji za privzem hranil (neubikvitinirani receptorji), se reciklirajo nazaj na membrano po hitri ali po počasni poti. Ubikvitinirani proteini se sortirajo v pozne endosome, ki se, ko popolnoma dozori, z lizosomi zlijejo v hibridne organele. Na tak način se razgradi tudi vsebina avtofagosomov.



imenujemo počasna pot recikliranja, saj v primerjavi s hitro potjo preko sortirajočega endosoma (v manj kot 5 minutah) potrebuje 10–15 minut (26). Sortiranje in recikliranje sta v RE veliko bolj regulirana kot v SE in pri tem sodeluje večji nabor regulacijskih proteinov, med katerimi ima zelo pomembno vlogo monomerni protein G ARF6, saj rekrutira in interagira s številnimi proteini, ki so potrebni za oblikovanje vezikla, njegovo odcepitev in preoblikovanje aktinskih filamentov (31). Sortiranje večina poteka brez signalnih zaporedij, ta pa so potrebna pri polariziranih celicah, ki specifične proteine usmerjajo najprej v ločena predela RE, nato pa temu ustrezno na apikalno ali bazolateralno plazmalemo (26, 31). RE je močno povezan tudi z biosintezno potjo in razporejanjem novo nastalih proteinov, ki vanj pridejo iz Golgijevega aparata (32).

### **Pozni endosom ali multivezikularno telo**

Pozni endosom, imenovan tudi multivezikularno telo, ima v lumnu številne majhne vezikle, dobro vidne s presevnim elektronskim mikroskopom, in v primerjavi z zgodnjim endosomom že nekoliko bolj kisel pH (pH 5,5–6,0) (9). Intraluminalni vezikli s premerom 40–90 nm nastanejo z odcepljanjem invaginacij endosomske membrane, kar se v manjši meri začne že pri zgodnjih endosomih, z njihovim zorenjem pa se število veziklov povečuje (slika 4) (34). Nastanek teh veziklov je edini način za učinkovito razgradnjo membrane in v njej usidranih ubikvitiniranih proteinov, saj je membrana samega poznega endosoma močno glikozilirana, kar jo zaščiti pred samorazgradnjo. Pri nastanku intraluminalnih veziklov sodelujejo proteini kompleksa ESCRT (angl. *endosomal sorting complex required for transport*), ki oblikujejo vezikel in vanj usmerjajo proteine, namenjene razgradnji (29). Proteini kompleksa ESCRT so citosolni proteini, ki se ob ustreznem signalu, npr. prisotnosti ubikvitiniranega receptorja za EGF v membrani endosoma, vežejo na ubikvitiniran receptor in omogočijo energijsko zahteven proces invaginacije in nato odcepitve tega dela endosomske membrane v notranjost poznega endosoma. V primerjavi z drugimi vezikli v celici, ki nastajajo v ci-

tosol, ti nastajajo iz citosola, zato proteini kompleksa ESCRT, lahko delujejo le iz zunanje strani poznega endosoma, sicer bi se tudi sami vključili v razgradno pot (35). Različni patogeni, med njimi tudi človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV) in virus Ebola, pa izkoriščajo proteine kompleksa ESCRT za izstop iz celice, kar jim omogoča učinkovito nadaljnje razširjanje okužbe (36).

Vezikli v multivezikularnem telesu lahko predstavljajo tudi zalogo transmembranskih receptorjev, ki se lahko izločijo iz celice v obliki eksosomov tako, da se pozni endosom zlije s plazmalemo (7). Tako sproščeni eksosomi se lahko vežejo ali celo zlijejo s sosednjimi celicami ali pa jih te endocitirajo. Predstavljajo torej neke vrste komunikacijo med celicami (37).

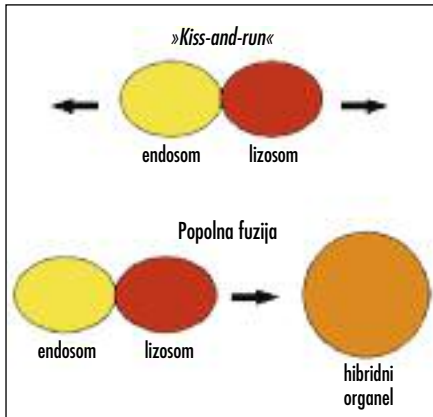
Pozni endosom lahko namesto majhnih veziklov vsebuje tudi koncentrične membranske lamele in ga imenujemo multilamelarno telo. Multilamelarna telesa nastajajo z avtofagijo in imajo poleg encimske razgradnje tudi funkcijo shranjevanja in izločanja lipidov (28, 38, 39).

