

MAŁGORZATA LITWA, JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, Warszawa

E-mail: bandor@nencki.gov.pl

REGULACJA FUZJI BŁON PRZEZ JONY WAPNIA

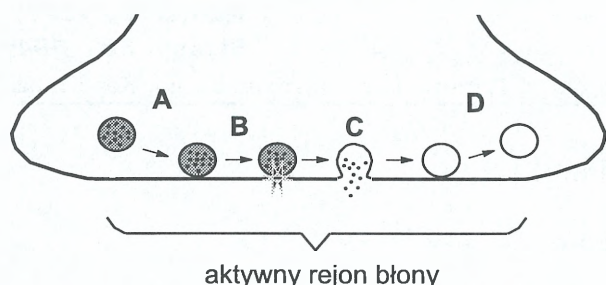
ZNACZENIE FUZJI BŁON

Fuzja błon jest zjawiskiem o kluczowym znaczeniu dla komórek. Odgrywa istotną rolę w zapłodnieniu, w rozwoju mięśni szkieletowych, w mineralizacji tkanki łącznej, w wydzielaniu przekazników nerwowych i hormonów z komórek nerwowych i komórek gruczołów dokrewnych, w biogenezie organelli komórkowych, w inwazji wirusa do komórki gospodarza, w detoksykacji organizmu (transport pęcherzykowy białek enzymatycznych Cu-ATPazy i transportera organicznych anionów), w transporcie białek, fosfolipidów, cholesterolu, żelaza, w wydzielaniu żółci w wątrobie i związków powierzchniowo czynnych w pęcherzykach płucnych i w wielu innych procesach (WHITE 1992, PARNAS i PARNAS 1994, HUGHSON 1995, DENESVRE i MALHOTRA 1996, MONCK i FERNANDEZ 1996, BANDOROWICZ-PIKUŁA i PIKUŁA 1997a, b). W większości wymienionych procesów zachodzi transport pęcherzykowy pomiędzy błonami organelli wewnątrzkomórkowych i błoną plazmatyczną, którego końcowym etapem jest fuzja błon pęcherzyka wydzielniczego z błoną przedziału akceptorowego i uwolnienie na zewnątrz zawartości pęcherzyka (egzocytoza). Pula pęcherzyków wydzielniczych ulega odnowieniu dzięki zjawisku endocytozy; pęcherzyki, które uległy fuzji z błoną i uwolniły swoją zawartość, odrywają się od błony i wędrują do wnętrza komórki. Ważnym czynnikiem regulującym fuzję błon są zmiany stężenia jonów wapnia w komórce (BURGOYNE i MORGAN 1995, HARTE i WIELAND 1996, ROTHMAN i WIELAND 1996, BARAŃSKA 1997, BENNETT 1997, GODA i SÜDHOF 1997).

Jednym z najlepiej zbadanych procesów, w którym są zaangażowane transport pęcherzykowy i fuzja błon biologicznych, jest wydzielanie przekazników nerwowych przez wyspecjalizowaną strukturę zwaną synapsą nerwową.

Proces ten stanowi podstawę porozumiewania się komórek w układzie nerwowym, a jego modulacja leży u podłoża zapamiętywania i uczenia się (SÜDHOF 1995). Dotarcie fali potencjału czynnościowego do błony zakończenia nerwowego wywołuje otwarcie specyficznych, zależnych od potencjału błonowego, kanałów wapniowych i wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie komórki nerwowej, którego wynikiem jest fuzja określonej liczby pęcherzyków synaptycznych, zawierających neuroprzekazniki, zakotwiczonych w aktywnym rejonie błony plazmatycznej. Istotnym etapem egzocytozy jest związanie Ca^{2+} z odpowiednim czujnikiem (receptorem?), prawdopodobnie białkiem, które uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzącą do fuzji błon (LITTLETON i BELLEN 1995, WOODMAN 1997). Dzięki zastosowaniu specyficznych toksyn (np. toksyny jadu kiełbasianego wydzielanej przez beztlenową bakterię *Clostridium botulinum*), wykazujących aktywność proteolityczną w stosunku do białek biorących udział w fuzji błon, okazało się, że neurosekrecja i sekrecja konstytutywna w innych komórkach, na przykład w fibroblastach, są procesami, których mechanizm jest bardzo podobny (BARK i WILSON 1994, BURGOYNE i MORGAN 1995).

W procesie neurosekrecji wyróżnia się następujące etapy (rys. 1): biogenezę pęcherzyków, kumulację w pęcherzykach specyficznych związków, transport pęcherzyków i ich kierowanie do właściwego przedziału docelowego oraz zakotwiczanie pęcherzyków i fuzję z błoną akceptorową (BURGOYNE i MORGAN 1995, MARTIN 1997). W neuronach występują dwa rodzaje pęcherzyków wydzielniczych: większe, wypełnione materiałem o dużej gęstości, transportujące aminy biogenne i hormony peptydowe, oraz mniejsze, zawierające przekazniki nerwowe (MARTIN 1997). Najkrócej trwa-



Rys. 1. Współzależność pomiędzy egzo- i endocytozą w wydzielaniu neuroprzekazników w synapsach.

