

# Molekulární dopravní systém u kvasinek i v mozku má stejný původ

*Nobelova cena za fyziologii nebo medicínu 2013*

**FRANTIŠEK  
VYSKOČIL**

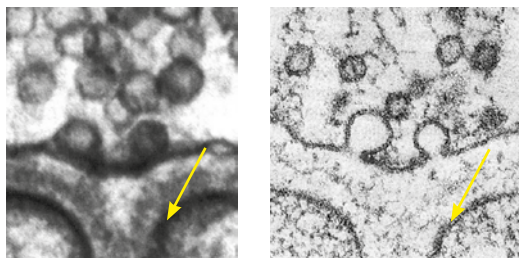
Před třemi lety mě redakce Vesmíru upozornila na dva vědce, kteří dostali významnou norskou vědeckou cenu za skladování, přepravu a uvolňování hormonů a neuropřenašečů. Výkonný redaktor si myslel, že napíšu

pár řádek o jejich nálezech, protože se zabýváme podobným výzkumem. Ocenění kolegové studovali výlev kvantový, my především nekvantový. Ale já se tehdy k napsání nedostal. Oba badatele jsem znal z devadesá-

Vpravo: 1. Výlev neuropřenašeče exocytosou synaptických váčků – kvantová teorie.

Shluk synaptických váčků v presynaptickém zakončení leží v tmavé (denzní) oblasti presynaptické membrány – v tzv. aktivní zóně. Synaptická štěrbina, kterou překonává neuropřenašeč (zde acetylcholin), má v tomto místě tvar Y. Ramena jsou bohatá na acetylcholinové nikotinové receptory (nAChR, žlutá šipky) a nožičku tvoří hluboký záhyb s mnoha sodíkovými napěťově citlivými kanály, které se otevřou při depolarizaci, vyvolané mnoha aktivovanými nAChR (synaptický potenciál). Díky aktivaci vzniká na kanálu akční potenciál, impulz.

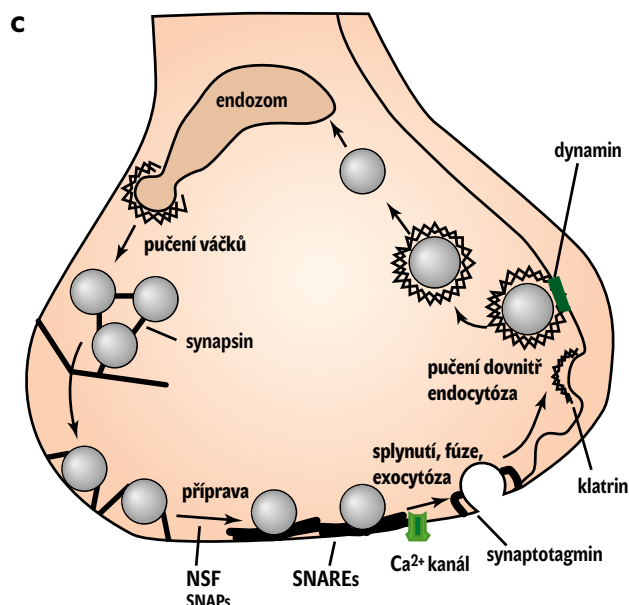
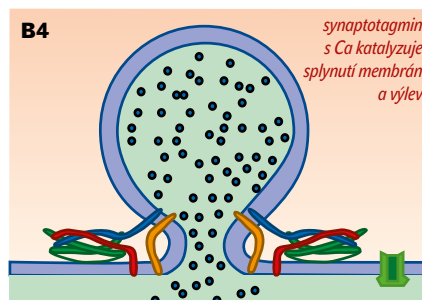
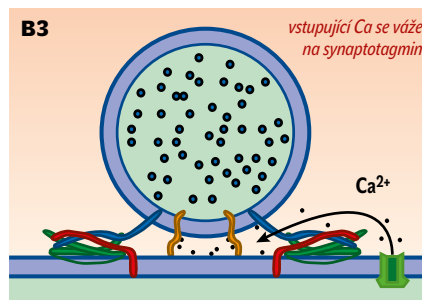
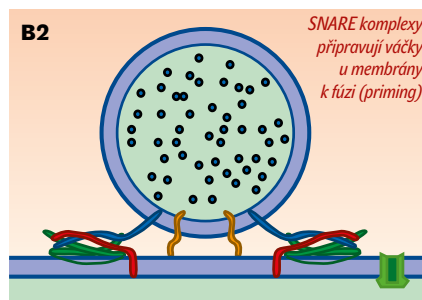
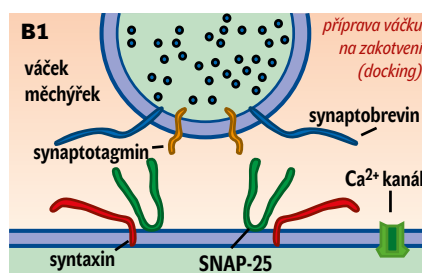
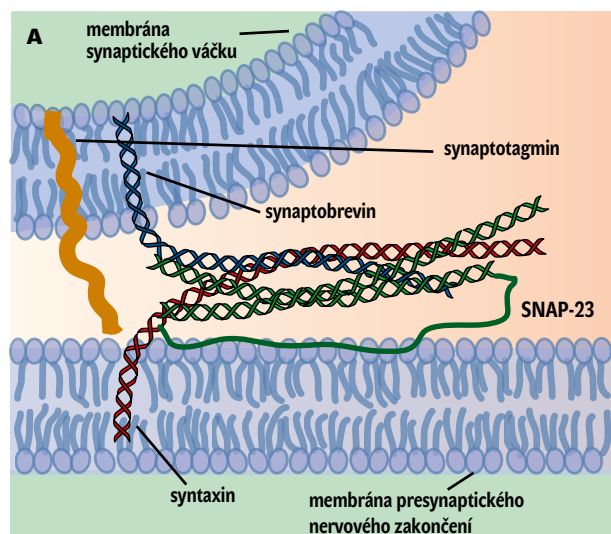
Jedinečný moment fúze dvou váčků s presynaptickou membránou je vpravo. Motorický nerv byl stimulován za přítomnosti 4-aminopyridinu (4-AP), látky, která zvyšuje výlev neuropřenašeče tím, že prodlužuje akční potenciál. Tkáň (žabí nervosvalové spojení) byla vakuově nastřelena na zmrazenou kovovou destičku necelou milisekundu po podráždění nervu a upravena pro elektronovou mikroskopii. Váčky zakotvené v aktivní zóně fúzovaly s presynaptickou membránou a exocytózou uvolnily kvantum acetylcholinu (ACh) do synaptické štěrbiny (Heuser, 1977). Na postsynaptické membráně čekají ACh receptory.

