

# Celični promet mešičkov

## Nobelova nagrada za fiziologijo ali medicino za leto 2013

Nina Vardjan in Robert Zorec



Slika 1: Nobelovi nagrajenci za fiziologijo ali medicino za leto 2013. Od leve proti desni: Randy W. Schekman, James E. Rothman in Thomas C. Südhof.

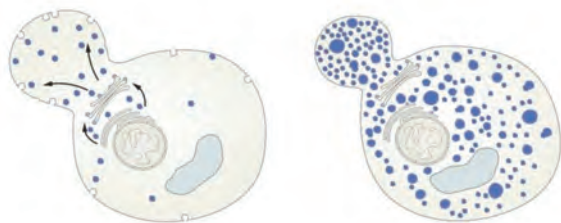
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2013/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/).

Prvi ponedeljek v mesecu oktobru podeli Nobelova skupščina na ustanovi Karolinska na Švedskem Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino. V letu 2013 so bili prejemniki nagrade Randy W. Schekman, James E. Rothman in Thomas C. Südhof, in sicer za »svoja odkritja mehanizma uravnavanja prometa mešičkov, glavnega transportnega sistema v naših celicah« ([www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2013/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/)). Ti trije raziskovalci so odkrili molekulska načela, kako se mešički z določeno vsebino v pravem času dostavijo na pravo mesto v celici. V tem prispevku je cilj osvetliti mejnike dosežkov letošnjih Nobelovih nagrajencev za fiziologijo v okviru nastanka evkariontskih celic kakor tudi v luči raziskav nacionalnega programa *Celična fiziologija*.

Evkariontske celice, ki sestavljajo naše telo, so drugačne od bakterij. Poleg tega, da so veliko večje od bakterij, vsebujejo pod plazmalemo, membrano, ki jih obdaja, tudi celične organele, obdane z membrano, na primer mitohondrije, endoplazemski retikulum in mešičke. Zakaj so nastali ti evkarionti, ki poleg drugih celičnih organelov vsebujejo

tudi pravo jedro, je še zmeraj uganka. Ker je velikost celic evkariontov za tri do štiri velikostne razrede večja od tiste pri prokariotih, so nekateri mnenja, da so celični organeli nastali kot endosimbionti. Bakteriji podobna oblika živega bitja je prešla v notranjost predhodnice naših celic in tam prevzela neko novo vlogo, takšno, kot jo ima današnji mitohondrij ali pa pri rastlinah kloroplast. Do tega je verjetno prišlo, ker se je z velikostjo celic povečala razdalja za sporazumevanje (komunikacijo) med posameznimi deli celice, ki je temelj usklajenega delovanja celičnih procesov.

Sporazumevanje v notranjosti celice – v citoplazmi – je določeno z več mehanizmi. Na razmeroma kratkih razdaljah je najbolj učinkovita difuzija. To je proces, kjer se snovi prenesejo z mesta višje na mesto nižje koncentracije, pri tem pa se znižuje vrednost koncentracije snovi, ki se prenaša. Gibalna sila pri tem ni nekaj usmerjenega, pač pa naključni trki med molekulami, kakor je naravo difuzije pojasnil Albert Einstein leta 1905. Ta mehanizem je učinkovit v razmeroma majhnih prostorninah, ko pa je prišlo do povečanja evkariontske celice, se



Slika 2: Levo normalna kvasovka, desno mutirana kvasovka, v kateri je moten celični transport mešičkov (prirejeno po: Zierath, J. R., in Lendahl, U., 2013: *Machinery Regulating Vesicle Traffic, A Major Transport System in our Cells*. Karolinska Institutet, Nobel Assembly »The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013«

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2013/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/).

je morala privzeti nova rešitev. Ta pa temelji na mehanizmu konvekcije, kjer se snovi prenesejo med deli celice zaradi gibanja mase neke snovi. Primer takega načina sporazumevanja je pretakanje krvi, v kateri so krvne celice, te pa vsebujejo hemoglobin, ki prenaša kisik od pljuč do drugih delov telesa tako, da se krvne celice pretakajo s krvjo. V sami celici pa tak transport predstavlja premikanje oziroma promet celičnih organelov.