Po zakotwiczeniu pęcherzyka na powierzchni błony plazmatycznej, w jej specjalnym rejonie zwanym rejonem aktywnym (A), następuje etap aktywacji pęcherzyka (B), który bezpośrednio poprzedza jego fuzję z błoną plazmatyczną (C). Ten ostatni etap wywołany jest przez napływ Ca^{2+} do zakończenia nerwowego. Pęcherzyki wydzielnicze są odzyskiwane w trakcie endocytozy (D).

jącą fazą procesu (<100 milisekund) jest egzocytoza pęcherzyków zakotwiczonych do błony i przygotowanych do fuzji. Wolniej, kilka sekund, trwa fuzja tych pęcherzyków, które są wprawdzie zakotwiczone, ale nie są jeszcze przygotowane do fuzji i wymagają aktywacji. Najdłużej trwa przemieszczanie się pęcherzyków w pobliże błony i ich aktywacja. Zatem w komórce występują w tym samym czasie różne pule pęcherzyków, będące na różnych etapach egzocytozy, a ich wzajemne przekształcenia są zależne od zmian stężenia Ca^{2+} (BURGOYNE i MORGAN 1995). Transport pęcherzykowy i fuzja błon wymagają współdziałania różnych białek, zarówno integralnych białek błony pęcherzyka wydzielniczego, jak i błony akceptorowej oraz białek rozpuszczalnych (WOODMAN 1997). W komórkach nicieni zidentyfikowano 30 takich białek, a w neuronach ssaków co najmniej 50. Należą do nich między innymi kinazy, syntaksyna, SNAP-25, synaptotagmina, synaptobrewina, Rab3A, CAPS. Niektóre z tych białek występują zarówno w komórkach kręgowców, jak i bezkręgowców, na przykład munc18-1, Rab3A, syntaksyna, SNAP-25, synaptobrewina, NSF, SNAP, rSec 6/rSec 8, RabGDI. Występowanie innych białek, jak synaptotagmina, CAPS, rabfilina, GAP43 i synaptofizyna, jest ograniczone do neuronów i komórek neurosekrecyjnych wyższych Eukaryota. Wydaje się, że białka te odpowiadają za specyficzną regulację egzocytozy, niespotyka-

ną w komórkach organizmów stojących niżej na drabinie ewolucyjnej. W regulowanej egzocytozie niezbędnym jest również ATP, działający na wielu jej etapach, na przykład podczas przemieszczania się pęcherzyków do błony, w którym biorą udział filamenty aktynowe i miozyna oraz zależna od Ca^{2+} kinaza lekkich łańcuchów miozyny (BURGOYNE i MORGAN 1995, BENNETT 1997, MARTIN 1997).

Odkrycia dotyczące natury sygnałów wapniowych, które regulują endo- i egzocytozę w synapsach i komórkach neurosekrecyjnych, przyniosły między innymi badania aktywnych rejonów błony z zastosowaniem techniki patch-clamp. Stwierdzono, że otwieranie zależnych od potencjału błonowego kanałów wapniowych, napływ Ca^{2+} do komórki, aktywacja maszynery egzocytarnej, wydzielenie zawartości pęcherzyków do szczeliny synaptycznej, dyfuzja przekaznika nerwowego i wiązanie z receptorami na błonie postsynaptycznej może trwać tylko 200 mikrosekund. Stąd pojawiło się przypuszczenie, że aby wymienione procesy mogły zajść w tak krótkim czasie, pęcherzyki wydzielnicze muszą być związane z błoną w pobliżu specyficznego kanału wapniowego (BENNETT 1997, WOODMAN 1997). Nie wszystkie typy kanałów wapniowych są zaangażowane w wydzielanie przekazników nerwowych i istnieją różnice w tym względzie pomiędzy różnymi typami neuronów. Egzocytoza w komórkach neurosekrecyjnych jest wolniejsza niż w neuronach i zachodzi z pewnym opóźnieniem, od 6 do 50 milisekund. Opóźnienie to wynika prawdopodobnie z czasu potrzebnego dla przemieszczenia się pęcherzyków wydzielniczych, a także dla utworzenia całej maszynery molekularnej zaangażowanej w proces fuzji błon (FERRO-NOVICK i JAHN 1994, BURGOYNE i MORGAN 1995). Dyfuzja Ca^{2+} w cytoplazmie zachodzi z prędkością 10–13 μm^2 na sekundę, stąd w neuronach, gdzie proces egzocytozy zachodzi bardzo szybko, Ca^{2+} dyfunduje na ograniczoną odległość, najwyżej 10 nm, i jego stężenie wzrasta lokalnie do ponad 100 μM . W komórkach neurosekrecyjnych egzocytoza ulega aktywacji przy niższych stężeniach Ca^{2+} , a kationy dyfundują na odległość 200 nm od błony plazmatycznej (BURGOYNE i MORGAN 1995, BENNETT 1997, GODA i SÜDHOF 1997, MARTIN 1997).

EGZOCYTOZA I ENDOCYTOZA ZALEŻNE OD JONÓW WAPNIA

W neuronach egzocytoza jest kontrolowana przez białka wiążące Ca^{2+} o niskim powi-

nowactwie do kationu. W komórkach neurosekrecyjnych w egzocytozie są zaangażowane

