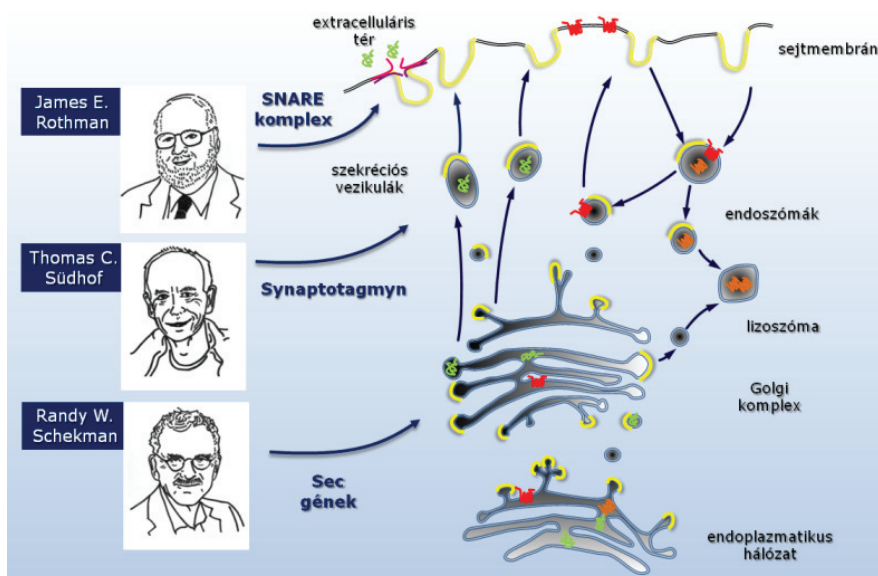


VEZIKULÁRIS TRANSZPORT A KEZDETEKTŐL A 2013-AS NOBEL-DÍJIG¹

Fári Karolina, Homolya László

MTA TTK, Molekuláris Farmakológiai Intézet,
Molekuláris Sejtbiológiai Laboratórium

A sejten belüli transzportfolyamatok molekuláris mechanizmusának megértésére irányuló kutatások majd 50 évvel ezelőttre vezethetők vissza, és manapság is kitüntetett érdeklődésre tartanak számot. Ezen a területen az első áttörést George E. Palad munkássága hozta (orvosi-élettani Nobel-díjban részesült 1974-ben), aki kimutatta, hogy a sejtben a szekretált fehérjék transzportvezikulák segítségével jutnak az endoplazmás hálózattól (ER) a Golgin keresztül a sejt felszínre [1]. Ez a felismerés, illetve a molekuláris biológiai, biokémiai kutatások forradalma hozta magával azt a szemléletmódot és eszköztárat, ami további felfedezésekhez vezetett, és aminek köszönhetjük mai ismereteinket a sejten belüli vezikuláris transzportról. A téma kiemelkedő jelentőségét bizonyítja az is, hogy az orvosi-élettani Nobel-díjat idén a vezikuláris transzport területén folytatott kutatómunkáért és meghatározó felfedezéseiért kapta megosztva három kutató: Thomas C. Südhof, Randy W. Schekman és James E. Rothman. Vajon miért olyan fontos ezeknek a folyamatok megértése? Miként látjuk ma, és milyen út vezetett a megismerésükhöz? Írásunkban ezekre a kérdésekre próbálunk meg választ adni, külön hangsúlyt fektetve a 2013-as orvosi-élettani Nobel-díjban részesült kutatók életművére, mellyel megalapozták és formálták a vezikuláris transzport területén folyó kutatásokat.



1. ábra. A sejten belüli transzport molekuláris mechanizmusának felderítése; a 2013-as orvosi-élettani Nobel-díjasok (portré grafika: Homolya Máté).

¹ A 2013-as kémiai Nobel-díjat megosztva Martin Karplus, Michael Levitt és Arieh Warshel kapta az összetett kémiai folyamatok számítógépes modellezésében végzett úttörő munkájáért. A témáról a Biokémia 2014. márciusi számában Fuxreiter Mónika, mint a szakterület egyik jeles hazai képviselője írását olvashatjuk (a szerkesztőbizottság megjegyzése).

