

Eksocitoza pri živčnih in endokrinih celicah

Uvod

Eksocitoza je en od temeljnih procesov v evkarionskih celicah. Skupaj z endocitozo sta skrajna konca procesa kroženja membran (*membrane trafficking*). Z eksocitozo celice izločajo:

- hormone,
- nevrottransmiterje,
- encime,
- rastne faktorje,
- celici nerabne snovi.

Celoten proces kroženja membran pa omogoča tudi:

- uravnavanje velikosti in sestave plazmaleme,
- sprejem hranilnih snovi,
- znotrajcelične interakcije med posameznimi kompartmenti.

Eksocitoza kot konstitutivni celični proces poteka v vseh evkariontskih celicah, za živčne in endokrine celice pa je značilna eksocitoza, ki se proži s signalom povečane intracelularne aktivnosti kalcijevih ionov. Tako lahko ločimo konstitutivno eksocitozo in od kalcija odvisno eksocitozo.

Od kalcija odvisna eksocitoza pri živčnih in endokrinih celicah

Za eksocitozo so posebej specializirane živčne in endokrine celice. Pri obeh tipih celic je dražljaj, ki sproži eksocitozo, povečanje znotrajcelične aktivnosti kalcija, ki vstopi v citosol ali preko ionskih kanalov v plazmalemi ali se sprostijo iz zalog v endoplazmatskem retikulumu.

V od kalcija odvisni eksocitozi pri živčnih in endokrinih celicah sodeluje množica membranskih in citosolnih proteinov, od katerih so nekateri značilni prav zanj, preostali pa so podobni tistim, ki sodelujejo pri ostalih vrstah znotrajceličnega transporta membran. Ta podobnost kaže na to, da je od kalcija odvisna eksocitoza sicer specializiran proces, ki pa deluje v povezavi z ostalimi tipi kroženja membran.

Razlika med od kalcija odvisno eksocitozo pri živčnih in endokrinih celicah

Od kalcija odvisna eksocitoza pri živčnih celicah poteka na terminalnih aksonskih končičih. Je zelo hitra, saj mora omogočati čimvernejšo pretvorbo električnega signala (akcijskega potenciala) v kemijskega (izločanje nevrottransmiterja v sinaptično špranjo). Motorična sinapsa tako v manj kot milisekundi prenese signal iz motonevrona na prečno-progasto mišično celico.

Pri endokrinih celicah hitrost izločanja ni kritična, ker morajo hormoni tako ali tako potovati po krvnem obtoku, in zato je eksocitotski aparat zgrajen tako, da ne omogoča tako velikih hitrosti eksocitoze.

Razliko v hitrosti od kalcija odvisne eksocitoze med obema tipoma celic lahko razložimo vsaj na dva načina, ki se med seboj ne izključujeta:

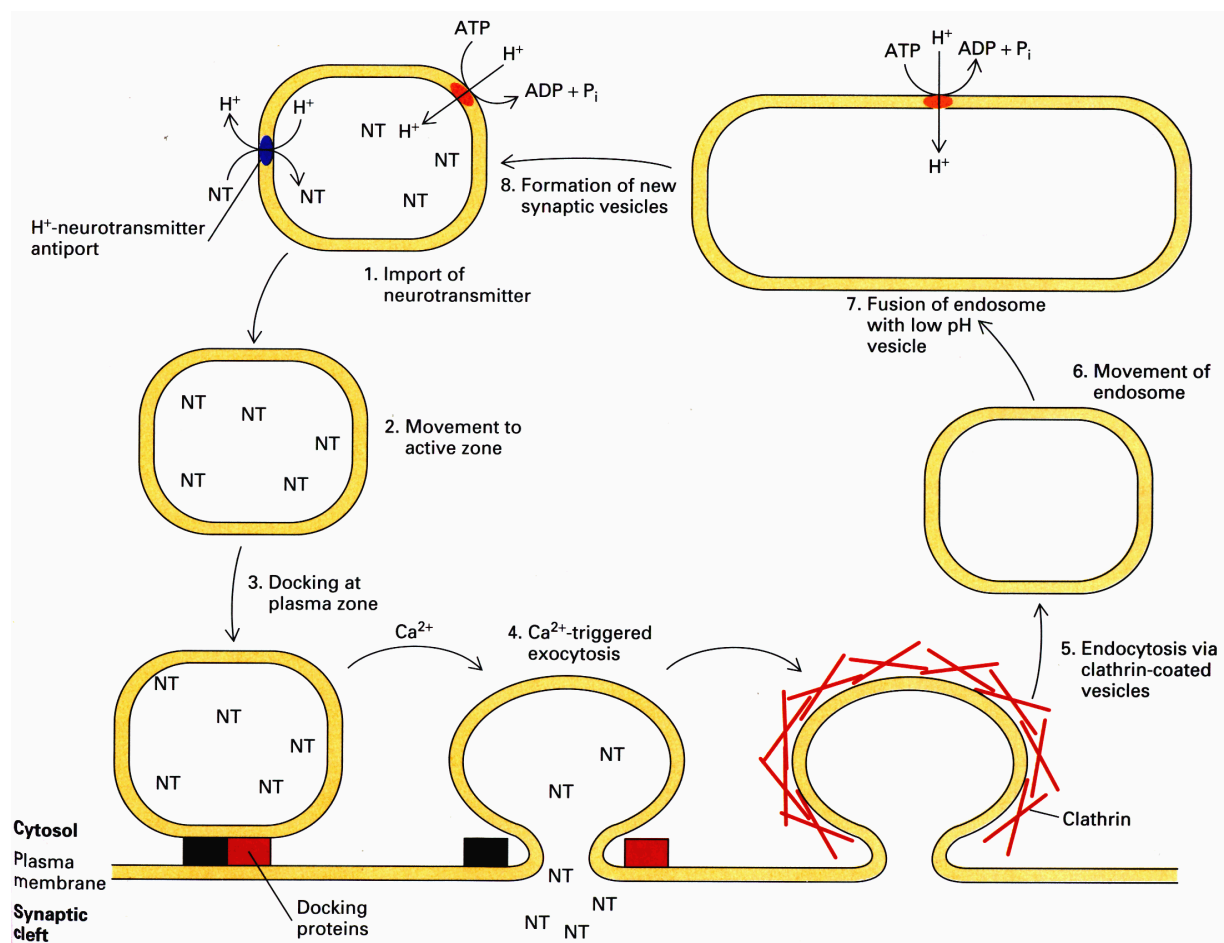
- razlika je kvalitativna - mehanizma eksocitoze se razlikujeta v proteinih, ki sodelujejo v procesu in določajo hitrost eksocitoze
- razlika je kvantitativna - različna je gostota mest, kjer eksocitoza poteka, zato je hitrost eksocitoze različna

Stopnje ekso-endocitotskega cikla

Eksocitoza – zlivanje veziklov s plazmalemo – je le zadnji korak v ekso-endocitotskem ciklu. Celotna pot vezikla od endocitoze do eksocitoze je večstopenjski proces, ki je najverjetneje v večih stopnjah odvisen od kalcija.

Celotno pot eksocitotskega vezikla lahko razdelimo na naslednje stopnje:

- endocitoza vezikla s *klatrin*skim plaščem,
- transport endosoma in fuzija z veziklom z *ATP-azo tipa V*, ki v vezikel črpa protone,
- polnjenje vezikla z nevrottransmitterjem oziroma hormonom preko *protonskega antiporta*,
- transport vezikla v aktivno področje ob plazmalemi – rekrutacija (*recruitment*),
- sidranje (*anchoring / docking*),
- priprava (*priming*),
- proženje (*triggering*),
- končno zlitje vezikla s plazmalemo (*fusion*) in sprostitvev nevrottransmitterja oziroma hormona v ekstracelularij.



Slika 1: shema celotnega ekso-endocitotskega cikla. Iz [Lodish, 1995]

Ekso-endocitotski cikel je vsaj pri živčnih celicah zelo hiter, saj se lahko na aksonskih terminalnih nevronov v eni sekundi sproži po petdeset akcijskih potencialov, vdorov kalcija in posledičnih valov zlitij veziklov. Cikel pa je tudi zelo specifičen, kar se tiče ločevanja in recikliranja plazmalemskih in vezikularnih membranskih proteinov.

Natančneje si bomo ogledali zadnjih pet stopenj cikla in proteine, ki v teh stopnjah sodelujejo.

Rekrutacija vezikla

V tej stopnji se vezikli, ki so označeni z membranskima proteinoma [sinaptotagminom](#), [sinaptobrevinom/VAMP](#) in na membrano privezanim proteinom [Rab3](#), sprostijo iz zaloge (*recruitment poola*), vezane na [F-aktinski](#) koritkalni celični skelet preko proteina [sinapsina](#). V tej stopnji, ki je odvisna od ATP, sodelujeta [miozin II](#) in [kinaza lahke verige miozina](#). Po rekrutaciji dobimo morfološko zasidrane vezikle, kar pomeni, da so na elektronskih mikrofografijah locirani v neposredni bližini plazmaleme. Pri kromafinih celicah je tako morfološko zasidranih veziklov okrog 800 na celico.