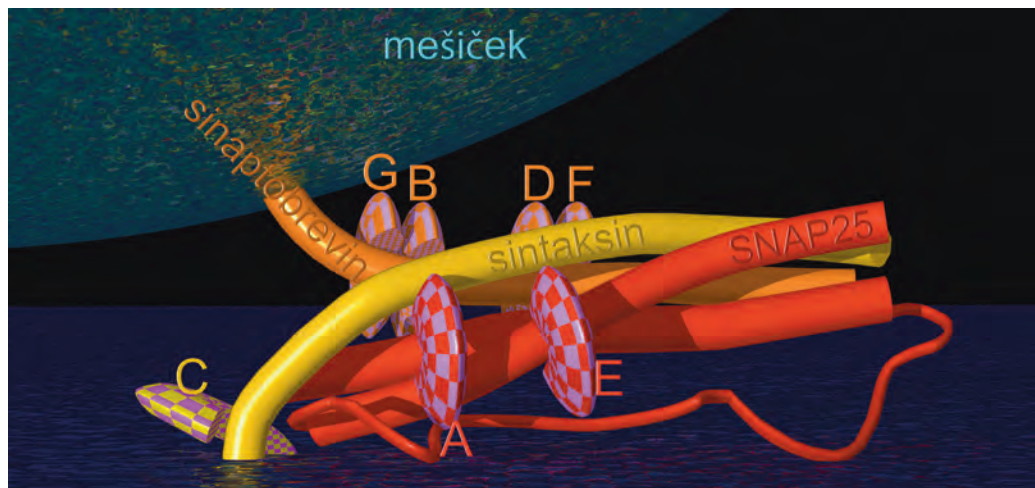
### Presevanje mutiranih kvasovk je razkrilo motnje v celičnem prometu organelov

Prav promet celičnih organelov je pritegnil pozornost znanstvenikov. Da bi spoznal genetsko podlago celičnega transportnega sistema, je Randy Schekman v sedemdesetih letih začel poskuse na celicah kvasa (*Saccharomyces cerevisiae*), ki so model evkariontske celice. Pri genetskem presejevanju je njegov laboratorij opisal kvasovke z genetskimi okvarami v celičnem transportu. Mešički so se namreč v genetsko mutiranih kvasovkah kopičili v nekaterih delih celice (slika 2). Opisal je 23 genov in jih razvrstil v tri skupine genov, ki imajo zapise za proteine, ki nadzorujejo različne vidike prometa celičnih organelov. S tem je omogočil nov vpogled v mehanizme uravnavanja transporta organelov v celici.

### Odkritje proteinskih kompleksov za sidranje membrane mešička na plazmalemo

Tudi James Rothman se je pred tremi desetletji navdušil nad raziskavami celičnega transportnega sistema. V osemdesetih in devetdesetih letih je z biokemijskimi po-

skusi *in vitro* na sesalskih celicah raziskoval mehanizme brstenja, transporta in zlivanja mešičkov s tarčno membrano. Njegov laboratorij je odkril proteinski kompleks, ki omogoča mešičkom, da se sidrajo na določeno mesto plazmaleme, kjer lahko pride do zlitja membrane mešička s plazmalemo. Pokazalo se je, da geni, ki jih je odkril že Randy Schekman, kodirajo prav te proteine. Ti proteini lahko pospešijo proces zlitja membran. So namreč na membrani mešička kot tudi na plazmalemi. Prek posebnih domen se lahko med seboj tesno povežejo, kakor da so deli zadržge, in s tem približajo dve membrani, kar vpliva na zlitje membran. Ta kompleks je danes znan pod imenom SNARE (angleško Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor). Rothmanov laboratorij je tudi ugotovil, da v celici obstaja več tipov sorodnih proteinov SNARE, ki se med seboj povezujejo na zelo specifične načine, kar določa, da se mešički, ki tvorijo določeno vsebino, prenesejo na točno določeno mesto znotraj celice. Mešički in druge znotrajcelične membranske strukture se lahko zlivajo tudi med seboj znotraj celice. Na kompleks proteinov SNARE delujejo botulinusni in tetanusni nevrotoksini, o katerih je v *Proteusu* pisal Marko Kreft leta 2002 (Kreft, 2002). Slika 3 prikazuje prostorsko umestitev proteinov kompleksa SNARE (sinaptobrevin, SNAP25 in sintaksin) med membrano mešička in notranjim licem plazmaleme. Pokončni diski kažejo mesta, kjer delujejo različni nevrotoksini. K razumevanju mehanizma delovanja teh toksinov je zaslužen tu-



Slika 3: Proteini kompleksa SNARE in mesta delovanja botulinusnih nevrotoksinov A, B, D, F, G, in tetanospazmina.