Transzportfolyamatok a sejten belül

Az eukarióta sejtek jellemző tulajdonsága, hogy membránnal határolt tér-
részekre, sejtorganellumokra tagozódnak. A kompartmentalizált felépítésnek
köszönhetően a sejten belüli biokémiai folyamatok térben és időben egymástól
elkülönülten folyhatnak. A különböző térrészek között a kapcsolatot, az anyag-
és információáramlást sok esetben kisméretű, membránnal körülvett speciális
„tárolók”, transzportvezikulák teremtik meg. A donor kompartment membrán-
jából lefűződve a vezikulák diffúzóval vagy a sejtváz (mikrutubulus vagy aktin-
hálózat) felhasználásával jutnak el a célkompartmenthez, ahol a target-membránnal
fuzionálva juttatják el szállítmányukat a megfelelő helyre [2]. Az egyes
vezikulák útja a sejten belül eltérő lehet, mind a transzport irányát, mind a don-
or-, illetve akceptor kompartmentet tekintve. Anterográd transzportnak neve-
zük a sejtmag felől az endoplazmatikus hálózaton, Golgi komplexen keresztül
az extracelluláris tér irányába történő transzportot. Ilyen irányban mozognak
például a szekréciós vezikulák. A visszafelé, a sejtmag irányába történő tran-
szportot pedig retrográdnak nevezzük. Például az endoszómák haladnak ilyen
irányban. Az alapvető molekuláris mechanizmusok, melyek ezeket a transzport-
folyamatokat szabályozzák, sok esetben megegyeznek. A vezikula kialakulását
(budding), és hogy mit szállít (cargo selection) az ún. coat vagy más néven bu-
rokfehérjék határozzák meg. A target-membrán kiválasztásáért, illetve a vezi-
kula vele történő fúziójáért pedig a megfelelő SNARE fehérjék, a SNARE kom-
plex kialakulása felelős [3].

A sejtekben zajló vezikuláris transzportfolyamatokról mára kialakult képünkhöz
azonban egy hosszú, több évtizedes út vezetett, aminek minden egyes állomását
kivételes kutatók munkája fémjelzi.

A kezdetektől a 2013-as Nobel-díjig

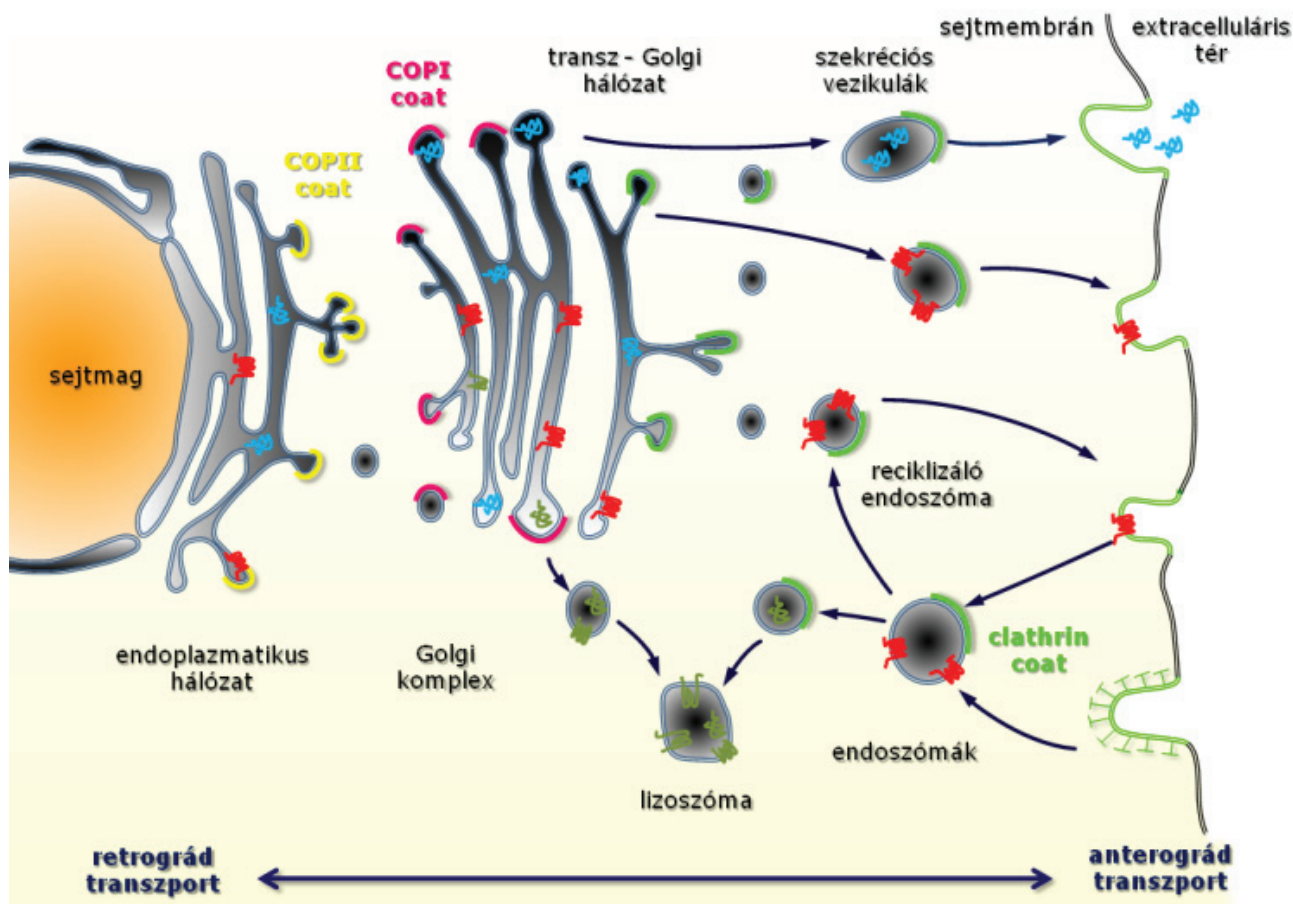
A három, idén orvosi-élettani Nobel-díjjal kitüntetett kutató mindegyike külön-
külön nagy előrelépést hozott a sejten belüli transzportfolyamatok molekuláris
mechanizmusának felderítésében. A folyamat egészét elemi biokémiai reakciók
sorozataként vizsgálták és más-más kísérleti rendszerek használatával, gene-
tikai és biokémiai modellek felállításával, egymástól függetlenül jutottak el a
vezikuláris transzport alapvető mechanizmusának megismeréséhez.