### **Lizosom**

Lizosomi so dinamični, z membrano obdani organeli, ki v premeru merijo 0,2–0,5  $\mu\text{m}$ . Vsebujejo številne hidrolitične encime, ki optimalno delujejo v kislem okolju (pH okoli 4,0–5,0). Kisel pH vzpostavljajo in vzdržujejo od adenosin-5'-trifosfata (ATP) odvisne membranske protonske črpalke s črpanjem protonov ( $\text{H}^+$ ) v svetlino lizosoma. Membrana lizosoma vsebuje tudi številne transportne proteine, ki končne produkte lizosomske razgradnje makromolekul prenesejo v citosol, od koder jih celica izloči ali pa ponovno uporabi. Večina lizosomskih membranskih proteinov je močno glikoziliranih, kar jih varuje pred razgradnjo z lizosomskimi proteazami (34).

Do interakcije poznih endosomov in lizosomov prihaja v perinuklearni regiji celice, kjer so pozni endosomi in lizosomi zbrani okrog organizacijskega centra mikrotubulov. Obstajajo številne hipoteze, kako pride do prenosa endocitiranega tovora iz poznega endosoma v lizosom. Med njimi sta z modeli najbolj podprti hipoteza »*kiss-and-run*« in hipoteza





Slika 5. Hipotezi prenosa tovora iz poznega endosoma v lizosom.

popolnega zlivanja lizosoma z endosomom (slika 5). Pri modelu »kiss-and-run« prihaja do ponavljajočih se kratkotrajnih zlivanj med membranama endosoma in lizosoma, pri čemer se vsebini obeh pomešata. Pri modelu popolnega zlivanja lizosoma z endosomom pa nastane hibridni organel, ki nosi proteinske označevalce obeh organelov (29, 40). Najverjetneje potekata oba tipa fuzije, pri čemer interakcijam tipa »kiss-and-run« sledi popolno zlitje v hibridni organel (40, 41). Nastali hibridni organel je mesto razgradnje endocitiranih molekul, lizosom pa deluje le kot rezervoar hidrolitičnih encimov. Ko se razgradnja zaključi, se sproži recikliranje lizosoma iz membrane hibridnega organela (41).

## ENDOCITOZA IN VSTOP PATOGENOV V CELICE

Čprav lahko makrofagi uspešno zaustavijo patogene s fagocitozo, pa različni virusi in bakterije po endocitotskih poteh vseeno vstopajo v različne tipe celic. Kar 65 % virusov gripe vstopi v celice z endocitozo, posredovano s klatrini, ostali pa z od klatrinov in kavelinov neodvisno endocitozo. Če obe vrsti endocitoze zavremo, ugotovimo, da virusi gripe še vedno lahko okužijo celice, kar pomeni, da lahko ti virusi uporabijo še druge endocitotske poti (2, 42).

Če patogeni ne izstopijo iz endocitotske poti pravočasno, se njihova pot k sreči konča v lizosomih. A tudi to ne velja vedno, saj

lahko nekateri patogeni v membrano lizosoma naredijo pore in iz njega izstopijo, spet drugi izkoristijo endocitotske poti, ki namesto do lizosoma vodijo do Golgijevega aparata ali celo endoplazemskega retikuluma. Podoben mehanizem vstopa izkoristijo tudi nekateri toksini (npr. toksin kolere), s čimer se izogonej razgradnji z lizosomskimi hidrolitičnimi encimi (43).