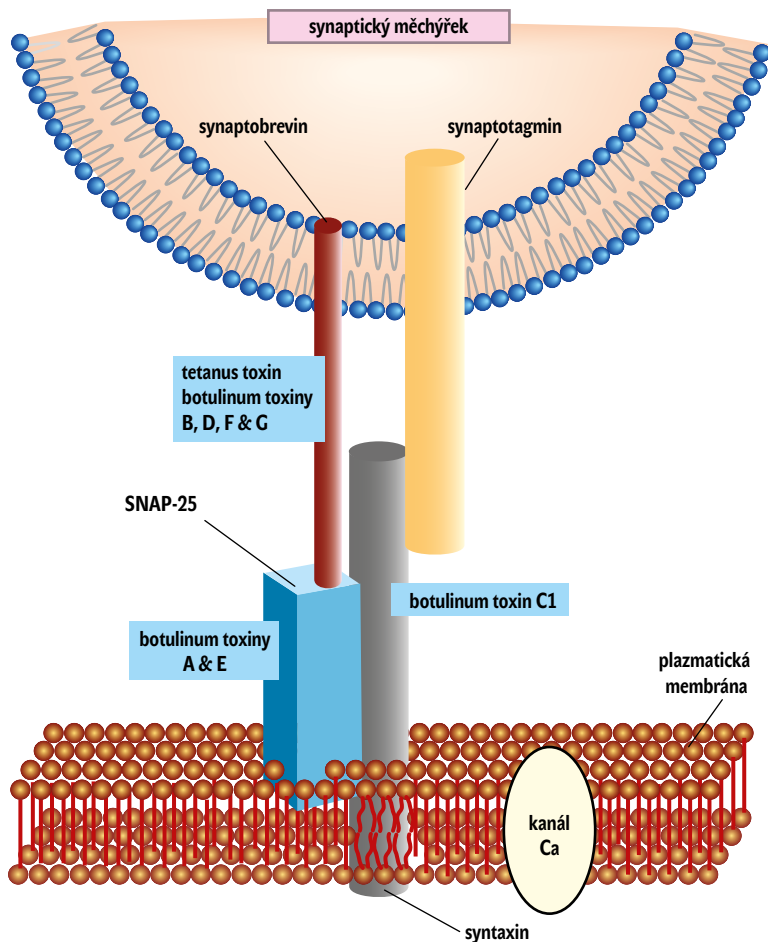


tých let, kdy jsme se setkávali na Conférences en Neurobiologie v Gif-sur-Yvette u Paříže u prof. Ladislava Tauc, českého zakladatele francouzské buněčné neurochemie. A letošní překvapení – nobelisty za fyziologii se stali právě ti dva nositelé Kavliho ceny a ještě jeden výborný genetik.