A trafficking mutáns sec élesztők, Schekman munkássága

Randy Wayne Schekman hőmérséklet szenzitív *Saccharomyces cerevisiae* mu-
tánsokat vizsgált. Huszonhárom olyan különböző komplementációs csoportot ta-
lált, melyek mindegyike a sejten belüli transzport egy-egy lépésében volt hibás.
A vezikulák szekréciója ezekben a mutánsokban valamelyik stádiumban gátolva
volt, ami a vezikulák sejten belüli felhalmozódásában nyilvánult meg. Az egyes
mutáns fenotípusokat Schekman a szekréciós útvonal egy-egy állomásával azo-
nosította (sec mutánsok) [4].

A sec mutánsok genetikai vizsgálatai elvezettek a vezikuláris transzportban
résztvevő fehérjékhez és fehérjekomplexekhez, többek között kis GTPázok, ki-
horgonyzó fehérjék és nem utolsósorban a Coat protein complex II felfedezé-
séhez (COPII), mely a vezikulák kialakulásában és a cargo szelekcióban játszik
szerepet.

Később világossá vált az is, hogy a vezikuláris transzport, melyet ő *Saccharomyces*-en vizsgált, magasabbrendű élőlényekben is hasonlóképpen szerveződik, az egyes sec gének termékei megfeleltethetőek az emlős sejtekben a másik két Nobel-díjas kutató, Rothman, illetve Südhof által vizsgált folyamatok szereplőivel.



2. ábra. A sejtben belüli transzportfolyamatok áttekintése. Az ábrán a burokfehérje komplexeket zölddel (clathrin), rózsaszínnel (COPI), illetve sárgával (COPII) jelöltük. A membránfehérjéket, a szekretált és a lebontásra kerülő proteineket a piros, kék, illetve olíva színek különböztetik meg.

Sejtbiológia cell-free rendszerekkel, Rothman munkássága

James Edward Rothman az 1970-es évek végén kezdett el foglalkozni a sejtben belüli transzportfolyamatok kérdésével. Legelsőként arra kereste a választ, hogy hogyan jutnak el a transzportvezikulák az egyik sejtorganelumtól a másikig. Elegendő-e a kiindulási és a target kompartment fizikai közelsége, vagy más, bonyolultabb mechanizmus szükséges ahhoz, hogy a fehérjéket szállító vezikulák a megfelelő helyen legyenek a megfelelő időben.

