

Ajda Flašker<sup>1\*</sup>, Boštjan Rituper<sup>2\*</sup>, Robert Zorec<sup>3</sup>

# Vpogled v uravnavano eksocitozo: vloga lipidov

*Insight into Regulated Exocytosis: Role of Lipids*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** eksocitoza, membranska fuzija, fuzijska pora, lipidi, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat, diacilglicerol, sfingozin, holesterol

Eksocitoza, katere del je tudi fuzija membrane mešička in plazmaleme, je značilna za evkariontske celice in ima pomembno vlogo v mnogih celičnih procesih. Dolgo časa je na raziskovalnem področju prevladovalo mnenje, da celoten potek eksocitoze katalizirajo le proteini. Takemu pogledu pravimo tudi proteocentrični. Šele v zadnjih dveh desetletjih je postalo jasno, da na urnavanje eksocitoze pomembno vplivajo tudi lipidi, za katere so prej verjeli, da so le pasivni gradniki celične membrane. Med lipide, ki uravnava proces eksocitoze, med drugimi spadajo fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat, diacilglicerol, polinenasičene maščobe kisline, sfingozin in holesterol. Kot fuzijski proteini tudi naštetih lipidi vplivajo na potek eksocitoze na različne načine. Cilj tega članka je osvetliti vlogo in funkcijo lipidov pri procesu eksocitoze.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** exocytosis, membrane fusion, fusion pore, lipids, phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, diacylglycerol, sphingosine, cholesterol

Exocytosis, part of which is the merger of the vesicle and the plasma membrane, is characteristic for eukaryotic cells, which engage this process in a myriad of cell functions. For a long time it was believed that exocytosis was predominantly regulated by proteins, a view referred to as 'proteocentric'. Only recently it was shown that many of lipids, previously considered as passive cell membrane components, also play vital roles in regulation of exocytosis. Among others, such lipids are phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, diacylglycerol, polyunsaturated fatty acids, sphingosine and cholesterol. Much like proteins, lipids act at various points in the process and influence exocytosis in various ways. The goal of this article is to highlight the role of lipids in exocytosis.

---

<sup>1\*</sup> Ajda Flašker, univ. dipl. biotech., laboratorij LN-MPC, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>2\*</sup> Boštjan Rituper, dr. med., laboratorij LN-MPC, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; bostjan.rituper@mf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Akad. prof. dr. Robert Zorec, univ. dipl. biol., laboratorij LN-MPC, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

\* Avtorja si delita mesto prvega avtorja.