Povzeto po: Kreft, M., 2002: Proteus.

di laboratorij profesorja Cesarja Montecucca iz Padove (Schiavo in sod., 1992). Njegovo odkritje je pospešilo raziskave prometa mešičkov v nevronih in nenavadno je, da ga je Nobelova komisija spregledala, še posebej, ker ti toksini delujejo predvsem na nevrone.

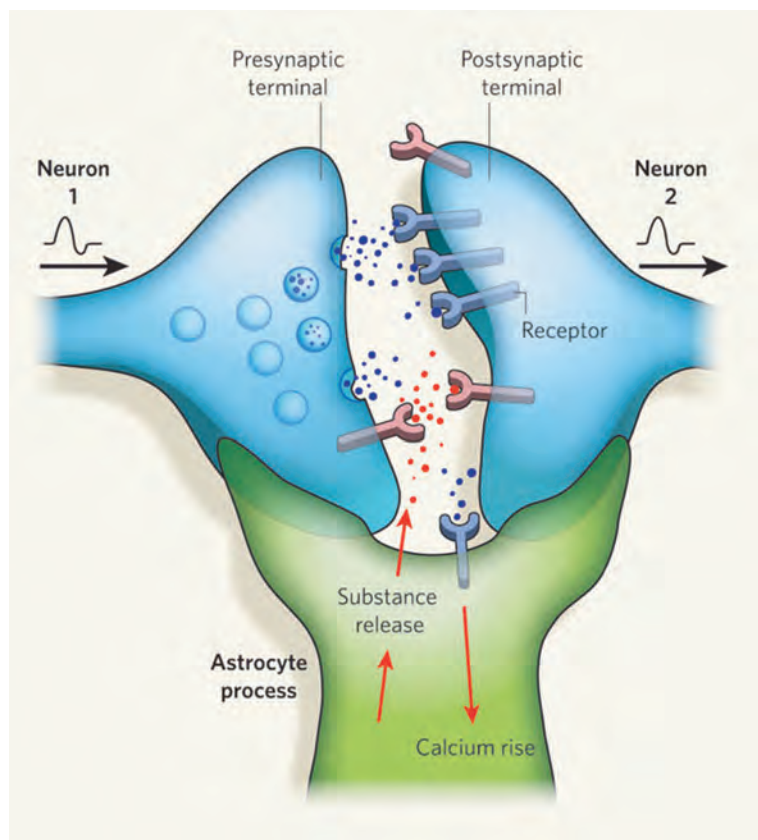
### V nevronih je mehanizem za hitro odzivanje mešičkov, ki skladiščijo živčne prenašalce, na porast $\text{Ca}^{2+}$ v citoplazmi

Promet mešičkov v nevronu je pritegnil zanimanje Thomasa Südhofa. Predvsem zato, ker se v živčevju prek kemične sinapse (stik med dvema nevronoma) prenaša informacija z minimalno zakasnitvijo. V tem procesu se iz presinaptičnega končiča izločijo živčni prenašalci (nevrottransmiterji), ki so skladiščeni v mešičkih in z difuzijo preidejo do postsinaptične celice, kjer se vzdraženje nadaljuje po sosednjem nevronu. Pri izločanju živčnih prenašalcev sodelujejo molekule, ki so jih odkrili v laboratorijih R. Schekmana in J. Rothmana. Ni pa bilo znano, katere molekule v presinaptičnem končiču zaznajo zvišanje citosolne aktivnosti ionov  $\text{Ca}^{2+}$ , dražljaja, ki sproži komunikacijo med dvema živčnima celicama prek kemične sinapse. Thomas Südhof je torej iskal proteine, ki v odvisnosti od  $\text{Ca}^{2+}$  uravnavajo izločanje