## ENDOCITOZA IN BOLEZNI

Okvare endocitotskih poti so znane pri različnih oblikah raka, miopatijah ter metaboličnih, duševnih in nevrodegenerativnih boleznih. Večje mutacije v genih ali spremembe v delovanju markerskih proteinov endocitotskih poti, kot sta klatrin in kaveolin-1, pa tudi pomožnih proteinov, kot so AP2, dinamin in epsin, so smrtne v fazi zarodka. Večinoma so vzroki teh boleznih povezani s somatskimi mutacijami, enojnimi nukleotidnimi polimorfizmi, povečanim ali zmanjšanim izražanjem nekaterih pomožnih proteinov ter s spremembami molekul tovora (44, 45). Podrobneje bomo povezavo z endocitozo opisali pri avtosomno recesivni hiperholesterolemiji, Alzheimerjevi bolezni in vulgarnem pemfigusu.

Pri avtosomni recesivni hiperholesterolemiji je v krvi povišana koncentracija LDL (več kot 3 mmol/l), podobno kot pri družinski hiperholesterolemiji, ki se deduje avtosomno dominantno. Za razliko od družinske hiperholesterolemije, kjer je mutiran gen za receptor LDL, je pri avtosomni recesivni hiperholesterolemiji prisotna mutacija gena za pomožni avtosomni recesivni hiperholesterolemični protein (angl. *autosomal recessive hypercholesterolemia protein*, ARH). Zaradi nefunkcionalnosti proteina ARH se receptor LDL ne more povezati s klatrinom in pomožnim proteinom AP2, zaradi česar je zbiranje receptorjev LDL v področju klatrinske jamice in njihova internalizacija onemogočena (46).

Alzheimerjeva bolezen pomeni hujši upad ali izgubo intelektualnih in spominskih sposobnosti. Med biološke označevalce Alzheimerjeve bolezni sodijo amiloidni plaki, katerih številčnost je močno povezana z verjetnostjo za nastanek bolezni (47). Ti plaki nastajajo v amiloidogenem procesu, ki se začne z od flotilina in holesterola odvisno

endocitozo amiloidnega prekursorskega proteina (APP). V reciklirajočem endosomu se APP proteolitično razgradijo na amiloidne peptide beta ( $A\beta$ ), ki se preko poznega endosoma transportirajo v zunajcelični prostor. Tu se  $A\beta$  združujejo in tvorijo amiloidni plak. Nedavne raziskave so pokazale, da utišanje flotilina z majhno interferenčno RNA onemogoči endocitozo APP v živčnih celicah *in vitro* in tako značilno zmanjša nastanek  $A\beta$  (48). Z inhibicijo endocitoze APP bi tako v prihodnje lahko zmanjšali nastanek  $A\beta$  in posledično tudi amiloidnih plakov. Če so amiloidni plaki že prisotni, pa bi s sprožitvijo endocitoze lahko dosegli, da se endocitirajo in v lizosomih dokončno razgradijo.

Vulgarni pemfigus (lat. *pemphigus vulgaris*) je avtoimunska bolezen, pri kateri se tvorijo protitelesa proti dezmosomskemu proteinu desmogleinu 3 (Dsg3). Vežava protiteles na Dsg3 sproži njegovo endocitozo, zaradi česar se število dezmosomov v epidermisu kože zmanjša. To se izraža v slabšanju povezav med epitelijskimi kožnimi celicami in nastanku intraepitelijskih akantolitičnih mehurjev, ki hitro počijo in se počasi celijo, pri napredovani bolezni pa se koža celo lušči v večjih zaplatah (49).

Ti in številni drugi primeri kažejo, da je poznavanje molekularnih in funkcionalnih mehanizmov endocitoze ključno za razumevanje osnovnih celično-bioloških procesov, procesov nastajanja bolezni in tudi za smotno iskanje novih oblik zdravljenja.

## **ENDOCITOZA IN VNOS TERAPEVTSKIH UČINKOVIN**

Poznavanje lastnosti in zahtev, specifičnih za vsako endocitotsko pot, je omogočilo tudi osnovanje makromolekularnih kompleksov – struktur za tarčni vnos učinkovin. Učinkovino lahko neposredno vežemo na molekulo ali jo vgradimo v nosilni sistem, ki omogoča specifično vezavo na določen tip receptorjev in s tem kopičenje v tarčnem tkivu (50). S tem zmanjšamo nezaželene učinke in tudi povečamo dostavo učinkovine v tarčno tkivo. Z izbiro receptorjev in ligandov, ki jih vežemo na nosilni sistem, pa lahko dosežemo tudi privzem z natančno določeno endocitotsko pot-

jo, kar je lahko ključno za pravilno delovanje učinkovine.