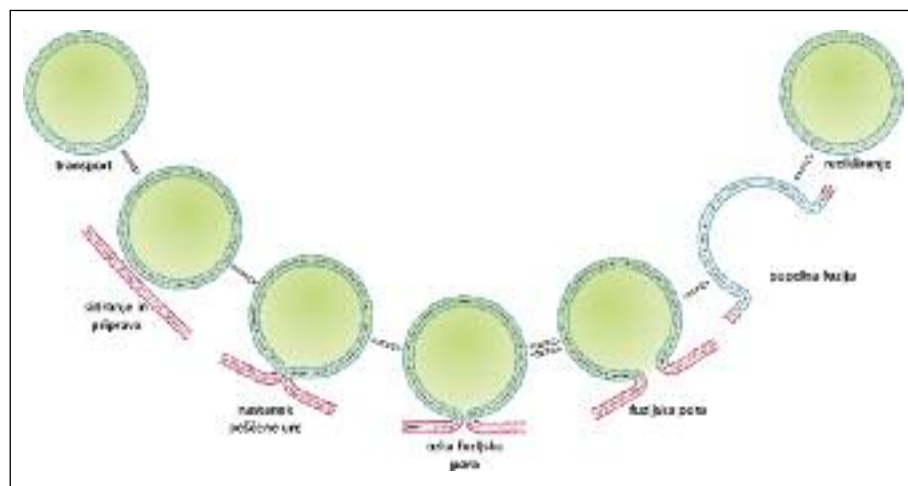
## EKSOCITOZA

Z eksocitozo se iz evkariotskih celic sproščajo snovi, ki se skladiščijo v svetlini mešičkov (1). Ta proces sodeluje tudi pri vstavljanju specifičnih lipidov in proteinov v plazmalemo. Poznamo dve obliki eksocitoze, konstitutivno in regulirano. Konstitutivna poteka v vseh evkariotskih celicah. V določenih visoko specializiranih celicah (v glavnem gre za nevrone in endokrine celice) pa poteka zelo natančno regulirana oblika eksocitoze, kjer celice izločajo neurotransmiterje, neuropeptide ali hormone na določenem mestu ter ob ustreznem času (govorimo o prostorski in časovni regulaciji) (2). Obe obliki eksocitoze predvidoma uporabljata enako molekulsko pot, razlikujeta se samo v uravnavanju procesa (3). To seveda ne pomeni, da konstitutivna eksocitoza ni regulirana, ravno nasprotno. Tudi pri tej različici celice natančno uravnavajo stopnjo in mesto izločanja. Glavna razlika nastane v poznih fazah eksocitoze, kjer so specializirane celice sposobne kopičenja eksocitotskih mešičkov, medtem ko pri konstitutivni obliki do tega ne prihaja. Za potrebe tega članka se bomo posvetili regulirani eksocitozi.

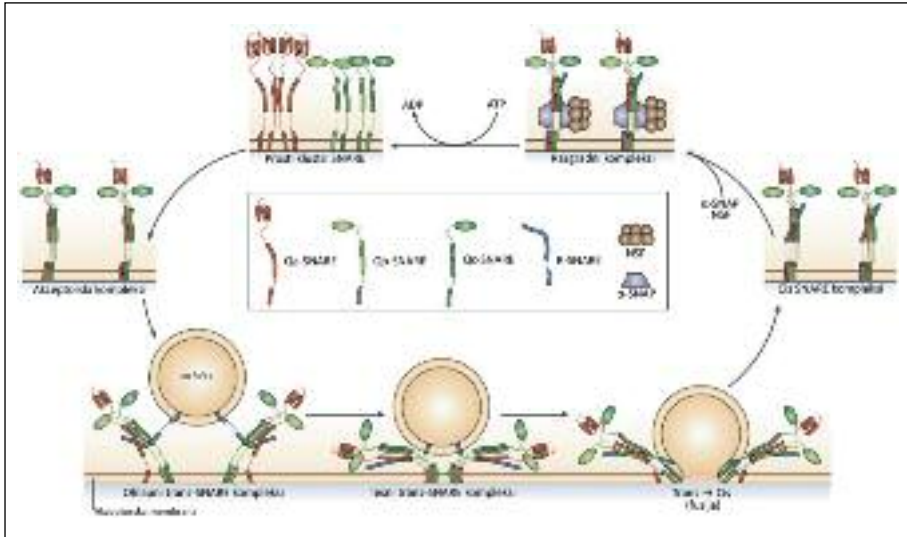
Eksocitozo lahko delimo na več stopenj (slika 1). Mešički, namenjeni izločanju snovi,

se tvorijo v Golgijevem aparatu. Sledi prenos do membrane (angl. *trafficking*), sidranje na membrano (angl. *docking*) ter priprava na fuzijo (angl. *priming*). V tej fazi, pri regulirani eksocitozi, mešički čakajo na ustrezen signal (običajno je to zvišanje znotrajcelične koncentracije prostega kalcija), čemur sledi formacija membranskega kompleksa v obliki peščene ure (angl. *stalk pore formation*), preoblikovanje le-te v ozko fuzijsko poro ter širjenje fuzijske pore. Široka fuzijska pora se lahko reverzibilno spet zoži ali pa se popolnoma razširi in s tem omogoči integracijo membrane mešička v plazemsko membrano (angl. *full fusion*). Na novo vključena membrana mešička se lahko naknadno reciklira in tako s pomočjo endocitoze ponovno vstopi v proces kroženja membran (4).