živčnih prenašalcev iz mešičkov. Poleg kompleksina je odkril protein sinaptotagmin, ki je na mešičkih in veže  $\text{Ca}^{2+}$ . Ob vezavi  $\text{Ca}^{2+}$  na sinaptotagmin se verjetno spremeni konformacija proteinov SNARE v zadrugi in kompleksin se sprostí iz kompleksa SNARE. To pa naj bi omogočilo (neposrednega dokaza še nimamo), da se membrana mešičkov, ki so prek kompleksa SNARE sidrani na plazmalemi, zlije s plazmalemo. Nastane fuzijska pora, ozek kanal, skozi katerega se izločijo molekule živčnih prenašalcev v zunajcelični prostor. Te raziskave so pokazale sklopljenost procesov uravnane eksocitoze v času in prostoru in kako se vsebina mešičkov sprosti na dražljaj.

### V primerjavi z nevroni je uravnavana eksocitoza v astrocitih zelo počasen proces

Kako je delo v naših laboratorijih povezano z razumevanjem celičnega prometa mešičkov? Poleg nevronov imamo v možganih še kar nekaj drugih celičnih tipov. Mednje sodijo astrociti, najštevilnejše celice nevroglije. V nekaterih predelih možganov je astrocitov celo več kot nevronov. A več kot sto let je veljalo, da so te celice glije le pasivna podpora nevronom. V zadnjih dveh desetletjih



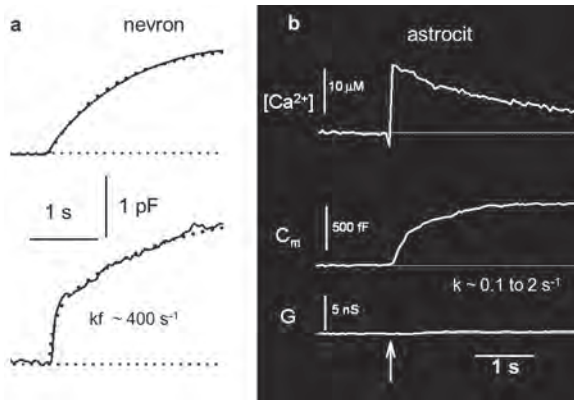
Slika 4: Tripartitna sinapsa.

Povzeto iz: Allen, N. J., in Barres, B. A., 2009: *Neuroscience: Glia — more than just brain glue.* Nature, 457: 675-677.

Astrocyte process – odstavek astrocita; Neuron – nevron; Substance release – izločanje substanc; Calcium rise – porast aktivnosti  $Ca^{2+}$  v citoplazmi; Presynaptic terminal – presinaptični končič; Postsynaptic terminal – postsinaptični končič.

tjih se je ta tako imenovani neurocentrični pogled na delovanje možganov nekoliko spremenil. Rezultati poskusov so pokazali, da astrociti dejavno sodelujejo pri prenašanju signalov v možganih. Pri tem tako kot nevroni uporabljajo mešičke za sporazumevanje med celicami. Ti mešički vsebujejo kemične prenašalce – glijotransmiterje. Na dražljaj, povečano citosolno aktivnost  $Ca^{2+}$ , se astrociti odzovejo tudi tako, da vsebina mešičkov izstopi v zunajcelični prostor v bližino kemične sinapse. S tem astrociti vpliva na prenos informacije prek sinapse nevronov. Astrociti predstavljajo tretjo enoto sinapse, ki ji pravimo tripartitna sinapsa (slika 4). V našem laboratoriju smo primerjali odzivnost procesa uravnavane eksocitoze v nevronih in v astrocitih. V uravnavani eksocitozi pride do zlitja membrane mešička s plazmalemo, zato se površina plazmaleme poveča. Slika

5 prikazuje dinamiko povečanja membranske kapacitete – parametra, ki je sorazmeren površini plazmaleme – v nevronu in v astrocitu. Poskusi kažejo, da je v nevronu povečanje površine plazmaleme, ki jo sprožimo s fotolitičnim razpadom molekul, ki imajo vključen  $Ca^{2+}$ , več kot velikostni razred hitrejši kot v astrocitih (Kreft in sod., 2004). Elektrofiziološko metodo za te meritve (Rituper in sod., 2013) smo razvili v Sloveniji neodvisno od drugih laboratorijev po svetu. Počasnost uravnavane eksocitoze v astrocitih kaže, da te celice sodelujejo pri počasnem signaliziranju v možganih. Zakaj pa je uravnavana eksocitoza v astrocitih tako zelo počasna, še ni znano. Eden od procesov, ki k temu prispeva, je promet mešičkov v astrocitih do mesta zlitja s tarčno membrano.