Sidranje vezikla

V stopnji sidranja se vezikel poveže s tarčno membrano – plazmalemo, pri čemer sodelujeta že omenjena proteina vezikularne membrane sinaptobrevin/VAMP in sinaptotagmin in proteina plazmaleme [sintaksin](#) in [SNAP-25](#), ter citosolni proteini [NSF](#), [\$\alpha/\beta\$ -SNAP](#) ter [\$\gamma\$ -SNAP](#). Dogajanje poskuša razložiti hipoteza SNARE (Söllner in sod., 1993), ki kompleksu omenjenih tipov proteinov pripisuje osrednjo vlogo tako pri prepoznavanju vezikularne in tarčne membrane kot tudi pri naslednjih korakih do končnega zlitja.

V prvem koraku sidranja se oba proteina membrane vezikla in oba proteina plazmaleme povežejo v kompleks. Citosolni protein α -SNAP izpodrine sinaptotagmin, sledi pa vezava NSF, na katerega se veže γ -SNAP. Kompleks sinaptobrevina/VAMP in obeh omenjenih proteinov plazmaleme (sintaksina in SNAP-25) imenujemo tudi 7S kompleks, ker se izolirani trdno povežejo v stehiometričnem razmerju 1:1:1, ki se pri centrifugiranju seseda s konstanto 7S. Končni kompleks [sinaptobrevin] – [α -SNAP – NSF – γ -SNAP] [sintaksin – SNAP-25] pa je na isti način dobil ime kompleks 20S.

Vse kaže, da ta hipoteza ne opisuje dobro dejanskega dogajanja v celici. Iz nekaterih dognanj, ki to hipotezo spodbijajo, vendar jih tu ne bomo navajali, lahko sklepamo, da NSF ne igra osrednje vloge pri sidranju, in da verjetno obstaja poleg opisane poti obstaja še ena pot, po kateri pride do povezave med plazmalemo in veziklom.

Pri sidranju verjetno igra pomembno vlogo tudi že omenjeni protein Rab3, ki je monomerni G-protein. Na kompleks Rab3 – GTP se veže [rabfilin](#), ki ima tudi vezavno mesto za kalcij. Glede na množico proteinov tipa Rab3, ki obstaja, lahko sklepamo, da so prav Rab3 beljakovine tiste, ki igrajo osrednjo vlogo pri prepoznavanju membran.

Priprava na zlitje

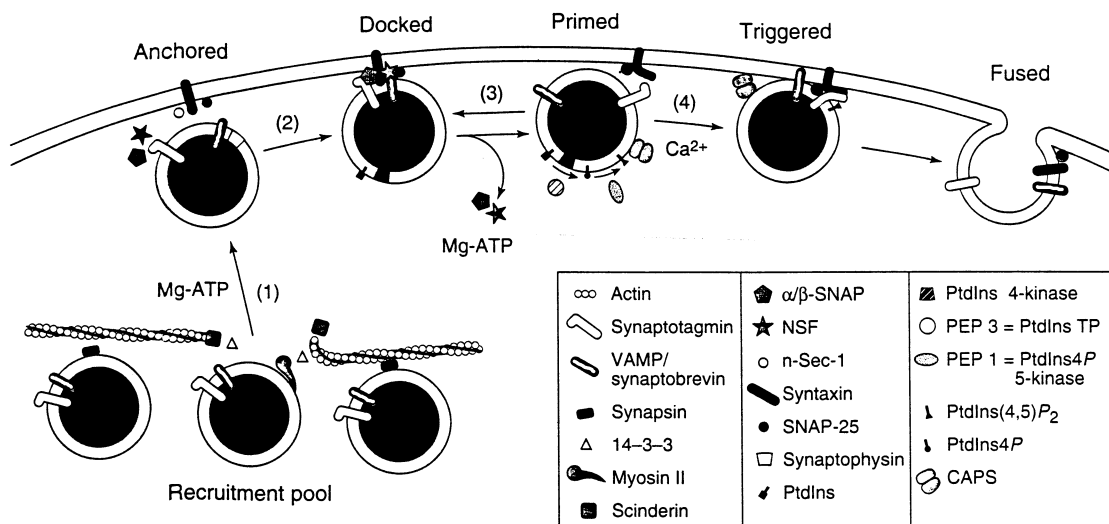
Priprava je od ATP odvisna stopnja procesa eksocitoze, v kateri sodelujejo vsaj trije proteini. [PI3P](#), fosfatidilinozitolni prenašalni protein in [PIP5K](#), fosfatidilinozitol-4-fosfat-5-kinaza povzročita nastanek fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfata (PIP-2), vloga proteina [PEP2](#) pa zaenkrat še ni poznana. V tej stopnji prosti protein NSF s hidrolizo ATP povzroči disociacijo 20S kompleksa SNARE, pri čemer je možno, da pri tem sodeluje tudi sinaptotagmin.