Raziskovalci so dolgo časa verjeli, da so za nadzor nad vsemi fazami eksocitoze odgovorni samo proteini ter da lipidi predstavljajo le gradbene elemente plazmaleme in membrane mešičkov. Takemu pogledu pravimo proteocentrični pogled in predpostavlja, da proteini stabilizirajo vse lipidne intermediete ter katalizirajo fuzijo (6). Šele v zadnjih dveh desetletjih smo spoznali, da so lipidi veliko več kot pasivni gradniki membran. Imajo namreč zelo pomembno vlogo pri transpor-



Slika 1. Shema membranske fuzije (5). Po transportu mešička do membrane pride do sidranja in priprave na fuzijo. V tej fazi mešiček čaka na signal, ki sproži fuzijo membrane. Običajno je ta signal zvišanje znotrajcelične koncentracije prostega  $Ca^{2+}$ , čemur sledi nastanek membranske strukture v obliki peščene ure. V naslednji fazi se razvije ozka fuzijska pora, ki se razširi (v tej fazi se vsebina mešička intenzivno izloča). Fuzijska pora se lahko ponovno zoži ali pa se mešiček popolnoma spoji z membrano.



Slika 2. Konformacijske spremembe proteinov SNARE (angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) med sidranjem in fuzijo mešičkov (16). Na akceptorski membrani (plazmalema) se nahajajo trije motivi Q-SNARE (motivi proteinov SNARE z ohranjenimi glutaminskimi ostanki – enega prispeva sintaksin, dva pa SNAP (angl. synaptosomal associated protein)), na mešičku pa je en motiv R-SNARE (motivi proteinov SNARE z ohranjenimi argininskimi ostanki – prispeva ga sinaptobrevin). Interakcija Q-SNARE-ov z R-SNARE-i se začne na N-terminalnem koncu motivov SNARE. Med povezovanjem nastane štirivijačen trans-SNARE-kompleks, ki napreduje iz ohlapnega (angl. loose) stanja v tesno (angl. tight) stanje. Formaciji tesnega stanja naj bi po mnenju nekaterih avtorjev sledilo odpiranje fuzijske pore, a to še ni neposredno eksperimentalno preverjeno. Med fuzijo transtanje preide v cis-konfiguracijo, kar predstavlja energetski minimum fuzijske reakcije. R- in Q-SNARE-i se naknadno ločijo s sortiranjem (tukaj sodelujejo še drugi faktorji, npr.  $\alpha$ -SNAP (angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF)-attachment protein) in NSF (angl. N-ethylmaleimide-sensitive factor). ADP – adenoindifosfat, ATP – adenozintrifosfat.

tu mešičkov, celični signalizaciji, lokalizaciji proteinov ter proteinski funkciji (7). Vpliva - jo tudi na lastnosti lipidnega dvosloja, orga - nizirajo in oblikujejo membranske domene za fuzijo ter jo neposredno regulirajo preko pro - teinskih kompleksov (6). Kaže, da so se v evo - luciji selekcionalni kompleksni mehanizmi, kjer nadzor nad eksocitozo družno izvajajo proteini in lipidi, vse skupaj pa omogoča pro - storsko in časovno natančno nadzorovano celično izločanje (npr. živčni končič ob elek - tričnem dražljaju v sinaptično režo izloči dolo - čeno količino kvantov nevrottransmitterja).

### Fuzija membran

Fuzija membran je ključna stopnja v ekso - citozi, pri kateri pride do zlivanja membra - ne mešička s plazmalemo. Pred zlivanjem se morata membrani približati, čemur naspro - tujejo odbojne elektrostatične sile, ki so posle -

dica negativno nabitih lipidnih molekul, ter hidracijske sile (približevanje membran zahteva odstranitev hidracijskega ovoja). Te sile so izjemno velike, zlasti na majhnih razdaljah (1–2 nm), kar predstavlja veliko energijsko oviro (8, 9). Ni še popolnoma jasno, kako se ta ovira premaga. Verjetno pri tem sodelujejo proteini SNARE (angl. soluble N-ethylma - leimide-sensitive factor attachment protein receptor), in sicer na dva načina: s konforma - cijsko spremembo strukture ter s prebitkom pozitivno nabitih ostankov, ki privlačijo nega - tivno nabite lipidne molekule (glej poglavje o proteinih SNARE) (slika 2). Ko se membra - ni dovolj približata, sledi nastanek prehodne - ga stanja v obliki peščene ure (angl. stalk-pore formation), ki hitro preide v stopnjo z obliko ozke fuzijske pore (vsebina mešička se v tej fazi še ne more izločiti), ta pa se razširi v nasled - njih stopnjah do te mere, da omogoči izstop molekul, ki se skladiščijo v mešičku (4, 11).