Ennek a problémának a megválaszolásához egy olyan *in vitro* rendszert alkalmazott [5], mely segítségével specifikusan tudta mérni az egyes kompartmentek közötti transzportot. Ezen kísérleti rendszert alkalmazva, képes volt az egyes Golgi ciszternák közti fehérje transzport vizsgálatára is, és eredményeiből arra, az akkor megdöbbentő következtetésre jutott, hogy nem a fizikai közelség, ha-

nem biokémiai tulajdonságaik alapján fuzionálnak a megfelelő target-membránnal a vezikulák [6, 7]. Ebben az áttörő jelentőségű kísérletben két különböző sejtől származó Golgi homogenátumot keverték össze, melyekben a Vesicular Stomatitis Virus (VSV) által termelt G-protein transzportját vizsgálták. Az első homogenátumot (donor) olyan, VSV vírus által fertőzött sejtekből izolálták, melyekben egy mutáció miatt a G-protein glikolizációját végző N-acetylglucosamyltransferáz (GlcNAc) transzferáz enzim nem volt jelen. A másik, akceptor homogenátum a GlcNAc transzferázot tartalmazó, de VSV vírussal nem fertőzött, így G-proteint nem kifejező sejtekből származott. Mivel az összekeverést követően a G-proteinen kimutatható volt a radioaktívan jelölt GlcNAc, ez bizonyította azt, hogy a donor homogenátumból származó vezikula képes volt fuzionálni az akceptor homogenátummal [7].

A vezikulák kialakulása, specifikációja

Ezeknek a kutatásoknak egy alapvető kérdése volt az is, hogy hogyan alakulnak ki a kiindulási membránból a vezikulák, és vajon honnan tudják, hogy mit kell szállítaniuk? Mind a vezikulák kialakulásának, mind a szállítandó fehérje kiválasztásának folyamatában meghatározó szerepet játszanak a coat fehérjék. Ezek a fehérjék megfelelő kis GTPázok segítségével gyűlnek a citoszolból a csupasz donor membránfelületre, majd összeszerelődve egy burokkal körülvett vezikulát hoznak létre, amely aztán a donor membránról lefűződve indul el a célállomása felé. A coat fehérjék ezen felül a vezikula szállítmányának kiválasztásában is szerepet játszanak, mégpedig annak a citoszolikus doménjén való felismerésével. Természetesen mind a transzport irányától, mind a donor és az akceptor kompartmenttől függően más-más coat fehérjék vesznek részt a vezikula kialakításában, és más-más szelektív markereket ismernek fel, attól függően, hogy mit kell szállítaniuk [3].