Mehanizem endocitotskega privzema je namreč neposredno povezan z znotrajcelično usodo učinkovine. Nekatere poti, kot je npr. s kaveolini posredovana endocitoza, se izogonejo lizosomski razgradnji, kar se izkorišča pri vrsti zdravil, kjer je pomembno, da so molekule zaščitene pred encimsko razgradnjo v lizosomih. Po drugi strani nekatera druga zdravila za svoje delovanje izkoristijo kislo okolje lizosoma, ki omogoča sproščanje učinkovine v citoplazmo (51).

Ustrezna kombinacija nosilca – vektorja in učinkovine tako omogoča nadzorovano dostavo v endosome in lizosome, kar lahko uporabimo za zdravljenje raka, Alzheimerjeve bolezni in lizosomskih boleznih kopičenja (51–53).

V splošnem imajo različne z receptorji posredovane endocitotske poti prednost pri tarčnem vnosu učinkovin, saj specifični privzem dosežemo z vezavo ustreznega liganda, ki se običajno internalizira z določeno (želeno) potjo. Najbolj je raziskana s klatrini posredovana endocitoza, saj poleg tega da omogoča sistemski privzem s splošno izraženimi receptorji, kot je npr. receptor za transferin, omogoča tudi bolj ciljan privzem preko receptorjev, ki se izražajo le pri določenih celičnih tipih, kot sta npr. receptor za EGF, ki je prekomerno izražen v nekaterih tumorskih celicah, ali receptor za asialoglikoprotein, ki se izraža v hepatocitih. Endocitozo preko transferina uporabljajo tudi za vnos skozi možgansko krvno pregrado v centralni živčni sistem (54). Za internalizacijo s kaveolini posredovano endocitozo se uporabljajo ligandi, kot so albumin, holesterol, folna kislina in vitamin B<sub>6</sub>, med katerimi sta slednja najbolj obetavna za tarčni vnos učinkovin, ki naj se izogonejo lizosomski razgradnji. Nosilni sistemi za kemoterapevtike, ki vstopajo po poti, ki se izogne razgradnji v lizosomu, imajo vezi, odvisne od pH, kar omogoča že njihovo sproščanje v kislem okolju endosoma in nato prehod do jedra celice (51).

Novejši pristopi za vnos protitumorskih učinkovin uporabljajo tudi povečano izražanje določenih receptorjev na rakavih celicah, kot je npr. folatni receptor, ki se intenzivneje izraža kar pri tretjini rakavih obolenj (55).

Iz tega sledi, da lahko s specifično kombinacijo nosilnih sistemov in vezanih molekul dosežemo bolj specifičen vnos v določene tipe celic. V zadnjem času se raziskuje vrsta nosilnih sistemov v obliki nanodelcev za ciljani vnos učinkovin.

## POMEN ENDOCITOZE ZA UPORABO NANODELCEV V MEDICINI

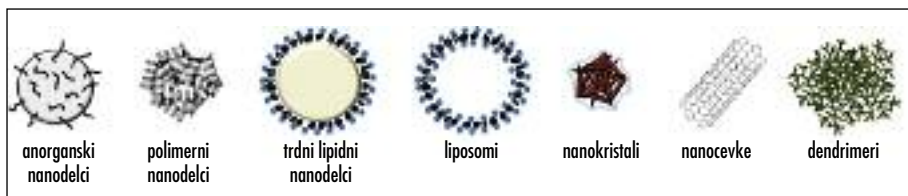
V zadnjih desetletjih se je izjemno povečala uporaba nanodelcev kot nosilnih sistemov za vnos učinkovin. Nanodelci so delci nanometrskih velikosti, ki imajo ravno zaradi svoje majhnosti možnost prehajanja v celice preko različnih poti endocitoze. Poleg tega imajo veliko funkcionalno površino pri sorazmerno majhni masi, na katero lahko z ustrezno površinsko obdelavo vezemo različne vrste molekul, kot so ligandi, protitelesa in oligonukleotidi. Za uporabo v biomedicinske namene morajo imeti nanodelci naslednje lastnosti: dobro definirano velikost, biokompatibilnost ter ustrezne površinske lastnosti, ki omogočajo prehajanje skozi različne biološke pregrade (zunajcelični matriks, epitelije, endotelije) in vstop skozi celično membrano v citosol ali v tarčne organele. Pri sistemskem vnosu nanodelcev intravenozno je tudi ključno, da so prevlečeni s plastjo npr. polietilenglikola, ki jih »skrije« in jih zaščiti pred fagocitozo.