białka o wyższym powinowactwie do Ca^{2+} . Częstość zachodzenia fuzji pęcherzyków z błoną akceptorową może osiągać wartość 10 000 razy na sekundę. W neuronach egzocytoza wymaga co najmniej 20–50 μM stężeń Ca^{2+} i zachodzi z połową szybkości maksymalnej w stężeniu 190 μM , podczas gdy w komórkach neurosekrecyjnych stężenie Ca^{2+} aktywujące egzocytozę wynosi 0,3 μM , a egzocytoza zachodzi z połową szybkości maksymalnej w stężeniach Ca^{2+} 10–30 μM (BURGOYNE i MORGAN 1995, BENNETT 1997). Szybkość egzocytozy jest proporcjonalna do stężenia Ca^{2+} podniesionego do potęgi trzeciej lub czwartej, to znaczy, że istnieją 3–4 miejsca wiążące Ca^{2+} na co najmniej jednym lub kilku rodzajach białek regulatorowych (BURGOYNE i MORGAN 1995, SÖLLNER 1995, SÜDHOF 1995, SÖLLNER i ROTHMAN 1996). Zmiany stężenia Ca^{2+} wpływają również na przemieszczanie się pęcherzyków wydzielniczych do błony i ich aktywację. Obu procesom towarzyszy reorganizacja cytoszkieletu, co umożliwia wiązanie się pęcherzyków z błoną akceptorową i wzajemne oddziaływanie elementów maszyneryi molekularnej odpowiedzialnej za fuzję błon. W procesach przemieszczania się i aktywacji pęcherzyków wydzielniczych jest zaangażowane prawdopodobnie białko wiążące Ca^{2+} , które ulega maksymalnej aktywacji w 1 μM stężeniu Ca^{2+} (BURGOYNE i MORGAN 1995, BENNETT 1997, GODA i SÜDHOF 1997, MARTIN 1997).

Pęcherzyki synaptyczne po fuzji z błoną plazmatyczną i wydzieleniu zawartości mogą być użyte powtórnie. Ich recykliczacja zachodzi

na drodze endocytozy, w której jest zaangażowana klatryna i filamenty aktynowe (CREMONA i DE CAMILLI 1997). Pęcherzyki po odpąszczaniu od błony tracą opłaszczenie zbudowane z trimerów klatryny i mogą służyć jako pęcherzyki wydzielnicze lub przekształcić się w endosomy. Zarówno w neuronach, jak i w komórkach sekrecyjnych proces odzyskiwania pęcherzyków po egzocytozie jest bardzo szybki. W komórkach sekrecyjnych endocytoza jest aktywowana w wysokich stężeniach Ca^{2+} . Oprócz tego w komórkach tych istnieje także wolniejszy proces niezależny od Ca^{2+} (GRUENBERG i MAXFIELD 1995, CREMONA i DE CAMILLI 1997). W neuronach endocytoza jest hamowana przez Ca^{2+} . W komórkach tych istnieje system o wysokim powinowactwie do Ca^{2+} , który w 1 μM stężeniu kationu powoduje blokowanie endocytozy, szczególnie w wyniku długiego lub częstego pobudzenia komórki (PEVSNER i SCHELLER 1994, HANSON i współaut. 1997). Endocytoza w komórkach neurosekrecyjnych zachodzi bez udziału klatryny, podczas gdy w neuronach z zaangażowaniem klatryny i specyficznej GTPazy — dynaminy. Depolaryzacja błony komórki nerwowej prowadzi do defosforylacji dynaminy, katalizowanej przez kalcyneurynę, fosfatazę zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny, co powoduje spadek aktywności GTPazy. Przypuszcza się, że defosforylacja dynaminy może mieć wpływ na recykliczację pęcherzyków wydzielniczych i zależne od Ca^{2+} hamowanie endocytozy, co ma znaczenie w plastyczności synapsy (CREMONA i DE CAMILLI 1997, MARTIN 1997).

BIĄŁKA BIORĄCE UDZIAŁ W EGZOCYTOZIE

Białka uczestniczące w egzocytozie w neuronach, komórkach neurosekrecyjnych i innych dzielą się na trzy typy. Pierwszy stanowią białka regulacyjne, które nie są niezbędne w egzocytozie, co wykazano w badaniach z zastosowaniem zwierząt transgeniczných. Należą do nich Rab3A, munc18-1, synapsyna I, determinująca przekształcanie pęcherzyków w pęcherzyki wydzielnicze, i synaptotagmina. Drugi typ to białka, takie jak VAMP (synaptobrewina), syntaksyna i SNAP-25, które są konieczne w egzocytozie zachodzącej w neuronach i w komórkach neurosekrecyjnych. Trzeci typ to białka takie jak NSF i SNAP (rozpuszczalne białka wiążące NSF), również niezbędne w egzocytozie. Niektóre z wymienionych białek są receptorami białek SNAP, dlatego klasyfikuje się je jako SNARE (FERRO-NOVICK i JAHN 1994, SÖLLNER

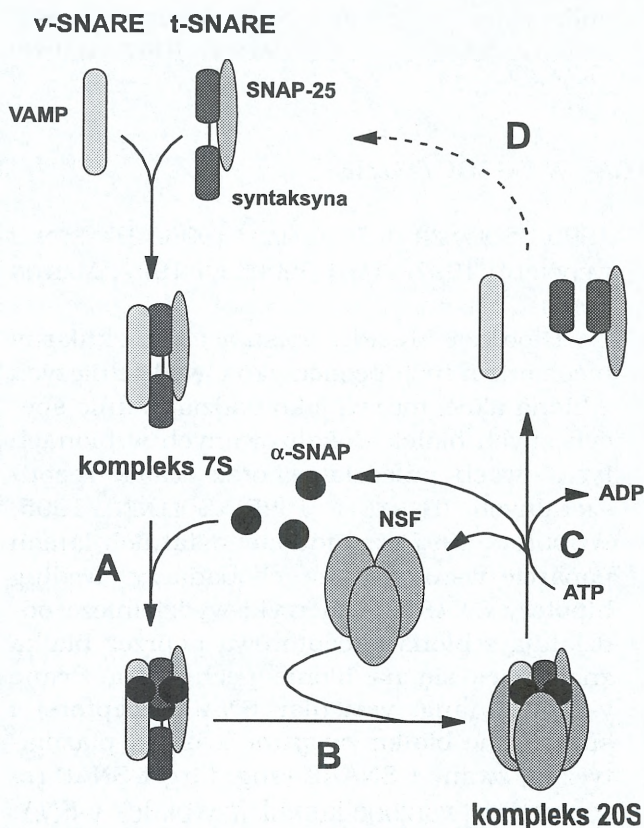
1995, SÖLLNER i ROTHMAN 1996, HANSON i współaut. 1997, HAY i SCHELLER 1997, MARTIN 1997).