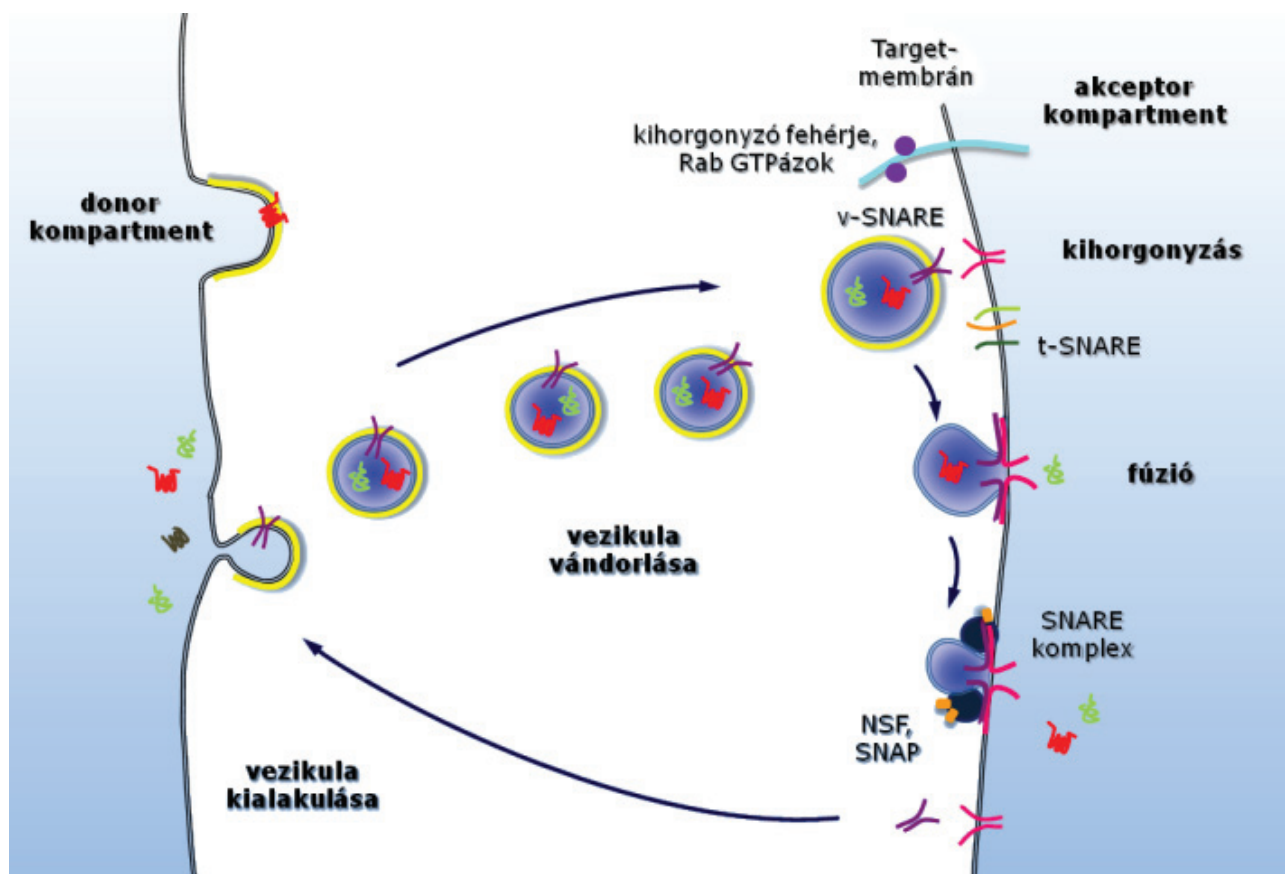
Az először megismert vezikula coat komplex a clathrin volt [8], amiről ma már tudjuk, hogy funkciója a transz-Golgi hálózathoz (TGN), az endoszómákhoz és a plazmamembránhoz kötődik. Később azonosítottak a vezikulákon további, nem clathrin típusú burokfehérje-komplexeket is. Rothman nevéhez fűződik a COPI (coat protein complex I), Schekman nevéhez pedig a ma COPII (coat protein complex II) néven ismert burokfehérje-komplex felfedezése. Ezek a clathrin burokkal ellentétben a szekréciós útvonal korai szakaszában, főként a Golgin belüli, illetve az ER és a Golgi közötti transzportban vesznek részt.

Membránfúzió, a SNARE hipotézis

A vezikuláris transzportfolyamat utolsó lépéseként a vezikulák az akceptor kompartmenthez érkeznek, ott fuzionálnak a target-membránnal, így juttatva el a célállomásra szállítmányukat. Felmerül viszont az a kérdés, hogy hogyan ismerik fel a vezikulák a célt, és milyen mechanizmus szükséges a target-membránnal való fúziójukhoz?

Rothman és kutatócsoportja alkotta meg az ún. SNARE hipotézist, mely választ ad erre a kérdésre. A hipotézis szerint, minden egyes vezikula rendelkezik saját SNARE fehérjével (v-SNARE), ahogyan a target-membrán is (t-SNARE). A vezikulák specifikálásához, vagyis hogy milyen kompartmenthez kötődnek, szüksé-