James E. Rothman, Randy W. Schekman a Thomas C. Südhof získali Nobelovu cenu za své nálezy dosud neznámých bílkovin, nutných pro činnost nitrobuněčných molekulárních strojů a mechanismů, které regulují vezikulární, váčkový (řekněme mikrokontejnery) dopravní systém v našich buňkách, včetně nakládání a vložení obsahu z buňky ven. Letošní nobelisté

Dole: 2. Hlavní kroky před výlevem a při výlevu váčků během exocytózy, viz text.





**3. Účinek klostridiových jedů. V měchýřku je spolu s hlavním neuropřenašečem či hormonem (např. Ach) několik dalších látek. Často je to ATP, které po výlevu reaguje s purinovými metabotropními receptory. Obecný jev výlevu dvou přenašečů či působků se nazývá kotransmise. Jde většinou o pomalejší modulaci účinku hlavního „rychlého“ přenašeče.**

však nejsou jeho objeviteli, spíše objasniteli. „Mikrokontejnery“, buněčné transportní váčky, známe dlouho. Už první elektronmikroskopické snímky synaptických spojů mezi neurony, stejně jako mezi nervovým vláknem a svalovou buňkou, pořízené v polovině padesátých let, ukázaly, že rozšířená nervová zakončení v těsném kontaktu s druhou buňkou na synapsi jsou plná drobných, dvojitou membránou obalených váčků o průměru asi 50 nm. Geniální německý emigrant ruského původu Bernard Katz v University College v Londýně okamžitě dal do souvislosti tyto struktury s miniaturními, asi 1 mV velkými a 2–3 ms dlouhými vlnkami depolarizace, snímanými jemnou mikropipetkou blízko synapse. A vyslovil spolu se svým studentem Paulem Fattem kvantovou hypotézu synaptického přenosu (Nobelova cena r. 1970).

Při exocytóze, splnutí takového měchýřku s nervovou membránou (obr. 1), se vyloučí či podle Sira Bernarda možná přímo vystříkne proti těsně přilehlé sousední buňce nebo jen tak do okolí (v případě hormonů, jako je inzulin) určité kvantum několika tisíc molekul acetylcholinu (nebo glutamátu, GABA či jiných neuropřenašečů), které reagují s receptorem. Receptory jsou buď aktivní a slabounce depolarizují svou rodnou membránu, nebo inhibiční, tj. hyperpolarizují nebo stabilizují buněčný potenciál postsynaptické membrány. To druhé je případ tlumivých přenašečů GABA a glycinu. Synchronní vylití mnoha těchto kvant při

nervovém podráždění<sup>1</sup> vede k elektrickému a pro napětově citlivé Na<sup>+</sup> kanálům „bolestivě“ nadprahovému sečení těchto drobných, miniaturních synaptických potenciálů (resp. proudů) a vzniku synaptického potenciálu, který přeroste v nový impuls. Realizuje se přenos informace nervového impulsu přes chemickou synapsi. Nebo naopak dojde k její inhibici.

Na obr. 1 je vidět, že váčky skutečně po podráždění nervu s membránou splývají. Katz a další z nás definovali na konci tisíciletí fyziologické podmínky pro výlev obsahu váčků. Především se ukázalo, že bez vápníku to nejde. Nervová depolarizace otevře v membráně zakončení vápníkových kanálů těsně u váčku, extracelulární ionty Ca<sup>2+</sup> vniknou dovnitř, vytvoří na zlomek sekundy „obláček“ Ca<sup>2+</sup> a cosi způsobí, aby se obsah váčku vylil. Na to „cosi“ se přicházelo jen pomalu a postupně. Co se děje před výlevem a během něj, už dnes víme hlavně díky letošním nobelistům. Víme, jak se váčky přesunují až do aktivní zóny výlevu (Rothman), jaké kouzelné bílkoviny musí obsahovat váček a membrána zakončení pro vytvoření kontaktu a fúzi (Rothman, Südhof) a které geny tyto bílkoviny kódují (Schekman).