Hipoteza SNARE, opisująca molekularny mechanizm fuzji pęcherzyków wydzielniczych z błoną akceptorową jako oddziaływanie specyficznych białek zlokalizowanych w błonach tych dwóch przedziałów oraz białek rozpuszczalnych (BENNETT 1995, SÖLLNER 1995, WOODMAN 1997), znajduje w ostatnich latach poparcie wśród niektórych badaczy. Według hipotezy SNARE pęcherzyki wydzielnicze oddziałują z błoną akceptorową poprzez białka znajdujące się na błonie pęcherzyka zwane v-SNARE (ang. vesicular SNAP receptors) i specyficzne białka związane z błoną plazmatyczną, zwane t-SNARE (ang. target SNAP receptors). Utworzone kompleksy białek v-SNA-

RE i t-SNARE stanowią miejsca wiązania dla innych białek cytosolowych, biorących udział w fuzji błon. Białka VAMP (ang. vesicle-associated membrane proteins), inaczej zwane synaptobrewinami, należą do klasy v-SNARE. Poznano ich trzy izoformy: VAMP-1, VAMP-2 i cellubrewinę. Są to białka integralne błony o m.c. 13 kDa, które są w dużej części ekspozowane na cytoplazmatyczną stronę błony pęcherzyka (WOODMAN 1997). Zgodnie z hipotezą SNARE proces transportu pęcherzykowego dzieli się na trzy etapy: wiązanie (zakotwiczenie) pęcherzyków z błoną akceptorową, ich aktywację i fuzję z błoną plazmatyczną. Po zakotwiczeniu pęcherzyka w aktywnym rejonie błony, jest on aktywowany przez ATP, dzięki czemu jest on w stanie wydzielić swoją zawartość w odpowiedzi na wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Zakotwiczenie pęcherzyka jest związane z powstawaniem kompleksu o stałej sedymentacji 7S, w którego skład wchodzi VAMP (v-SNARE) i dwa białka t-SNARE, SNAP-25 (ang. synaptosomes-associated protein) i syntaksyna (rys. 2). Aktywacja kompleksu jest inicjowana przez związanie białek rozpuszczalnych: białka NSF (ang. N-etylmaleimide-sensitive factor), wykazującego aktywność ATPazy i białek SNAP (ang. soluble NSF attachment proteins). VAMP wiąże się do heterodimeru SNAP-25-syntaksyna, tworząc kompleks o stałej sedymentacji 20S, który jest receptorem SNAP oraz wiąże inne białka,

na przykład występujące powszechnie kompleksyny. NSF katalizuje hydrolizę ATP, dzięki czemu dochodzi do energizacji pęcherzyka wydzielniczego, który jest w ten sposób przygotowany do fuzji w odpowiedzi na wzrost stężenia Ca^{2+} (HAY i SCHELLER 1997, WOODMAN 1997).

NSF jest bardzo ważnym białkiem, które bierze również udział w transporcie pęcherzykowym pomiędzy błonami endoplazmatycznego retikulum i aparatu Golgiego oraz w fuzji endosomów i w transcytozie w hepatocytach (WHITEHEART i KUBALEK 1995, WOODMAN 1997). To hydrofilowe białko o m.c. 76 kDa tworzy homooligomery stabilizowane przez nukleotydy adeninowe. Odnacza się niską aktywnością ATPazy i samo nie może oddziaływać z błoną. Białka α -, β -, γ - SNAP o m.c. 35, 36 i 39 kDa, są to rozpuszczalne białka amfipatyczne, ale zdolne do wiązania się *in vitro* ze złożami hydrofobowymi. Każdy monomer ma 3–4 domeny, dzięki którym SNAP mogą oddziaływać z innymi białkami, NSF-SNARE, szczególnie w obecności ATP. W wyniku hydrolizy ATP następuje rozpad kompleksu. Syntaksyny I i II, o m.c. 35 kDa, są białkami integralnymi błony, zlokalizowanymi przede wszystkim na presynaptycznej błonie synapsy. Należą do t-SNARE, mają też domeny oddziałujące z innymi białkami i tworzące połączenia wewnątrzcząsteczkowe. Białko SNAP-25, o m.c. 25 kDa, nie przechodzi przez błonę i oddziału-



Rys. 2. Oddziaływania pomiędzy białkami SNARE oraz białkami rozpuszczalnymi NSF i α -SNAP, w procesie fuzji błon biologicznych.

Kompleks białek 7S wiąże rozpuszczalne białka α -SNAP ze stechiometrią 1:3 mol/mol (A). Do kompleksu przyłącza się trimer NSF i tworzy się kompleks 20S (B). Katalizowana przez białko NSF hydroliza ATP prowadzi do rozpadu kompleksu 20S i zmiany konformacyjnej w białkach SNARE (C). Zgodnie z hipotezą SNARE ta zmiana konformacyjna jest bezpośrednio związana z fuzją błon. Po odzyskaniu pęcherzyka wydzielniczego w trakcie endocytozy cykl może rozpocząć się na nowo (D).

je z innymi białkami i fosfolipidami (WHITEHEART i KUBALEK 1995, HAY i SCHELLER 1997, WOODMAN 1997).