Znano je, da lahko premer fuzijske pore fluktuira med bolj ali manj razširjenim stanjem, preden se pora popolnoma razširi, kar imenujemo prehodno odpiranje fuzijske pore (angl. *transient fusion pore opening* ali *'kiss-and-run'*) (12, 13). Pri nekaterih celicah (npr. pri hipofiznih laktotrofi) fuzijska pora le redko preide v popolnoma razširjeno stanje. Pogosto periodično pulzira, ob vsaki pulzaciji pa se sprosti kvant vsebine mešička (15). Druga možnost pa je, da se mešiček popolnoma zlije s plazmalemo celice (angl. *full fusion*) (slika 1).

### Proteini SNARE

Odkritje proteinov SNARE v 80. letih prejšnjega stoletja je prineslo preskok v razumevanju membranske fuzije. Proteinski kompleksi, ki nastanejo z medsebojnim povezovanjem proteinov SNARE, lahko namreč neposredno pospešijo fuzijo mešička s plazmalemo ali dveh mešičkov med seboj (temu pravimo homotipična fuzija) (16). Proteini SNARE so membranski proteini, pomembni pri znotrajceličnih fuzijskih korakih (6). Razlikujejo se v strukturi in obliki, vsi pa imajo skupen ohranjen motiv SNARE (tj. ohranjeno zaporedje 60–70 aminokislin). Najdemo jih na celični membrani in na membrani mešička, in sicer na posebnih membranskih predelih (t.i. membranskih splavih (angl. *raft*) – glej poglavje o holesterolu), kjer so združeni v nano- oz. mikrodomene (16).

V nevronih in neuroendokrinih celicah so pri fuziji membran potrebni trije proteini SNARE, in sicer sinaptobrevin oz. VAMP (angl. *vesicle associated membrane protein*), sintaksin in SNAP (angl. *synaptosomal associated protein*). VAMP in sintaksin sta transmembranska proteina, ki vsebujeta vsak po en motiv SNARE, medtem ko je SNAP vezan na plazmalemo in vsebuje dva motiva SNARE (17). Med fuzijo se domene naštetih proteinov v predelu motivov SNARE povežejo in tako vplivajo na zlivanje mešička s plazmalemo (2).

Tradicionalna klasifikacija proteinov SNARE temelji na lokaciji, od koder so jih prvič izolirali. Tako poznamo proteine t-SNARE oz. tarčne SNARE, ki se nahajajo na plazmalemi (sem spada tudi sintaksin), in v-SNARE (angl. *vesicle SNARE*) oz. proteine SNARE, ki se povezujejo z mešički; sem sodi VAMP. Ker ta razdelitev ni najbolj natančna, saj ne zajema homotipič-

nih fuzijskih dogodkov, so pred kratkim proteine SNARE ponovno razdelili glede na ohranjeni argininski (R) ali glutaminski (Q) ostank v motivih SNARE. VAMP po novem torej spada med R-SNARE (proteini SNARE z ohranjenimi argininskimi ostanki v motivu SNARE), sintaksin in SNAP pa med Q-SNARE (proteini SNARE z ohranjenimi glutaminskimi ostanki v motivu SNARE) (19).