Na področju biomedicine se trenutno razvija vrsta različnih aplikacij nanodelcev za vnos učinkovin, v diagnostiki pa se že uspešno uporabljajo kot kontrastno sredstvo za nuklearno magnetno resonanco (56, 57). Trenutno poteka vrsta predkliničnih in kliničnih raziskav, ki razvijajo različne formulacije zdravil na osnovi nanodelcev kot nosilnih sistemov za zdravljenje raka, kardiovaskularnih boleznih in infektivnih boleznih (57, 58).

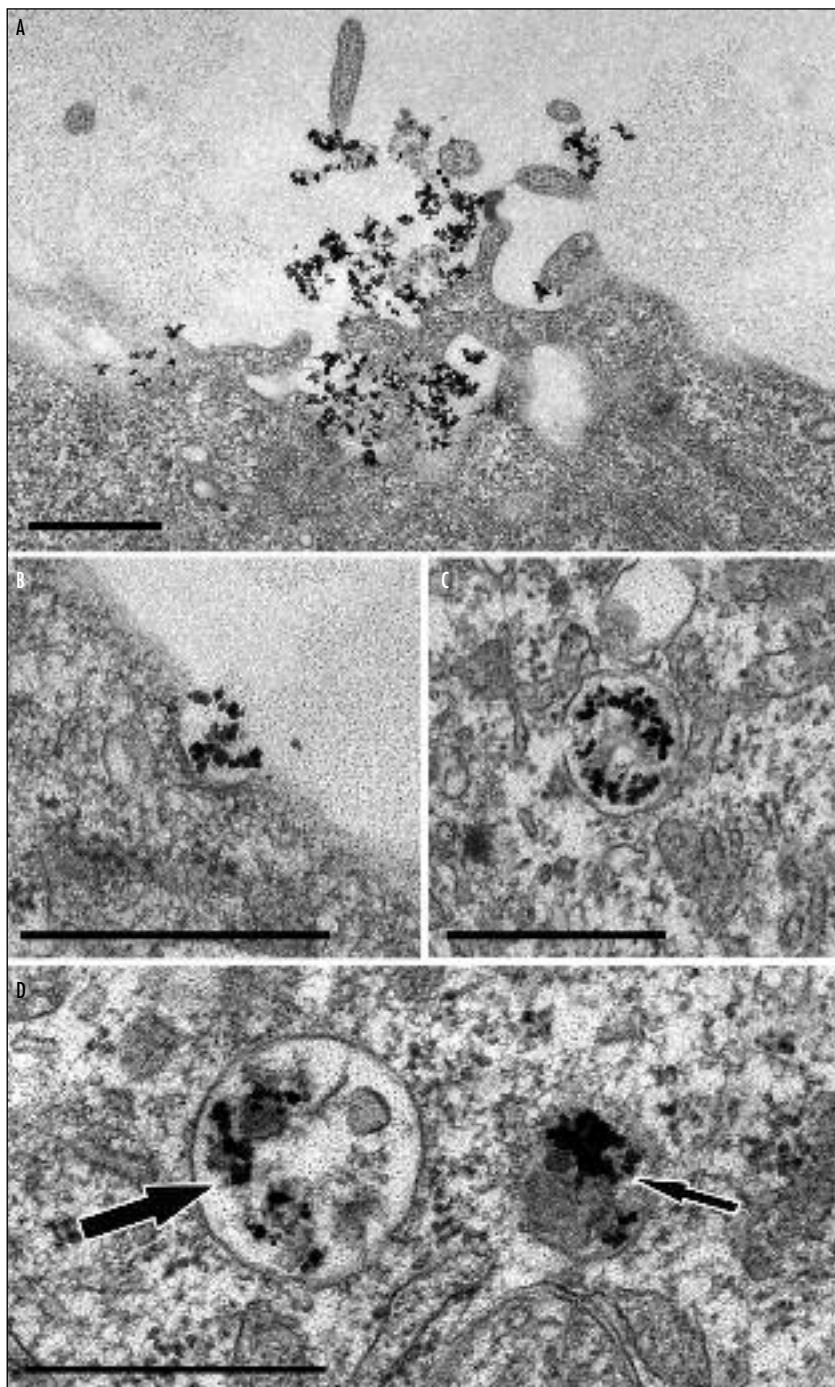
Prednost uporabe nanodelcev je, da omogočajo dostavo učinkovine do tarčnih tkiv, povečajo stabilnost učinkovin in zmanjšajo stranske učinke na neta tarčna tkiva. Vendar pa je trenutno registriranih in v uporabi le nekaj zdravil na njihovi osnovi, npr. Abraxane® – albuminski nanodelci s paklitakselom za zdravljenje metastatskega raka dojke (59). Ena izmed ovir za uveljavitev zdravil v kombinaciji z nanodelci je zahtevno testiranje potencialnih škodljivih učinkov nanodelcev.