Slika 5: Dinamika porasta membranske kapacitete v nevronu in v astrocitu. Porast površine plazmaleme (membranske kapacitete) v nevronu (a), ki jo sprožimo s fotolitičnim razpadom molekul, ki imajo vkljenjen  $\text{Ca}^{2+}$ , je več kot velikostni razred hitrejša kot v astrociti (b).

Privejeno po: Kreft in sod., 2003, J. Neurophysiol., Kreft in sod., 2004, Glia.



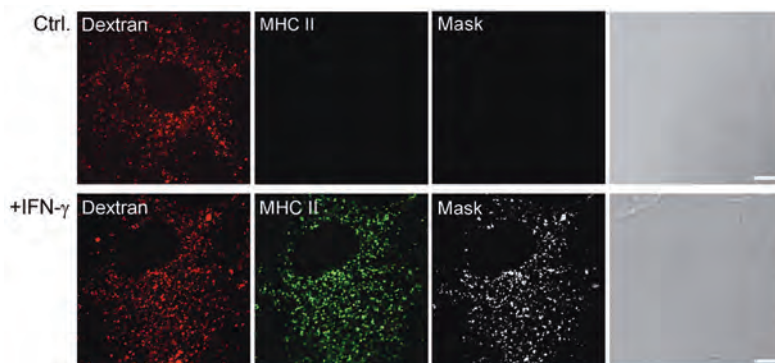
Slika 6: Trajektorije poti, ki so jih opravili posamezni mešički v 30 sekundah. S številka 2 in 3 sta označena mešička, ki imata usmerjeno mobilnost. Mešička z oznakama 1 in 4 pa sta primera neusmerjene mobilnosti.

Privejeno po: Potokar in sod., 2005, BBRC.

### Urnnavanje mobilnosti mešičkov v astrocitih v normalnih in bolezenskih stanjih

Prva opazovanja fluorescenčno označenih mešičkov pod mikroskopom so razkrila, da so ti zelo mobilni (Stenovec in sod., 2007, Potokar in sod., 2007). Da bi opredelili lastnosti njihovega transporta, je bilo treba najprej razviti metodologijo za spremljanje premikajočih se delov mikroskopske slike. Slika 6 kaže točkasto fluorescenco, ki predstavlja fluorescenčno označene peptidne mešičke v astrocitih. Za spremljanje položaja teh struktur v času se na vsako piko

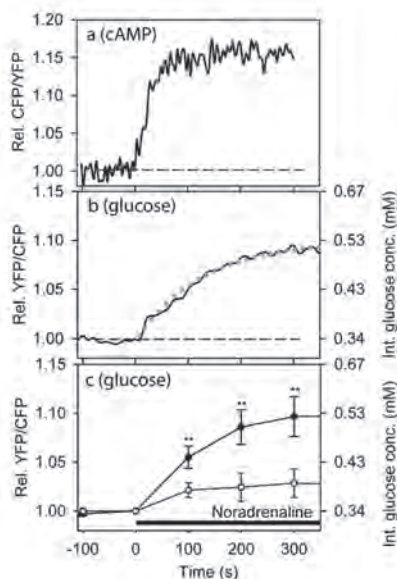
prilagodi dvodimenzionalno Gaussovo krivuljo, katere vrh določa koordinate  $x$  in  $y$  v ravnini in v času. Na sliki 6 so vidne trajektorije – potovanja – mešičkov v času 30 sekund. Nekateri mešički opravijo v času opazovanja razmeroma velik odklop od mesta začetka opazovanja (mešička 2 in 3), to so tako imenovani mešički z usmerjeno mobilnostjo. Drugi mešički pa se zadržujejo v bližini izhodišča opazovanja (mešička z oznako 1 in 4) – mobilnost mešičkov je torej neusmerjena. Usmerjeno mobilnost zrcali potovanje mešičkov vzdolž citoskeletnih vlaken (Potokar in sod., 2007). Če astrocyte spodbujamo, da se v njih poveča citosolna aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$ , se nekaterim mešičkom (vsebujejo glijotransmitter glutamat) poveča mobilnost in več takšnih mešičkov kaže usmerjeno mobilnost (Stenovec in sod., 2007). Nekaterim mešičkom (vsebujejo peptide in ATP) pa se mobilnost po spodbujanju močno zmanjša (Potokar in sod.,