Fuzijo membran lahko delimo na več korakov (slika 2). Prvi korak je nastanek kompleksa trans-SNARE. Teorija pravi, da se pri tej stopnji štirje motivi SNARE prej naštetih proteinov SNARE medsebojno povežejo in tvorijo štirivijačni kompleks. Povezovanje se začne na N-terminalnem koncu, zapiranje zadrge pa napreduje proti C-terminalnemu koncu (angl. *zippering*). Posledično pride do konformacijskih sprememb proteinov, kar ustvari mehansko silo, ki membrano mešička približa plazmalemi. Nastali kompleks je izredno termično in mehansko stabilen (16). Sledi preoblikovanje trans-kompleksa iz ohlapnega (angl. *loose*) stanja v tesno stanje, kateremu sledi nastanek ozke fuzijske pore, ki se s prekinitvijo trans-povezave in s sprostitvijo v cis-konfiguracijo razširi (slika 2) (16). V tej konfiguraciji fuzijske pore poteka intenzivno sproščanje vsebine svetline mešička v zunajcelični prostor (20). Sami prehodi med stopnjami stanj odprtosti fuzijske pore naj bi bili povezani z nastajanjem trans- in cis-SNARE-kompleksa, a to še ni bilo prepričljivo potrjeno s poskusi. Zato lahko v prihodnosti pričakujemo nadgradnje razumevanja vloge kompleksa SNARE pri regulaciji fuzije membran in fuzijske pore.

Še vedno ni znano najmanjše število kompleksov SNARE na mešiček, ki sodelujejo pri eksocitozi. Bogaart in sodelavci so pokazali, da naj bi za fuzijo membran zadostoval le en sam kompleks SNARE, nedavni rezultati druge raziskovalne skupine pa kažejo, da so za hitrejšo fuzijo potrebni trije kompleksi SNARE (22, 23). Nobeni poskusi pa niso bili narejeni na ravni posameznega mešička, zato je prava vloga dinamike nastajanja kompleksov SNARE še neznana.

Model približevanja fosfolipidnih membran in fuzije kljub velikemu napredku v zadnjem desetletju še ni popolnoma pojasnjen. Hipoteza peščene ure, ki predvideva, da zapi-

ranje proteinov SNARE prenese mehansko energijo na membrane, kar jih upogne in sproži fuzijo, se je izkazala za nenatančno, saj ne upošteva elektrostatskega odboja med negativno nabito plazmalemo in mešičkom ter sil, ki se pojavijo zaradi hidracijskega ovoja (16). Zato se upravičeno zastavlja vprašanje, ali energija, proizvedena z nastajanjem kompleksa SNARE, zadostuje za fuzijo. Nedavno objavljena raziskava potrjuje dvom o hipotezi, saj dokazuje, da pri fuziji sodelujeta tudi pozitivno nabiti domeni proteinov VAMP in sintaksina (angl. *juxtamembrane domains*), ki se povežeta z negativno nabitimi lipidi mešičkov in plazmaleme in tako pomagata premostiti elektronegativni naboj lipidnih molekul v membrani ter omogočita fuzijo.

### Botulizem

Botulizem je nevarna, redka bolezen, ki jo povzročajo nevrotoksini po Gramu pozitivne bakterije *Clostridium botulinum*. Poznamo več vrst antigensko različnih tipov nevrotoksinov; za človeka patogeni so A, B, C, E, F in G (24). Toksini botulina serotipa A, B, C, E, F so mestno specifične proteaze, ki delujejo na različne proteine SNARE in tako zavirajo proces eksocitoze (2). Različni tipi nevrotoksina cepijo različne proteine SNARE na različnih mestih. Toksin botulin tipa B preprečuje sproščanje nevrotransmiterjev in hormonov s cepitvijo VAMP-2, toksin botulin tipa A cepi protein SNAP-25, toksin botulin tipa G pa cepi vse izoforme proteina VAMP (25–27).

### PROTEIN MUNC 18-1

Protein Munc 18-1 (angl. *mammalian uncoordinated-18-1*) je citosolni protein iz družine SM (angl. Sec1-Munc 18) proteinov in je prisoten pri vseh evkariontih. Je eden od regulatorjev membranske fuzije. S tesno vezavo na sintaksin-1 le-tega »zaklene« v zaprti konformaciji, kar onemogoča nastanek kompleksa SNARE (deluje kot molekulska stikalo). Ta reakcija omogoča, da se sintaksin-1 prenese do plazmaleme brez nezaželenih ektopičnih reakcij (31). Novejše raziskave kažejo, da vstopa Munc 18-1 tudi tako, da se veže na že sestavljene komplekse SNARE, ki vsebujejo sintaksin-1 in tvori t. i. hiperkompleks Munc

18-1/SNARE, iz česar lahko sklepamo, da je Munc 18-1 pomemben tudi pri membranski fuziji (32).