Obstaja več vrst različnih nanodelcev, v splošnem pa jih delimo na liposomske, polimerne, neorganske (npr. magnetni nanodelci), dendrimere, nanocevkke, lipidne nanodelce in različne oblike večplastnih nanokapsul (slika 6).

Privzem nanodelcev v celice so raziskovale številne raziskovalne skupine, ki so dokazale, da gre v večini primerov za nadzorovan in aktiven proces endocitoze. Znano je, da je na nivoju celice endocitotska pot privzema nanodelcev odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (velikosti, oblike, površinskega naboja, hidrofilnosti ali hidrofobnosti, površinsko vezanih molekul), velik vpliv pa imajo tudi številni fiziološki dejavniki (temperatura, pH, prisotnost seruma in rastnih faktorjev) ter celični tip, saj imajo različne celice različno izražene endocitotske poti (47, 61). Znano je, da zelo majhni nanodelci (manjši od 10 nm) lažje prehajajo skozi biološke pregrade, težava velikih nanodelcev ali agregatov nanodelcev, večjih od 1.000 nm, pa je, da je njihova mobilnost v tkivih slaba. Tako večina biomedicinskih aplikacij uporablja nanodelce s premerom 10–300 nm. Veliki delci oz. njihovi agregati lahko v celico vstopijo le z makropinocitozo ali fagocitozo, ki omogočata nastanek velikih endocitotskih veziklov (tudi do nekaj  $\mu\text{m}$  v premeru). Večina ostalih endocitotskih poti, kot sta s klatrini ali s kaveolini



Slika 6. Prikaz različnih vrst nanodelcev (60).



Slika 7. Kobalt feritni nanodelci, prevlečeni s poliakrilno kislino, vstopajo v epiteljske celice trajne celične linije, izolirane iz ovarija kitajskega hrčka (angl. Chinese Hamster Ovary, CHO), z makropinocitozo (A) in z od klatrina odvisno endocitozo, kot je razvidno iz nanodelcev, prisotnih v klatrinski jamici (B) (63). Po internalizaciji delce najprej najdemo v zgodnjih endosomih (C), ki dozoriijo v pozne endosome (D, velika puščica) in v lizosome (D, majhna puščica). Merila ustrezajo velikosti 0,5  $\mu\text{m}$ .

posredovani, pa ima omejeno velikost vezikla in s tem velikost tovora, ki se lahko internalizira (slika 7). Ker sta ti endocitozi pogosto odvisni od specifičnih receptorjev, se z njima večinoma internalizirajo delci, ki imajo na svoji površini vezane ustrezne ligande, ki so nanje bodisi vezani bodisi so posledica adhezije proteinov iz krvne plazme. S kaveolini posredovano endocitozo so potrdili na primer za s polietilenglikolom prevlečene liposomske nanodelce z vgrajenim doksorubicinom (Doxil®) za zdravljenje metastatskega raka jajčnikov, s klatrini posredovano endocitozo pa so potrdili pri nanodelcih z vezanimi ligandi, kot sta npr. transferin in EGF (50, 62). Kot že omenjeno, je ustrezna izbira endocitotske poti ključna zaradi znotrajcelične usode delcev. Za sistemsko dostavo učinkovin z nanodelci pa je ključno tudi, da se izognemo fagocitozi z ustrezno pripravo površine delcev. Poleg morebitne lizosomske razgradnje na nivoju celice je pomembna tudi dolgoročna usoda delcev v tkivih in na njih vezanih komponent, še posebno, če ti niso biorazgradljivi (npr. magnetni nanodelci). Dolgoročna akumulacija delcev lahko vodi v celični stres, nastanek reaktivnih kisikovih intermediatov, zmanjšano celično preživetje, motnje proliferacije, poškodbe DNA ali celo v celično smrt. Pri vrednotenju nanodelcev moramo zato upoštevati ne le vpliv delcev na posamezne celice, temveč tudi na tkiva in organe.