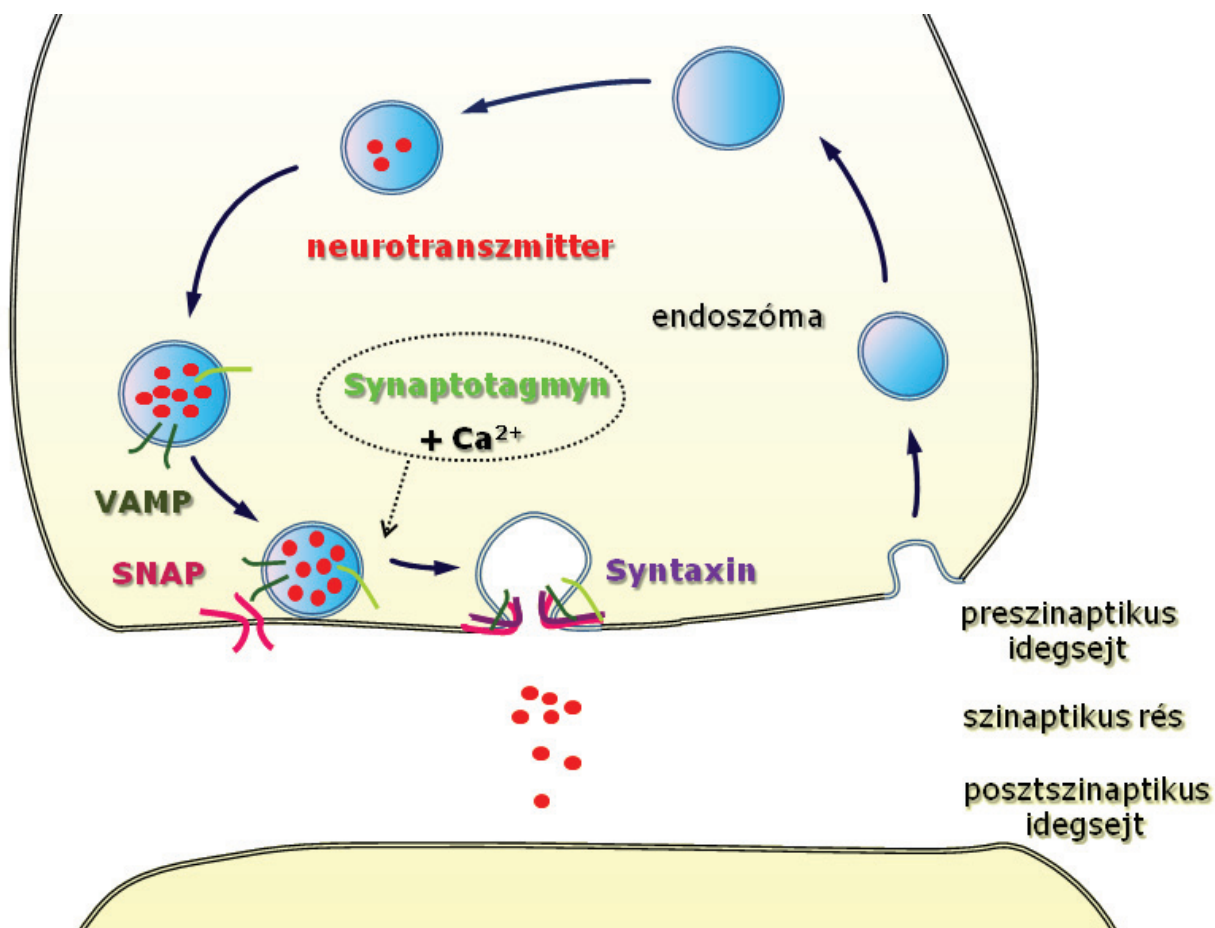
ges, hogy a transzport vezikulán jelenlévő fehérje, a v-SNARE felismerje a target-membránon jelen lévő megfelelő párját, a t-SNARE proteint [9, 10]. A két, egymáshoz kapcsolódó SNARE fehérje közösen egy termodinamikailag stabil ún. SNAREpin struktúrát alakít ki (az elnevezés virális hairpin-nel való analógiára utal, ami a vírus sejtbe való bejutását szolgálja) [11]. A vezikulák membránfúziójában részt vesz további két fehérje is. Egyikük, egy citoszolikus fehérje, az N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF), melynek neve arra utal, hogy képes helyreállítani az N-ethylmaleimide által gátolt transzportot [12], a másikuk, a soluble NSF attachment protein (SNAP) az NSF membránhoz való kötődéséért felelős. NSF hiányában a vezikulák membránfúziója nem történik meg [13]. Az NSF és SNAP funkciója azonban a membránfúzióban csak közvetett, feladatuk a megfelelő v- és t-SNARE stabil komplexének felbontása, melyhez energiát ATP hidrolízisével nyer a rendszer. Ez a lépés teszi lehetővé a SNARE fehérjék reciklizációját, amely feltétlenül szükséges a vezikuláris transzport folyamatosságának fenntartásához.