### PROTEIN MUNC-13

Protein Munc-13 (angl. *mammalian uncoordinated-13*) je protein aktivne cone. To je specializirana struktura presinaptične plazemske membrane, kjer se mešički sidrajo in zlivajo. Nujno je potreben za pripravo mešičkov na fuzijo. Mutacije, ki povzročijo odsotnost proteina, povzročijo popolno blokado sproščanja nevrotansmiterjev (34). Najverjetneje protein Munc 13 skupaj s proteinom Munc 18-1 omogoči sestavljanje kompleksa sintaksin-1/SNAP-25 in spodbuja mešičke k prilepljenosti na fuzijo (35).

### FOSFATIDILINOZITOL-4,5-BIFOSFAT IN DIACILGLICEROL

Fosfatidilinozitol je predstavnik membranskih fosfolipidov. V evkariontskih celicah ima posebno vlogo, saj se lahko njegova glava fosforilira na enem ali več mestih. Posledično dobimo več različnih fosfoinozitudov, od katerih so za štiri dokazali, da imajo pomembno vlogo pri kroženju membran (36). Za vse fosfoinozitide je značilno, da so vgrajeni v citosolno plast plazmaleme, kjer do njih zlahka dostopajo različni encimi (kinaze, fosfataze, fosfolipaze). Evkariontske fosfolipaze kot substrat uporabljajo le fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>), produkta njihovega delovanja pa sta v citoplazmi topni inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) in diacilglicerol (DAG), ki ostane v membrani, oba pa sta potentna sekundarna obveščevalca.

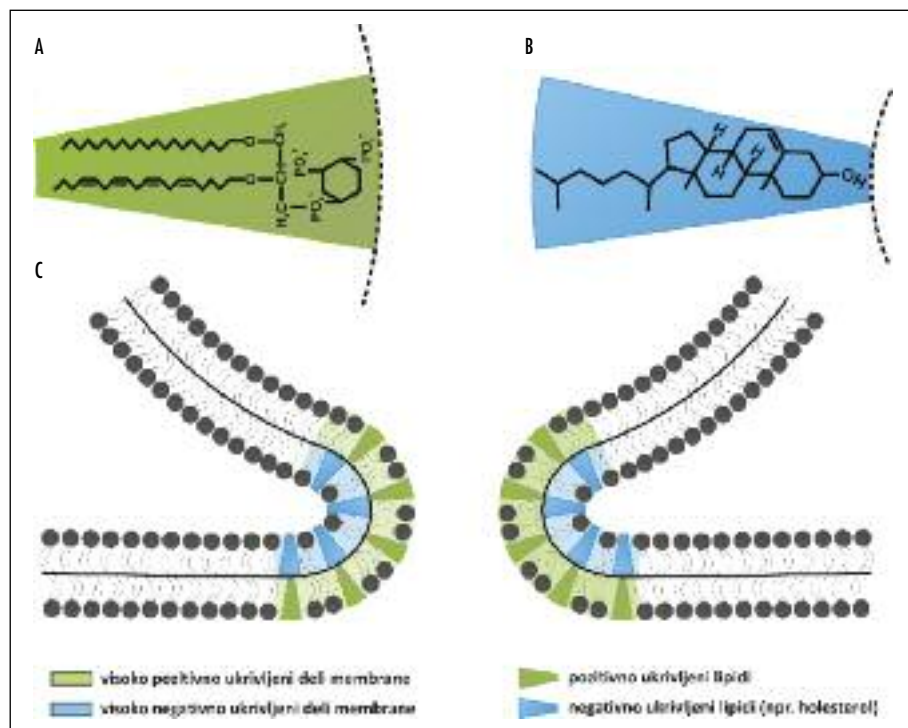
Encimske reakcije lahko hitro in učinkovito spreminjajo koncentracijo fosfoinozitudov v specifičnih regijah plazmaleme, kar ima velik vpliv na eksocitozo. Fosfoinozitudi so namreč neposredno udeleženi v procesu eksocitoze, in sicer na enega izmed treh načinov: lahko igrajo vlogo označevalcev delov membrane, kamor se vključujejo proteini, ki imajo pomembno vlogo pri sidranju in fuziji, sodelujejo pa tudi pri regulaciji teh proteinov (ta vloga je sorodna prvi). Poleg tega imajo tudi strukturno vlogo, vplivajo na fizikalne lastnosti membrane, kot sta fluidnost in lokalna ukrivljenost (37).