Do białek oddziałujących ze SNARE należą także synaptofizyna, białko pęcherzyka synaptycznego z czterema transbłonowymi domenami, które może tworzyć kanał w błonie, co sugeruje, że synaptofizyna prawdopodobnie bierze udział w tworzeniu pora fuzyjnego. Oddziałuje z synaptobrewiną II i wiąże się z podjednostką protonowej pompy wakuolarnej (WOODMAN 1997). Ze SNARE oddziałuje również białko munc18-1 (n-Sec1 lub Rb-Sec1), hydrofilowe białko, częściowo związane z błoną. Wiąże się także z syntaksyną. Przypuszcza się, że białko to hamuje fuzję błon i powstawanie kompleksu SNARE, być może za pośrednictwem białkowej kinazy C (WOODMAN 1997).

Białka SNARE oddziałują również z kanałami wapniowymi zależnymi od potencjału błonowego (typu P/Q) w kompleksie z synaptotagminą/neureksyną (tj. receptorem neuroto-

ksyn). Syntaksyna oddziałuje z kanałami wapniowymi typu N i typu P/Q, hamując ich aktywność. Za pośrednictwem syntaksyny z kanałami wapniowymi oddziałują też białka VAMP i SNAP-25 (BURGOYNE i MORGAN 1995, BENNETT 1997, GODA i SÜDHOF 1997, MARTIN 1997).

Synaptotagmina, białko o m.cz. 65 kDa, jest glikoproteiną występującą w pęcherzykach synaptycznych. Ma dwie domeny ekspozowane na cytoplazmatyczną stronę błony, dzięki którym synaptotagmina wiąże kooperatywnie Ca^{2+} w sposób zależny od fosfolipidów. Znanych jest wiele izoform tego białka o różnym powinowactwie do wapnia. Synaptotagmina I jest niezbędna w zależnym od Ca^{2+} procesie wydzielania neuroprzekaźników (PEVSNER i SCHELLER 1994, LITTLETON i BELLEN 1995). Być może bierze udział w fuzji błon oraz wiąże się z syntaksyną, α -SNAP i innymi białkami SNARE w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} (BENNETT 1997, WOODMAN 1997).

MECHANIZM ZAKOTWICZANIA PĘCHERZYKÓW I ICH FUZJI Z BŁONĄ AKCEPTOROWĄ

Molekularny mechanizm egzocytozy nie jest do końca poznany. Istnieje kilka modeli opisujących to zjawisko; żaden z nich nie tłumaczy wszystkich obserwacji doświadczalnych (HANSON i współaut. 1997, HAY i SCHELLER 1997). Według niektórych badaczy NSF i α -SNAP oddziałują z synaptobrewiną, syntaksyną i SNAP-25 (białka SNARE) i tworzą kompleks charakteryzujący się stałą sedymentacji 20S. Białka SNARE mogą tworzyć kompleks również z synaptotagminą. α -SNAP wiąże się ze SNARE w tym samym miejscu co synaptotagmina. W dalszej kolejności związaniu ulega NSF, który katalizuje hydrolizę ATP, co stanowi siłę napędową fuzji. Ku zaskoczeniu badaczy żadne z opisanych oddziaływań pomiędzy białkami nie zależało od stężenia Ca^{2+} (BENNETT 1997). Model ten jest jednak krytykowany, ponieważ:

a) wydzielanie neuroprzekaźników zachodzi zbyt szybko, żeby mogły zajść wszystkie oddziaływania,

b) zaobserwowano, że NSF jest zasocjowany z pęcherzykami wydzielniczymi niezależnie od innych białek,

c) po usunięciu fragmentu synaptobrewiny przez neurotoksyny wiązanie pęcherzyków z błoną presynaptyczną zachodzi bez przeszkód,

d) w komórkach neurosekrecyjnych egzocytoza może zachodzić w nieobecności Mg-ATP, co by świadczyło, że hydroliza nukleotydu nie jest ko-

nieczna (HANSON i współaut. 1997, WOODMAN 1997).