3. ábra. A vezikulák fúziója a target membránnal, a SNARE komplex. A donor kompartmentből lefűződő vezikula (a sárga szín a coat komplexet jelöli) az akceptor kompartmenthez vándorol, ahol kihorgonyzó fehérjék és Rab GTPáz fehérjék (türkíz és lila) segítségével a membránhoz kötődik, majd kialakul a membrán fúzióért felelős SNARE komplex. A komplex kialakulásában v-SNARE (lila), t-SNARE (magenta), NSF (sötétkék) és SNAP (narancssárga) fehérjék vesznek részt.

Vezikuláris transzport az idegsejtekben, Südhof munkássága

Thomas Christian Südhof a vezikuláris transzportfolyamatok egy speciális esetét, a preszinaptikus idegsejtekből a neurotranszmitterek felszabadulásának molekuláris mechanizmusát tanulmányozta. Az idegsejtekben a neurotranszmittereket szállító vezikulák membránfúziója, így a neurotranszmitterek szinaptikus részbe való ürülése Ca^{2+} -függő folyamat. Südhof a Ca^{2+} -szabályozta exocitózist tanulmányozva rátalált a synaptotagminokra, melyek - kalcium megkötő képességük révén - szenzorként működnek a neurotranszmisszió folyamatában [14]. A Ca^{2+} -jelet a synaptotagminok fordítják le az idegsejtek számára oly módon, hogy ezek a fehérjék kalcium-kötött formában a vezikulákat a preszinaptikus idegsejt membránjához rögzítik, előidézve a neurotranszmitterek szinaptikus részbe történő ürülését. A vezikulák preszinaptikus membránfúziójához azonban szükség van még a VAMP-2 fehérjére is, mely a neurotranszmittereket szállító vezikulákban a v-SNARE funkciót látja el, illetve a SNAP-25 és syntaxin 1A fehérjékre, melyek a preszinaptikus membránban t-SNARE-analógokként a VAMP-2-vel közösen alakítják ki a membránfúzióhoz szükséges SNARE komplexet [15].



4. ábra. A synaptotagminok szerepe a preszinaptikus idegsejtekből történő neurotranszmitter felszabadulásban.

A sejt felszíni membránfehérjék és a vezikuláris transzport

Idén a Nobel Bizottság az orvosi-élettani Nobel-díj odaítélésével ismerte el az említett három kutató meghatározó jelentőségű sejtbiológiai felfedezéseit. A szekréciónak az útját és azt szabályozó mechanizmusok alapvető fontossága

megmutatkozik abban, hogy a sejtekben termelt és azokból kiürülő, szekretált molekulák a legkülönbözőbb élettani folyamatokban meghatározó szerepet játszanak. A számos példa közül említhetjük az emésztést, a véralvadást, az immunrendszer működését, vagy a korábban részletezett idegi jelátvitelt. Az idei Nobel-díjjal elismert felfedezések még szélesebb összefüggéseire mutat rá az, hogy a szekretált anyagokon túl a sejtfelszínen megjelenő membránfehérjék (pl. receptorok, transzporterek) sejten belüli vándorlásában is hasonló szabályozó mechanizmusok érvényesülnek. Ezen fehérjék többségének célállomása a sejtfelszín, de találunk arra is példát, hogy a sejtfelszínt csak ideiglenesen megjárva más sejt-organellumban érnek célba, és látják el ott feladatukat. A membrán-fehérjék sejtfelszínre jutását korábban kevésbé szabályozott, konstitutív folyamatnak gondolták. Mára már árnyaltabbá vált az elképzelésünk a sejt-felszíni membránfehérjék vándorlásáról, mely folyamatban az endo-lizoszóma rendszernek meghatározó szerepe van (lásd 2. ábra). Ez a szintén vezikulákból felépülő, burokfehérjéket alkalmazó, vezikula-lefűződést és membránfúziót felhasználó összetett, dinamikus rendszer a membránfehérjék anterográd és retrográd transzportjában egyaránt részt vesz. A receptorok és transzporterek sejten belüli mozgásáról, az endo-lizoszóma rendszer működéséről szintén egyre több, fi-gyelemre méltó felfedezés lát napvilágot, azonban ezeknek a folyamatoknak sok lépését, szabályozó mechanizmusait még nem értjük teljes mértékben.