Slika 7: Astroцити postanejo antigen predstavitevne celice v patoloških procesih, v prisotnosti citokina IFN- $\gamma$  izražajo proteine skupine MHC II (merilo: 10 mikrometrov; pripravljeno po: Vardjan in sod., 2012, J. Neuroinflamm.).

2007). V patoloških razmerah se v astroцитih zgodijo spremembe in med drugim začnejo čezmerno izražati posebno obliko citoskeleta – intermedijarne filamente. Zaradi teh se tudi mobilnost mešičkov močno spremeni, kar določi spremenjeno odzivnost astroцитov na bolezensko spremenjeno okolje. Slika 7 prikazuje mešičke, ki so v astroцитih le, če se v okoliškem možganskem tkivu pojavi citokin interferon- $\gamma$ . Ta pa se pojavi pri vnetjih v možganih. Astroцитi v takšnih razmerah začnejo izražati molekule MHC II (angleško Major Histocompatibility Complex class II molecules), ki so potrebne za anti-

gen, predstavitevne procese, značilne predvsem za imunski sistem. Ta vloga astroцитov v normalnih razmerah ni izražena. Mešički, ki tvorijo molekule MHC II, pa postanejo bolj mobilni zaradi povečanega izražanja intermedijarnih citoskeletnih filamentov (Vardjan in sod., 2012, Guček in sod., 2012). Takšne spremembe astroцитov bi veljalo farmakološko obvladati, tako da bi potek sprememb astroцитov v bolezni zavrli. V zadnjem času napredujejo napor, da bi za zdravljenje nevroloških bolezni uporabili zdravila, ki selektivno delujejo le na astroците, ki so odzivni in tudi prispevajo k poteku bolezni. Prvo od takih zdravil, ki verjetno deluje prek astroцитov, je oralno zdravilo za zdravljenje pogoste oblike multiple skleroze - Fingolimod (Gilenya, Novartis) -, čeprav izdelovalec tega zdravila navaja drugačen mehanizem delovanja.



### Dinamika prometa mešičkov v astroцитih se ujema z razpoložljivostjo presnovkov za nastanek gliotransmiterjev

Astroцитi so edine celice v možganih, ki skladiščijo zaloge energije v obliki glikogena. Iz glikogena prek glukoze nastaneta dva pomembna gliotransmiterja, ki se tudi

Slika 8: Časovni porast citosolne koncentracije sekundarnega prenašalca cAMP in glukoze po dodatku noradrenalina. V bolezenskih stanjih zmožnost astroцитov, da tvorijo zadostne količine glukoze za sintezo gliotransmiterjev, lahko upade (diagram spodaj; črni krogi – miške divji tip, beli krogi – miške z intelektualno manjzmožnostjo).

skladiščita v mešičkih (ATP in glutamat). Polnjenje mešičkov s tema glijotransmitterjema bi lahko opredelilo počasno sporazumevanje astrocitov z okoliškimi celicami. Da bi določili razpoložljivost glukoze, iz katere nastaneta glutamat in ATP (poleg vloge skladiščenja kemične energije je ATP tudi pomemben glijotransmitter), smo merili spremembe citosolne koncentracije glukoze v astrocitih. Živčni prenašalec noradrenalin prek znotrajceličnega porasta sekundarnega prenašalca cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) povzroči zvišanje citosolne koncentracije glukoze v obdobju dobre minute (Kreft in sod., 2013), kar se ujema z odzivnostjo uravnane eksocitoze astrocitov. Ta proces bi lahko določal počasnost sporazumevanja astrocita z okoliškimi celicami. Slika 8 prikazuje časovni porast koncentracije sekundarnega prenašalca cAMP, pod njim pa je prikazan zakasneni porast citosolne koncentracije glukoze. Predvidevamo, da v

bolezenskih stanjih zmožnost astrocitov, da tvorijo zadostne količine glukoze za sintezo glijotransmitterjev, lahko upade in s tem se sklopljenost procesov sporazumevanja v možganih spremeni.