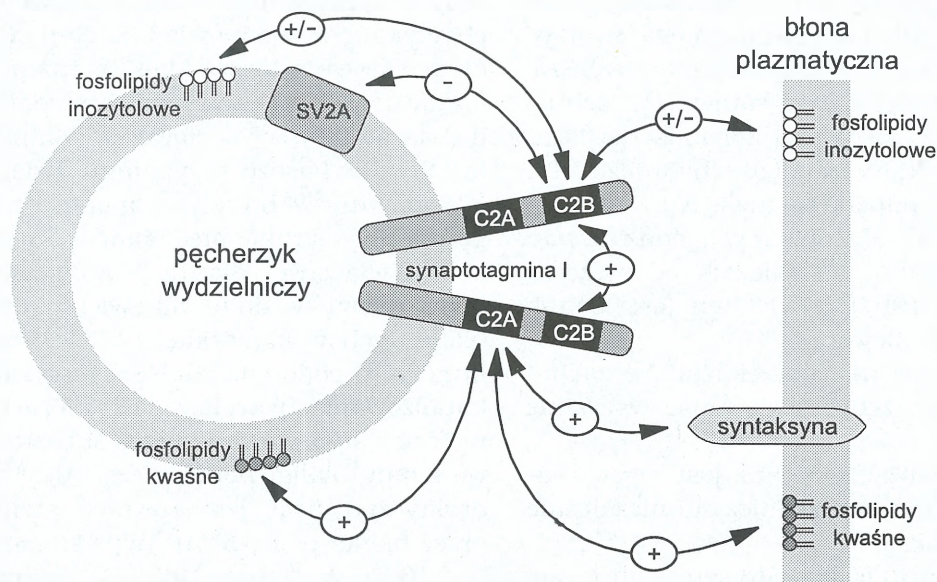
W innym modelu, NSF hydrolizuje ATP i w ten sposób przygotowuje synaptotagminę do zakotwiczania pęcherzyków przed stymulacją egzocytozy. NSF i α -SNAP wiążą się z pęcherzykiem wydzielniczym przez syntaksynę lub białko SNAP-25 na błonie plazmatycznej, żeby przygotować miejsce zakotwiczenia pęcherzyka, co by odpowiadało etapowi aktywacji pęcherzyków przez Mg-ATP tuż przed fuzją (BENNETT 1997). Zauważono, że zdolność NSF do wiązania i rozdysocjowania kompleksu białek SNARE bardzo przypomina działanie białek opiekuńczych (ang. chaperones), które regulują przybieranie przez nowo syntetyzowane białka właściwej dla nich konformacji oraz biorą udział w składaniu wielu kompleksów białkowych w komórkach. Wiele białek opiekuńczych, podobnie jak NSF, jest zdolnych do katalizowania hydrolizy ATP, która to aktywność jest stymulowana przez substraty białkowe i inne białka pomocnicze. Aktywność hydrolityczna NSF jest również stymulowana przez białka α - i γ -SNAP (WHITEHEART i KUBALEK 1995, WOODMAN 1997). W jeszcze innym modelu zakłada się, że NSF nie jest białkiem fuzyjnym, tylko białkiem opiekuńczym, przygotowującym inne białka maszynierii molekularnej zaangażowanej w procesie fuzji (BENNETT 1997, WOODMAN 1997).

RECEPTOR Ca^{2+} W EGZOCYTOZIE

Egzocytoza jest regulowana przez zmiany stężenia Ca^{2+} , powstaje więc pytanie, które z białek jest receptorem w tym procesie? Przed fuzją pęcherzyków wydzielniczych z błoną akceptorową, Ca^{2+} odgrywa rolę w przemieszczaniu się i aktywacji pęcherzyków, a każdy z tych procesów charakteryzuje się inną wrażliwością na wapń. W synapsach w przemieszczaniu się pęcherzyków istotną rolę odgrywają synapsyny, a receptorem Ca^{2+} jest kalmodulina, która aktywuje kinazę białkową II zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny. Kinaza ta fosforyluje synapsyny powodując ich oddysocjowanie od pęcherzyka. Nie zidentyfikowano dotąd białka o wysokim powinowactwie dla Ca^{2+} , które bierze udział w procesie aktywacji pęcherzyków. Być może istnieje regulacyjny składnik cytoszkieletu lub białko zależne od Ca^{2+} , współdziałające z NSF (BENNETT 1997). W neuronach końcowy etap egzocytozy, czyli fuzja, jest regulowany przez białko o niskim powinowactwie do Ca^{2+} , aktywowane w wysokich stężeniach Ca^{2+} . W komórkach neurosekrecyjnych egzocytoza wymaga białek wiążących Ca^{2+} o dużo wyższym powinowactwie do kationu i zachodzi w niższych jego stężeniach. A zatem w obu typach komórek muszą istnieć różne białka, choć być może należące do tej samej rodziny.

Głównym kandydatem do roli receptora o niskim powinowactwie do Ca^{2+} jest wspomniane

wcześniej białko synaptotagmina (LITTLETON i BELLEN 1995, BENNETT 1997). Wiąże ona 4 mole Ca^{2+} na mol białka i ulega wysyceniu w $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} (rys. 3). Sugerowano, że białko to hamuje fuzję do momentu aż zwiąże Ca^{2+} . Cytoplazmatyczna domena synaptotagminy I zawiera dwie domeny C2A i C2B o sekwencji homologicznej do regulacyjnej domeny C2 białkowej kinazy C. Dane doświadczalne wskazują, że obie domeny są odpowiedzialne za oddziaływanie z innymi białkami i cząsteczkami fosfolipidów w sposób zależny od Ca^{2+} . Domena C2A odpowiada za wiązanie z kwaśnymi fosfolipidami i syntaksyną, zaś domena C2B za dimeryzację synaptotagminy, oddziaływanie z cząsteczkami fosfolipidów fosfatydyloinozytowych oraz dysocjację białka SV2 od białka pęcherzyków synaptycznych (BENNETT 1997). Izoformy synaptotagminy są obecne zarówno w synapsach, jak i w granulach wydzielniczych komórek neurosekrecyjnych, gdzie są zaangażowane w egzocytozę (GODA i SÜDHOF 1997, WOODMAN 1997). Białka te występują w formie związanej z kanałami wapniowymi typu N, być może regulując napływ Ca^{2+} do komórki przez te kanały. Synaptotagminom przypisuje się również pełnienie ważnej funkcji w endocytozie, ponieważ mogą oddziaływać z białkiem AP2 (ang. clathrin assembly protein complex 2) wpływającym na tworzenie opłaszczenia klatrynowego pęcherzyków (LITTLETON i



Rys. 3. Udział jonów wapnia w regulacji oddziaływania synaptotagminy I z fosfolipidami i białkami w trakcie egzocytozy.