Pot privzema nanodelcev in njihova znotrajcelična usoda je zapletena kombinacija fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev in

vrste celično-bioloških in fizioloških dejavnikov v telesu. Vse to odpira številne možnosti za nove sisteme vnosa učinkovin z nanodelci, hkrati pa velika variabilnost nanodelcev in bioloških sistemov za zdaj še otežuje njihovo široko uporabo v medicini.

## ZAKLJUČEK

Vrste internalizacij in znotrajcelične poti endocitotskih organelov, ki sodelujejo v endocitotski poti, so predmet intenzivnega raziskovanja že več desetletij in procesi so v naših očeh postali enostavni in logični. To znanje že več desetletij izkoriščajo za razvoj novih vrst zdravilnih učinkovin, v zadnjem času poteka tudi intenziven razvoj tarčnih zdravil na osnovi nanodelcev. Hiter razvoj molekularnih in mikroskopskih tehnik v zadnjem desetletju nam je ponudil nov pogled na kompleksno regulirane procese endocitoze in pojavila so se nova spoznanja, med njimi so si nekatera tudi nasprotujoča. Pogosto ni jasnih mej med posameznimi procesi in organeli. Raziskave dodatno otežuje homeostaza, s katero lahko celica kompenzira eksperimentalno povzročene spremembe. Tehnike genskega inženirstva so omogočile velik preboj pri spoznavanju proteinov, udeleženih pri različnih procesih, povezanih z endocitozo, a veliko raziskav bo še potrebnih, preden bomo razumeli tudi njihovo kompleksno regulacijo in zapleteno mrežo medsebojnih interakcij. To pa bo navsezadnje omogočilo razvoj še bolj učinkovitih zdravilnih učinkovin.

## LITERATURA

1. Ohno H. Overview: membrane traffic in multicellular systems: more than just a housekeeper. *J Biochem.* 2006; 139 (6): 941-2.
2. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 857-902.
3. Cheung AY, de Vries SC. Membrane trafficking: intracellular highways and country roads. *Plant Physiol.* 2008; 147 (4): 1451-3.
4. Evans PR, Owen DJ. Endocytosis and vesicle trafficking. *Curr Opin Struct Biol.* 2002; 12 (6): 814-21.
5. Yu IM, Hughson FM. Tethering Factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010; 26 (1): 137-56.
6. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.* 2009; 11 (5): 510-20.
7. Falguières T, Luyet PP, Gruenberg J. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res.* 2009; 315 (9): 1567-73.

8. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 593–623.
9. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003; 5 (14): 1299–306.
10. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 1995; 5 (11): 424–8.
11. Mousavi SA, Malerød L, Berg T, et al. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 2004; 377 (Pt 1): 1–16.
12. Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, et al. Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (42): 17615–22.
13. Gumbleton M, Abulrob AG, Campbell L. Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm Res.* 2000; 17 (9): 1035–48.
14. Shin JS, Abraham SN. Cell biology. Caveolae – not just craters in the cellular landscape. *Science.* 2001; 293 (5534): 1447–8.
15. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, et al. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* 2002; 13 (1): 238–50.
16. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003; 422 (6927): 37–44.
17. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci.* 2003; 116 (23): 4707–14.
18. Sandvig K, Pust S, Skotland T, et al. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23 (4): 413–20.
19. Sandvig K, Torgersen ML, Raa HA, et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129 (3): 267–76.
20. Parton RG, Howes MT. Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *J Cell Biol.* 2010; 191 (3): 439–41.
21. Hayer A, Stoeber M, Ritz D, et al. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol.* 2010; 191 (3): 615–29.
22. Buccione R, Orth JD, McNiven MA. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5 (8): 647–57.
23. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (8): 603–12.
24. Eierhoff T, Stechmann B, Römer W. Pathogen and Toxin Entry – How Pathogens and Toxins Induce and Harness Endocytic Mechanisms. In: Ceresa B, ed. *Molecular Regulation of Endocytosis* [internet]. New York: InTech; 2012 [citirano 2012 Nov 5]. Dosegljivo na: <http://www.intechopen.com/books/statistics/molecular-regulation-of-endocytosis/pathogen-and-toxin-entry-how-pathogens-and-toxins-induce-and-harness-endocytotic-mechanisms>
25. Nonnenmacher M, Weber T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe.* 2011; 10 (6): 563–76.
26. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5 (2): 121–32.
27. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, et al. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* 2010; 25 (1): 99–112.
28. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2 (10): 721–30.
29. Pryor PR, Luzio JP. Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793 (4): 615–24.
30. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* 2002; 3 (7): 443–51.
31. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10 (9): 597–608.
32. Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, et al. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17 (4): 423–34.
33. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 2009; 458 (7237): 445–52.
34. van Meel E, Klumperman J. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129 (3): 253–66.
35. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15 (4): 446–55.
36. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med.* 2001; 7 (12): 1313–9.
37. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 2000; 113 (19): 3365–74.
38. Hariri M, Millane G, Guimond MP, et al. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol Biol Cell.* 2000; 11 (1): 255–68.
39. Schmitz G, Müller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res.* 1991; 32 (10): 1539–70.
40. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (8): 622–32.
41. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, et al. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 9): 1515–24.

42. Damke H, Baba T, van der Blik AM, et al. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol.* 1995; 131 (1): 69–80.
43. Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol.* 2002; 4 (5): 374–8.
44. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12 (8): 517–33.
45. Schmid EM, McMahon HT. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature.* 2007; 448 (7156): 883–8.
46. Garuti R, Jones C, Li WP, et al. The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 2005; 280 (49): 40996–1004.
47. Reiman EM, McKhann GM, Albert MS, et al. Clinical impact of updated diagnostic and research criteria for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* 2011; 72 (12): e37.
48. Schneider A, Rajendran L, Honsho M, et al. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci.* 2008; 28 (11): 2874–82.
49. Delva E, Jennings JM, Calkins CC, et al. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2008; 283 (26): 18303–13.
50. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59 (8): 748–58.
51. Bathori G, Cervenak L, Karadi I. Caveolae – an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2004; 21 (2): 67–95.
52. Castino R, Démoz M, Isidoro C. Destination 'lysosome': a target organelle for tumour cell killing? *J Mol Recognit.* 2003; 16 (5): 337–48.
53. Tate BA, Mathews PM. Targeting the role of the endosome in the pathophysiology of Alzheimer's disease: a strategy for treatment. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2006; 2006 (10): re2.
54. Qian ZM, Li H, Sun H, et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev.* 2002; 54 (4): 561–87.
55. Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54 (5): 675–93.
56. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26 (18): 3995–4021.
57. Godin B, Sakamoto JH, Serda RE, et al. Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31 (5): 199–205.
58. Chakraborty C, Sarkar B, Hsu CH, et al. Future prospects of nanoparticles on brain targeted drug delivery. *J Neurooncol.* 2009; 93 (2): 285–6.
59. Cattaneo AG, Gornati R, Sabbioni E, et al. Nanotechnology and human health: risks and benefits. *J Appl Toxicol.* 2010; 30 (8): 730–44.
60. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17 (8): 2950–62.
61. Teskač Plajnšek K, Kocbek P, Erdani Kreft M, et al. Mechanisms of cellular uptake of nanoparticles and their effect on drug delivery. *Zdrav Vest.* 2012; 81 (3): 225–35.
62. Sahay G, Kim JO, Kabanov AV, et al. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials.* 2010; 31 (5): 923–33.
63. Bregar VB, Lojk J, Šuštar V, et al. Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 919–31.