Proženje zlitja

Ta stopnja ni odvisna od ATP, kaže pa odvisnost od aktivnosti kalcija in sicer z $EC_{50}=3\mu M$. Za fazo proženja je potrebna citosolna beljakovina CAPS, verjetno pa pri proženju sodeluje vsaj katera od beljakovin, ki sodelujejo pri predhodnih stopnjah eksocitoze. Najverjetneje pri tej stopnji spet sodeluje sinaptotagmin oziroma njegova izooblika sinaptotagmin I, pri čemer je še posebej pomembno, da veže kalcij in v odvisnosti od aktivnosti kalcija spreminja obliko in svojo aktivnost.

Zlitje vezikla s plazmalemo

Ni še znano, ali je za zlitje membran pri eksocitozi potrebna beljakovina, ki bi segala skozi obe membrani, ali pa je fuzijska pora povsem lipidna struktura in torej proteini, ki sodelujejo pri fuziji, delujejo le kot ogrodje, ki omogoča zlitje obeh membran. Slednja razlaga je, čeprav na stopnji hipoteze, verjetnejša, še vedno pa ni jasna povezava med stopnjo proženja zlitja in samim zlitjem.



Slika 2: Shema možnega poteka eksocitoze od stopnje rekrutacije do zlitja. Iz [Martin, 1997]

Nekateri poskusi pri endokrinih celicah kažejo, da je od kalcija odvisna eksocitoza bifazičen proces. Prva, hitra faza je po amplitudi manjša, druga pa je počasnejša in po amplitudi nekajkrat večja. Zlitju v nekaj minutah sledi endocitoza. Protitelesa proti CAPS beljakovini preprečijo ali zmanjšajo hitro fazo eksocitoze, protitelesa proti fosfoinozitol bisfosfatu pa počasno fazo, iz česar lahko tudi sklepamo, da pot od priprave preko proženja do zlitja ni le ena, ampak da obstajata dve neodvisni, a med seboj povezani poti.

Regulacija eksocitoze

Kalcij je regulator eksocitoze in deluje na celo vrsto v eksocitozi sodelujočih proteinov. Najpomembnejši in najbolj poznan senzor za kalcij je sinaptotagmin I. Kalcij pa direktno regulira tudi citosolna proteina CAPS in rabfilin ter proteina plazmaleme SNAP-25 in sintaksin ter posredno tudi sestavljanje aktinskih filamentov. Kalcij ima poleg tega lahko tudi posredni vpliv preko kalmodulina in proteinskih kinaz. Regulatorji procesa eksocitoze pa so poleg kalcija tudi fosfoinozitidi.

Kratice in prevodi

SNAP-25	na sinaptosom vezani protein teže 25kDa (synaptosome-associated protein of 25kDa)
VAMP	na vezikel vezana membranska beljakovina (vesicle-associated membrane protein)
NSF	na N-etilmaleimid občutljiv fuzijski protein (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein)
SNAP	topni na NSF vezavni protein (soluble NSF attachment protein)
SNARE	SNAP receptor
PEP2	protein, ki sodeluje pri stopnji priprave eksocitoze (priming in exocytosis protein 2)
PITP	fosfatidilinozitol prenašani protein (phosphatidylinositol transfer protein)
PIP5K	fosfatidilinozitol-4-fosfat-5-kinaza
PIP-2	fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat
CAPS	s kalcijem aktivirana sekrecijska beljakovina (calcium activated protein in secretion)
7S kompleks	[sinaptobrevin/VAMP] – [sintaksin – SNAP-25]
20S kompleks	[sinaptobrevin/VAMP] – [α -SNAP – NSF – γ -SNAP] – [sintaksin – SNAP-25]
Membrane trafficking	kroženje membran
Recruitment	rekrutacija
Recruitment pool	zaloga
Anchoring	sidranje
Docking	sidranje
Priming	priprava
Triggering	proženje
Fusion	zlitje

Literatura

- Bennet, Mark K., Ca^{2+} and the regulation of neurotransmitter secretion, *Current Opinion in Neurobiology*, 1997, 7:316-322
- Bennet, Mark K., et.al., Molecular correlates of synaptic vesicle docking and fusion, *Current Opinion in Neurobiology*, 1994, 4:324-329
- Lodish, Harvey et.al., *Molecular Cell Biology*, 3rd Edition, Scientific American Books, 1995, Chp.21
- Martin, Thomas F.J., Stages of regulated exocytosis, *Trends in Cell Biology*, 1997, Vol.7
- Zupančič, Gregor, Stopnje hitre in od kalcija odvisne eksocitoze, Doktorska disertacija, MF Univerze v Ljubljani, 1997