Znano je, da so fosfoinozitidi nujno potrebni za od kalcija odvisno eksocitozo ter da sodelujejo v različnih fazah regulirane eksocitoze. Prvi dokazi, da je  $PIP_2$  ključen lipid pri pravi mešička na fuzijo, so stari že več kot dve desetletji. Takratne raziskave so pokazale, da razgraditev  $PIP_2$  z bakterijsko fosfolipazo C (PLC) onemogoči novim mešičkom, da se pripravijo na eksocitozo. Genetska manipulacija fosfatidilinozitol-4-fosfat-5-kinaze (eden od encimov, nujnih pri sintezi  $PIP_2$ ) povzroči spremenjeno vsebnost  $PIP_2$  v plazmalemi. Odsotnost tega encima je vzrok za zmanjšanje števila na eksocitozo pripravljenih mešičkov, kar jasno nakazuje pomembnost  $PIP_2$  pri tej fazi eksocitoze. Ob tem znižana koncentracija  $PIP_2$  povzroči tudi zakasnitev pri odpiranju fuzijske pore (39). Tudi uporaba si-RNA (angl. *small interfering RNA*), ki zniža nivo prepisovanja in posledično koncentracijo zgo-

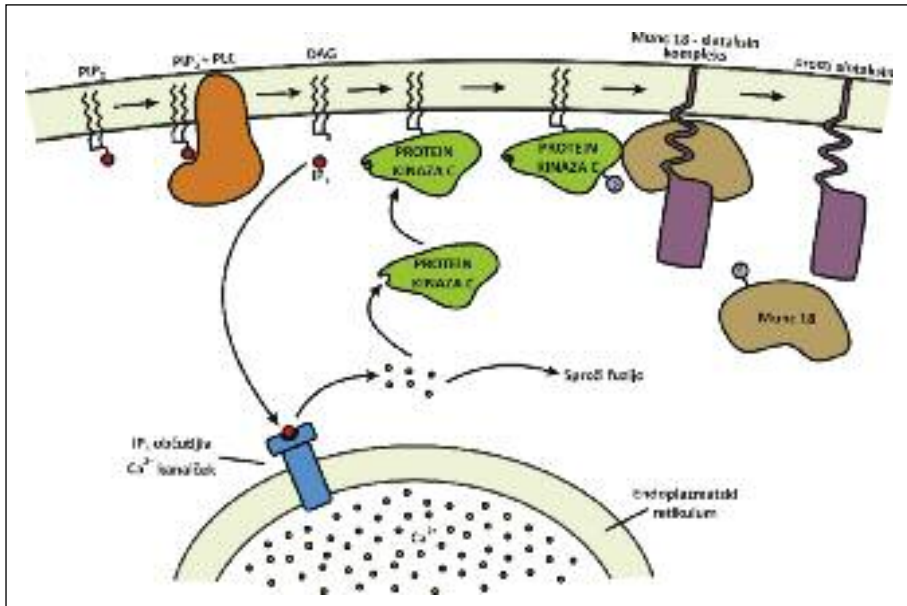
raj omenjene kinaze, zmanjša izločanje inzulina.