Az MTA Lendület program támogatásával 2012-ben megalakult kutató-csoportunkban, az MTA TTK Molekuláris Farmakológiai Intézetében működő Molekuláris Sejtbiológia Laboratóriumban e széles kutatási terület egy kis szegmensét vizsgáljuk. Kutatásainkban a membránfehérjék egy speciális csoportját, az élettani szempontból nagy jelentőséggel bíró ABC transzportereket tanulmányozzuk polarizált, azaz aszimmetrikus sejtekben. Ezen fehérjék sejtfelszíni mennyiségét sok esetben az határozza meg, hogy a sejten belül elhelyezkedő, vezikulákból álló rezervoár milyen iramban engedi a plazmamembrán felé az adott fehérjét (vagy mennyire tartja vissza), illetve hogy milyen sebesen szedődik be a sejtfelszínről a transzporter az endoszómák segítségével. Munkánk során azokat a szabályozó mechanizmusokat próbáljuk feltárni, amelyek ezeket a folyamatokat meghatározzák, remélve azt, hogy ezek a speciális vizsgálatok általánosabb érvényű összefüggésekre is vezetnek. Eredményeinkről a közelmúltban beszámoltunk a BIOKÉMIA újságban [16].

Irodalomjegyzék:

- [1] Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189(4206): 867.
- [2] Cai, H., Reinisch, K., Ferro-Novick, S. (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12(5): 671-82.
- [3] Bonifacino, J.S., Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2): 153-66.
- [4] Novick, P., Field, C., Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory path-

way. Cell, 21(1): 205-15.

[5] Balch, W.E., Glick, B.S., Rothman, J.E. (1984) Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system. Cell, 39(3 Pt 2): 525-36.

[6] Fries, E., Rothman, J.E. (1980) Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(7): 3870-4.

[7] Balch, W.E., et al. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. Cell, 39(2 Pt 1): 405-16.

[8] Pearse, B.M. (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. J Mol Biol, 97(1): 93-8.

[9] Sollner, T., et al. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature, 362(6418): 318-24.

[10] McNew, J.A., et al. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. Nature, 407(6801): 153-9.

[11] Weber, T., et al. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. Cell, 92(6): 759-72.

[12] Block, M.R., et al. (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc Natl Acad Sci US A, 85(21): 7852-6.

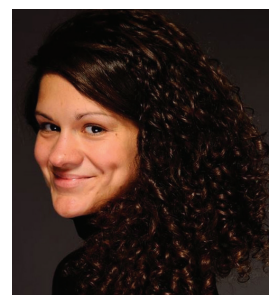
[13] Malhotra, V., et al. (1988) Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. Cell, 54(2): 221-7.

[14] Perin, M.S., et al. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. Nature, 345(6272): 260-3.

[15] Igarashi, M., Watanabe, M. (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. Neurosci Res, 58(3): 226-33.

[16] Homolya, L. (2013) ABC transzporterek úton-útfélen. Biokémia, XXXVII(1): 17-28.

Fári Karolina 1984-ban született Budapesten. Egyetemi tanulmányait a Szegedi Tudományegyetem és a Gdanski Egyetem (Uniwersytet Gdanski, Gdansk, Lengyelország) biológus szakán végezte. 2009-ben szerzett diplomát molekuláris biológia szakirányon mindkét egyetemen. 2009-től 2013-ig a Szegedi Tudományegyetem Genetikai Tanszékén PhD, majd doktorjelölt ösztöndíjasként folytatott kutatómunkát. 2013 szeptemberében csatlakozott az MTA TTK Molekuláris Farmakológiai Intézetében működő, Homolya László által irányított Lendület Kutatócsoporthoz.



Homolya László a Budapesti Műszaki Egyetemen szerzett biológusmérnöki diplomát 1992-ben. Kutatásait az Országos Hematológiai Intézetben (később OGYK, majd OVSZ) az MTA Membránbiológiai Kutatócsoport keretében folytatta. 1995-98 között vendégkutatóként dolgozott az USA-beli Cisztikus Fibrózis Központban (Chapel Hill, NC). 2000-ben szerzett kandidátusi fokozatot, majd 2012-ben nyerte el az MTA doktora címet. 2010/11-ben tanulmányokat folytatott az USA-beli National Institutes of Health (Bethesda, MD) Sejtbiológiai és Metabolizmus programjának keretében. Jelenleg az MTA TTK Molekuláris Farmakológia Intézetében az MTA Lendület Programjának támogatásával végzi kutatásait.