Na počátku devadesátých let minulého století formuloval James Rothman hypotézu SNARE<sup>2</sup>. Samozřejmě stál na ramenou neurochemiků, kteří ho naučili, jak izolovat masu váčků a nervových terminálů (synaptozomů), jako byl např. Angličan Victor P. Whittaker. Rothman ty tajemné fúzní bílkoviny objevil. Jednak na membráně váčků, kde je označil souhrnně jako proteiny v-SNARE, jednak na presynaptické membráně nervu a označil je t-SNARE proteiny<sup>3</sup> (obr. 2 B1 a B2). Dále navrhl a prověřil schéma interakcí těchto proteinů, jejichž bližším určením, klasifikací a úlohou se zabýval stejně intenzivně jako Südhofova laboratoř. U Rothmanů připravili umělé lipidické váčky (lipozomy, nyní už to umějí v řádu nanometrů, PMID: PMC2840481), vybavili je izolovanými proteiny SNARE a dokázali *in vitro* jejich fúzi.

Samotné exocytóze, výlevu z nervového zakončení, předchází nejprve transport nových váčků od tělčka neuronu, kde vznikají buď v endoplazmatickém retikulu, nebo v Golgiho systému membrán (tam vznikají a dospívají proteiny) po kolejničkách nervových mikrotubulů a aktinu pomocí motoru kinesinu. Části měchýřků jsou recyklovány po použití v cyklu exocytóza (výlev) – endocytóza (zpětné vchlípení, obr. 2 C). Sem spadají práce třetího nobelisty, Randy W. Schekmana, molekulárního genetika, který předběhl své dva kolegy a už r. 1980 našel a klonoval 23 genů, jejichž Sec bílkoviny<sup>4</sup> u kvasinek – a jak se ukázalo, i v mozku nebo žlázách s vnitřní sekrecí – podmiňují správné fungování této velmi starobylé „via Appia“ našich buněk. Rozdělil je na tři skupiny a dokonce vystopoval ty, které když chybí nebo jsou poškozeny, vedou ke ztrátě schopnosti přenášet a vylučovat obsah váčků. To vede

ke smrti jak kvasinek, tak knockoutovaných myšek (PMID: 6996832). Objevil a izoloval např. Sec61 translokační komplex, COPII komplex, který pokrývá váčky, a poprvé izoloval měchýřky, které zajišťují transport mezi organelami v eukaryotických buňkách. Sec proteiny jsou u mnoha typů buněk téměř stejné, konzervované, a účastní se nejen výlevu bílkovinných dobrůtek z kvasinek, kterých je kolem stovky (etanol se ale uvolňuje difuzně), neurotransmise na synapsích, výlevu hormonů z endokrinních buněk, ale i rovnováhy cholesterolu v organismu a několika dalších metabolických regulací.

Ale zpět k nervovému zakončení na synapsi. Váček se naplní přenašečem (jako je acetylcholin, výměnou za protony), případně hormonem, nebo si sám přinese z centra buňky syntetizované bílkoviny (jako je P-substance a růstové faktory). A co dál? Rothman a koneckonců i Südhof se svými týmy předpokládali a dokázali následující tři kroky SNARE hypotézy: docking fázi, což je konečné dopravení měchýřku a jeho zakotvení v aktivní zóně, což vyžaduje energii z ATP a priming fázi, kdy je váček v těsné blízkosti membrány v aktivní zóně výlevu. Při primingu se propletou 4 vlákna a smyčky t-SNARE a v-SNARE jako vlásenky v kadeři (obr. 2 A) a váček čeká na spuštění exocytózy elektrickým podrážděním a následným vtokem  $Ca^{2+}$  iontů do nervového zakončení (obr. 2, B). Situace primingu připomíná pevně uchycení komára nožičkami na chlupaté pokožce a je velmi podobná připnutí viru na povrch infikované buňky (hairpins). Je obdivuhodné, kolik bílkovin se účastní formování, údržby a výlevu i na těch nejjednodušších nervosvalových synapsích (někdy se jim říká *E. coli* v oblasti neurobiologie). A ještě víc je jich na synapsích v mozkových strukturách. Regulačních a strukturálních proteinů jsou desítky, možná stovky.

Samozřejmě těch nejdůležitějších je jen několik a jsou vesměs spojeny se jménem Thomase Südhofa. Tak mezi v-SNARE patří 13 synaptotagminů, z nichž 8 má dvě vazebná místa pro  $Ca^{2+}$ . Po navázání  $Ca^{2+}$  se vytlačí z komplexu SNARE další bílkovina, komplexin, která v jedné konformaci brání a v druhé umožňuje vytvoření póru pro únik náplně váčku (obr. 2 B3 a B4). Na váčcích jsou dále synaptobreviny, které ukotvují váček do celkového SNARE komplexu a jsou cílem smrtícího tetanospasminu z *Clostridium tetani*. Příbuzný kmen bakterie *Clostridium botulinum* a jí vylučované botulotoxiny také ničí synapse a blokují kvantový výlev tím, že se zakusují do dalších důležitých vláknitých bílkovin ze společenství t-SNARE v nervové membráně, do SNAP-25 a do syntaxinu (obr. 3), jehož předpjatá struktura (jako ohnutá pružina, obr. 2 A) zřejmě poskytuje energii pro fúzi a tvorbu póru. Syntaxin je ovládán geneticky citlivými bílkovinami ze skupiny Munc (viz dále).