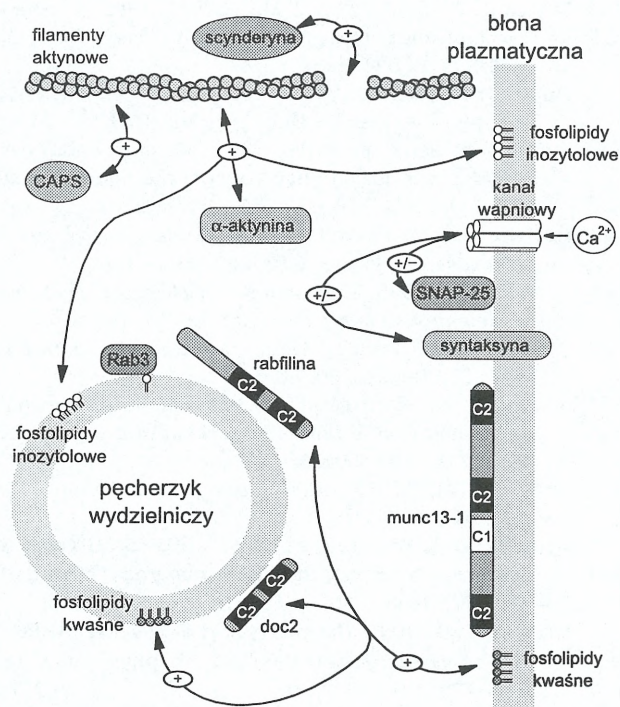
Oddziaływania, które są aktywowane przez Ca^{2+} oznaczono (+), hamowane (-), a oddziaływania mieszane (+/-). Należy zaznaczyć, że synaptotagmina I oddziałuje dodatkowo z wieloma białkami, takimi jak AP2, β -SNAP, SNAP-25 i neureksyna oraz fosfolipidami w sposób niezależny od stężenia Ca^{2+} .

BELLEN 1995, BENNETT 1997). Przypuszcza się, że także inne białka, zawierające powtarzające się domeny C2 mogą odgrywać rolę receptorów Ca^{2+} w egzocytozie. Należą do nich białka pęcherzyków synaptycznych, takie jak rabfilina i doc2, które wiążą fosfolipidy w sposób zależny od Ca^{2+} oraz munc13-1 (rys. 4) (BENNETT 1997).

W komórkach PC12 wykryto białka PEP 1, PEP 2, PEP 3 (ang. phosphatidylinositol transfer proteins). Izoforma kinazy fosfatydyloinozytolo(4)fosforanu (PEP 1) katalizuje reakcję powstawania fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu (PIP_2), który jest niezbędny w fuzji błon zależnej od Ca^{2+} . Rozpad tego związku powoduje zahamowanie fuzji. PIP_2 odgrywa rolę w kierowaniu pęcherzyków na drogę fuzji, jest akceptorem białek łączących pęcherzyki z błoną akceptorową oraz prawdopodobnie aktywuje pewne enzymy w błonie pęcherzyków wydzielniczych, niezbędne w fuzji. PIP_2 nie jest fosfolipidem fuzjogennym, ale wiąże synaptotagminę I, co stanowi sygnał do zajścia fuzji, a także oddziałuje z cytoszkieletem (BENNETT 1997, MARTIN 1997). Dwa białka, składniki cytoszkieletu, α -aktynina i β -adducyna, które oddziałują z rabfiliną i regulują organizację filamentów aktynowych, również przypuszczalnie pełnią rolę w egzocytozie regulowanej przez Ca^{2+} . Białko CAPS (ang. calcium-dependent protein for secretion), o m.c. 145 kDa, może brać udział w oddziaływaniach pomiędzy błonami i jest prawdopodobnie białkiem wiążącym PIP_2 i Ca^{2+} . Związanie Ca^{2+} zmienia powi-

nowactwo CAPS w stosunku do fosfolipidów, a także reguluje jego oddziaływanie z tropomiozyną i filamentami aktynowymi. Podobną rolę przypisuje się również scynderynie, białku które w sposób zależny od Ca^{2+} reguluje proces organizacji filamentów aktynowych (MARTIN 1997).

Inną grupą białek, które podejrzewa się o pełnienie roli receptora Ca^{2+} w egzocytozie są aneksyny, białka wiążące wapń i fosfolipidy (BURGOYNE i CLAGUE 1994, BANDOROWICZ-PIKUŁA 1996, GERKE i MOSS 1997). Od momentu stwierdzenia, że aneksyna VII agreguje granule chromafinowe w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} przedstawicielom tej grupy białek przypisuje się udział w transporcie pęcherzykowym i fuzji błon (GERKE i MOSS 1997), na przykład aneksynie I w zależnym od glukozy wydzielaniu insuliny z komórek β wysepek Langerhansa trzustki, co pozostaje również w zgodzie z fuzjogenną aktywnością tego białka w neutrofilach. Aneksyna II stymuluje egzocytozę w komórkach chromafinowych. Jej powinowactwo do Ca^{2+} znajduje się w tym zakresie stężeń kationu, jakie jest wymagane do fuzji w komórkach sekrecyjnych, ale jest zdecydowanie inne niż to, które jest potrzebne do fuzji pęcherzyków wydzielniczych w neuronach. Stąd przypuszcza się, że aneksyna II być może bierze udział w egzocytozie większych pęcherzyków wydzielniczych, zawierających aminy biogenne lub hormony peptydowe, a nie pęcherzyków transportujących przekazywanie nerwowe (BURGOYNE i CLAGUE 1994, BURGOYNE i MORGAN



Rys. 4. Białka biorące udział w egzocytozie, inne niż synaptotagmina I, których funkcja jest regulowana przez jony wapnia.