### Nova spoznanja o mehanizmih boleznih

Odkritja treh Nobelovih nagrajencev so omogočila boljše razumevanje univerzalnih procesov na ravni celične fiziologije evkariotov. Celični promet mešičkov, ki pomeni pomemben temelj za sporazumevanje med celicami, je s podelitvijo Nobelove nagrade za fiziologijo ali medicino v letu 2013 pridobil na »teži«, ki jo pri razumevanju delovanja celice tudi zasluži. S tem so nastali novi vzvodi za razumevanje mehanizmov delovanja tudi tako kompleksnega tkiva, kot so možgani. Ni nemogoče, da bodo zdaj lahko odkrili tudi motnje, ki so razlog za nekatera nevrološka obolenja, s tem pa tudi nove možnosti za njihovo zdravljenje.

#### Slovarček

**Nevron.** Živčna celica z vsemi svojimi izrastki (Slovar slovenskega knjižnega jezika); *celica* v živčevju s perikarionom, dendriti in nevritom, ki sprejema, prevaja in predeluje vzburljenje (Medicinski terminološki slovar).

**Nevrotransmitter.** Spojina, ki se sintetizira v presinaptičnem nevronu, hrani v sinaptičnih mešičkih, se sprosti ob vzburljenju živčnega končiča, z difuzijo prek sinapse doseže postsinaptično membrano, kjer po vezavi na receptor spodbuja (stimulira) ali zavira (inhibira) delovanje postsinaptične celice (Medicinski terminološki slovar).

#### Literatura:

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2013/advanced-medicineprize2013.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/advanced-medicineprize2013.pdf) *Machinery Regulating Vesicle Traffic, A Major Transport System in our Cells.*

Kreft, M., 2002: *Toksina botulin in tetanospazmin. Proteus*, 64 (5): 207-211.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Lauro, P., B. R., Montecucco, C., 1992: *Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature*, 359: 832-835.

Kreft, M., Stenovec, M., Rupnik, M., Grilc, S., Kržan, M., Potokar, M., Pangršič, T., Haydon, P. G., Zorec, R., 2004: *Properties of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Exocytosis in Cultured Astrocytes. Glia*, 46: 437-445.

Rituper, B., Guček, A., Jorgačevski, J., Flašker, A., Kreft, M., Zorec, R., 2013: *High-resolution membrane capacitance measurements for the study of exocytosis and endocytosis. Nature Protocols*, 8: 1169-1183.

Stenovec, M., Kreft, M., Grilc, S., Potokar, M., Erdani Kreft, Pangršič, T., Zorec, R., 2007: *Ca<sup>2+</sup>-dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. Exp. Cell Res.*, 313: 3809-3818.

Potokar, M., Kreft, M., Li, L., Andersson, D., Chowdhury, H. H., Pangršič, T., Pekny, M., Zorec, R., 2007: *Cytoskeleton and Vesicle Mobility in Astrocytes Traffic*, 8: 12-20.

Vardjan, N., Gabrijel, M., Potokar, M., Svajger, U., Kreft, M., Jeras, M., de Pablo, Y., Faiz, M., Pekny, M., Zorec, R., 2012: *IFN- $\gamma$ -induced increase in the mobility of MHC class II compartments in astrocytes depends on intermediate filaments. J. Neuroinflammation*, 26 (9): 144. PMID: 22734718.

Guček, A., Vardjan, N., Zorec, R., 2012: *Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. Neurochem. Res.*, 37 (11): 2351-63. doi: 10.1007/s11064-012-0773-6. Epub 2012 Apr 21.

Kreft, M., Lukšič, M., Zorec, T. M., Prebil, M., Zorec, R., 2013: *Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte. CMLS*, 70: 1483-1492.