V poslední době se Thomas Südhof zaměřil na vývoj a stabilitu synapsí a objevil neurexiny, přítomné na presynaptických zakončeních,

a neuroliginy, které jsou na postsynaptické membráně a pevně obě membrány spojují jako malé svorky. Způsob propojení neurexiny a neuroliginy určuje různé typy synaptických kontaktů mezi neurony a zřejmě má i funkční význam. Südhof identifikoval některé mutace těchto spojovacích bílkovin, které provázejí dědičné formy autismu. Tento muž je zajímavý i proto, že se stal známým už předtím, než se začal zajímat o buněčný transport. Pracoval na transportních bílkovinách pro krevní lipidy a z jeho studií vznikla léčiva na snížení „špatného“ cholesterolu (LDL), známé statiny, především atorvastatin.

Ukazuje se, že poruchy v intracelulárních transportních mechanismech mají často za následek nějaké onemocnění. Např. při diabetu II. typu postupně selhává správně načasovaný výlev inzulínu z beta-buněk Langerhansových ostrůvků v pankreatu a inzulínem zprostředkovaný transport glukózy do svalu a bílých tukových buněk. Také imunitní buňky potřebují dobře fungující transportní a fúzní systém váčků, aby mohly uvolňovat důležité obranné a regulační látky včetně cytokinů a imunitních informačních molekul, které zprostředkovávají vrozené a adaptivní imunitní odpovědi při ochraně našeho zdraví a života.

Například 30 % dětí trpících dědičnou familiární hemofagocytující lymfocytózou (FHL) má mutace genů pro fúzní bílkoviny perforin, syntaxin 11, hMunc13-4 a Munc18-2. Přitom nejde o malíčkové. Tyto děti mají porušenou cytotoxickou (tj. ochrannou) funkci lymfocytů T a NK (přirozených zabíječů), což se projevuje během prvních měsíců po narození poruchou buněčné i protilátkové imunity a těžkými zánětlivými reakcemi. Není-li adekvátně léčena (výměnou krvevotvorby), je FHL během několika měsíců bez výjimky fatální. Některé formy epilepsie, opět především dětské, mají také poškozený gen pro fúzní protein Munc18-1.

Na závěr lehký povzdech. Občas se závislivě zabýváme otázkou, proč někdo dostane Nobelovu cenu v přírodních vědách (ale i ty ceny národní) a někdo ne. Rádi bychom věřili, že je v tom politika, tedy ta vědecká, a tím omluvili vlastní neúspěšnost. Někteří nobelisté to mají v rodině, jako molekulární genetici otec Arthur a syn Roger Kornbergovi v létech 1959 a 2006. Jiní studovali či pracovali u nositelů této ceny jako Bernard Katz u Archibalda V. Hilla (1886–1977), mága svalové kontrakce a bioenergetiky. Podobně Randy W. Schekman pracoval v biochemické laboratoři s Arthurem Kornbergem (Nobelova cena 1959). Thomas Südhof má ale jinou osobní zkušenost, jak být nominován a jmenován. V odpovědi na otázku jednoho novináře, kdo byl jeho nevlivnější učitel, říká: „Byl to můj učitel na fagot. Naučil mě, že jediná cesta k úspěchu je cvičit a poslouchat, a cvičit a poslouchat, hodiny a hodiny a hodiny.“

Tak nevím, asi jsem měl v laboratoři víc cvičit na housle, když mě v mládí soudruzi k žádnému nobelistovi nepustili... ☺

1) V našich nedávných článcích jsme ukázali, jak je časová synchronizace výlevu jednotlivých kvant řízena pomocí systému fosforylace výlevových bílkovin a jak adrenalinové a noradrenalinové receptory mohou zlepšit reakční rychlost našich svalů (PMID: 10358126).

2) Akronym SNARE je odvozen z děsivého názvu „soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor“.

3) V je od vesicle, později také VAMP, vesicle associated membrane proteins; t v t-SNARE je od nerve terminal.

4) Od secretory proteins.

Vznik textu byl podpořen grantem IAA500110905.