Oddziaływania, które są aktywowane przez Ca^{2+} oznaczono (+), zaś oddziaływania mieszane (+/-). Niektóre białka oddziałują ze sobą w sposób niezależny od Ca^{2+} , na przykład Rab3A i rabfilina, SNAP-25, syntaksyna i munc13-1 oraz rabfilina i α -aktynina. Jednak w oddziaływaniach tych są zaangażowane prawdopodobnie białka wiążące Ca^{2+} .

1995). Zaś aneksyna XIIIb w komórkach MDCK odgrywa prawdopodobnie rolę w endocytozie, która nie zależy od białek NSF, SNAP i SNARE (GERKE i MOSS 1997).

Sugeruje się również, że receptorem Ca^{2+} w procesie fuzji może być SNAP-25. Synaptobrevina i SNAP-25 są chronione przed neurotoksynami w czasie procesu aktywacji pęcherzyków, zachodzącego w komórkach sekretoryjnych, zależnego od ATP, a Ca^{2+} częściowo znosi hamowanie wydzielania przekazywników ner-

wowych przez neurotoksyny. Stąd wyciągnięto wniosek, że SNAP-25 jest białkiem, które kontroluje powinowactwo hipotetycznego białka fuzjogennego w stosunku do Ca^{2+} (WOODMAN 1997). Jest bardzo prawdopodobne, że badania w najbliższych latach zaowocują odkryciem wielu innych białek, biorących udział w formowaniu pora fuzyjnego, a także pozwolą rozstrzygnąć, co się dzieje z lipidami podczas fuzji i jakie zmiany zachodzą w ich cząsteczkach w trakcie formowania pora fuzyjnego.

CALCIUM-REGULATED MEMBRANE FUSION

Summary

In this review the process of calcium-regulated exocytosis in neurones, neuroendocrine and other cell types is briefly characterized. The proteins involved in the membrane fusion machinery are listed and possible interac-

tions between them are described, including the SNARE hypothesis. Moreover, the problem which of these proteins plays a role as a calcium receptor in exocytosis is discussed.

LITERATURA

- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., 1996. Rola aneksyn, białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidy w komórce — od fuzji błon biologicznych do przekazywania informacji. *Post. Biol. Kom.* 23, 151–167.
- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., PIKUŁA S., 1997a. Wewnątrzkomórkowe białka wiążące ATP. *Post. Biochem.* 43, 111–119.
- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., PIKUŁA S., 1997b. Zaburzenia homeostazy miedzi są przyczyną wielu groźnych chorób człowieka. *Post. Biochem.* 43, 281–287.
- BARANSKA J., 1997. Wapń jako pierwotny i wtórny przekazywnik informacji. Udział Ca^{2+} w cyklu komórkowym, sekrecji i adhezji. *Kosmos* 46, 33–44.
- BARK I. C., WILSON M. C., 1994. Regulated vesicular fusion in neurons: snapping together the details. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4621–4624.
- BENNETT M. K., 1995. SNAREs and specificity of transport vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 581–586.
- BENNETT M. K. 1997. Ca^{2+} and the regulation of neurotransmitter secretion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 316–322.
- BURGOYNE R. D., CLAGUE M. J., 1994. Annexin in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19, 231–232.
- BURGOYNE R. D., MORGAN A., 1995. Ca^{2+} and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18, 191–196.
- CREMONA O., DE CAMILLI P., 1997. Synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 323–330.
- DENESVIRE C., MALHOTRA V., 1996. Membrane fusion in organelle biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 519–523.
- FERRO-NOVICK S., JAHN R., 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191–193.
- GERKE V., MOSS S. E., 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 129–154.
- GODA Y., SÜDHOF T. C., 1997. Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable? *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 513–518.
- GRUENBERG J., MAXFIELD F. R., 1995. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 552–563.
- HANSON P. I., HEUSER J. E., JAHN R., 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310–315.
- HARTER C., WIELAND F., 1996. The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 75–93.
- HAY J. C., SCHELLER R. H., 1997. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 505–512.
- HUGHSON F. M., 1995. Molecular mechanism of protein-mediated membrane fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 507–513.
- LITTLETON J. T., BELLEN H. J., 1995. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca^{2+} -dependent manner. *Trends Neurosci.* 18, 177–183.
- MARTIN T. F. J., 1997. Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol.* 7, 271–276.
- MONCK J. R., FERNANDEZ J. M., 1996. The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 524–533.
- PARNAS H., PARNAS I., 1994. Neurotransmitter release at fast synapses. *J. Membr. Biol.* 142, 267–279.
- PEVSNER J., SCHELLER R. H., 1994. Mechanisms of vesicle docking and fusion: insights from the nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 555–560.
- ROTHMAN J. E., WIELAND F. T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227–234.
- SÜDHOF T. C., 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interaction. *Nature* 375, 645–653.
- SÖLLNER T. H., 1995. SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett.* 369, 80–83.
- SÖLLNER T. H., ROTHMAN J. E., 1996. Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. *Experientia* 52, 1021–1025.
- WHITE J. M., 1992. Membrane fusion. *Science* 258, 917–924.
- WHITEHEART S. W., KUBALEK E. W., 1995. SNAPs and NSF: general members of the fusion apparatus. *Trends Cell Biol.* 5, 64–68.
- WOODMAN P. G., 1997. The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 155–172.