Podobno kot holesterol (glej poglavje o holesterolu) se tudi  $PIP_2$  samoorganizira v obliki lipidnih otočkov na plazmalemi (angl. *lipid clusters*). Če motimo nastanek takšne strukture, pride do inhibicije eksocitoze, kar dokazuje, da imajo otočki  $PIP_2$  v membrani pomembno funkcijo pri njeni regulaciji (41). Kljub vsemu pa vloga  $PIP_2$  pri pripravi mešičkov na fuzijo še ni čisto pojasnjena. Verjetno so otočki  $PIP_2$  vezavna mesta za proteine, ki sodelujejo pri regulirani eksocitozi. Znižanje koncentracije  $PIP_2$  torej zmanjša število vezavnih mest za te proteine, posledično pa pride do inhibicije priprave mešička na fuzijo in manj učinkovitega izločanja hormonov in neurotransmiterjev.

$PIP_2$  je pomemben tudi v naslednjem koraku eksocitoze – membranski fuziji. Zanimivo



Slika 3. Vpliv intrinzične ukrivljenosti različnih lipidov na fuzijsko poro. Primerjava pozitivno ukrivljenega fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata ( $PIP_2$ ) (A) in negativno ukrivljenega holesterola (B). Intrinzična ukrivljenost je definirana kot razmerje med premeroma glave in repnega dela lipida. Premer glave pri  $PIP_2$  je večji od premera repnega dela – pozitivna intrinzična ukrivljenost, obratno velja za holesterol – negativna intrinzična ukrivljenost. (C) Med nastankom fuzijske pore se notranji deli membrane (senčno modro) ukrivjajo močno negativno, zunanji pa močno pozitivno (senčno zeleno). Na mestih ukrivljenosti so zato potrebne lipidne molekule, ki so tudi same ukrivljene.



Slika 4. Vloga diacilglicerola (DAG) in inozitol trifosfata (IP<sub>3</sub>) pri eksocitozi. DAG, produkt hidrolize fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP<sub>2</sub>) s fosfolipazo C, ima vlogo sekundarnega obveščevalca. Aktivira protein kinazo C, ta pa fosforilira protein Munc 18-1 (angl. mammalian uncoordinated-18-1), zaradi česar se zmanjša njegova afiniteta do sintaksina-1, kar omogoči sestavljanje kompleksa SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Pri hidrolizi nastane tudi IP<sub>3</sub>, ki difundira do endoplazemskega/sarkoplazemskega retikuluma in povzroči znotrajcelični porast koncentracije Ca<sup>2+</sup>, to pa preko kalcij vezavnih proteinov sproži membransko fuzijo. PLC – fosfolipaza C.

je, da ima pri tem koraku negativno regulatorno vlogo – je inhibitor iniciacije fuzije. Na mestu fuzije mešička s plazmalemo najdemo relativno visoko koncentracijo PIP<sub>2</sub>, in sicer okoli 6% vseh lipidnih molekul (42). Ker je molekula PIP<sub>2</sub> pozitivno intrinzično ukrivljena, nasprotuje velikim negativnim ukrivitvam membrane, do katerih med fuzijo prihaja (slika 3). Poskusi kažejo, da se pred fuzijo koncentracija PIP<sub>2</sub> prehodno zniža, in sicer kot posledica aktivnosti PLC. Poleg PLC pa ima pomembno vlogo pri sekvestraciji PIP<sub>2</sub> tudi sintaksin-1. Mutacije jukstamembranskih domen sintaksina-1 namreč povečajo PIP<sub>2</sub> inhibicijo fuzije, iz česar lahko sklepamo, da so te domene sintaksina-1 odgovorne za sekvestracijo PIP<sub>2</sub>. Sintaksin torej sam spodbuja nastanek ukrivljenosti membrane, ki je ugodna za fuzijo (42).

Kakšna je torej vloga PIP<sub>2</sub> pri eksocitozi? James in sodelavci predlagajo dva mehanizma, s katerima PIP<sub>2</sub> uravnava eksocitozo (42). Prvi mehanizem je, kot zapisano, inhibitorni zaradi pozitivne intrinzične ukrivljenosti

PIP<sub>2</sub>. Z drugim mehanizmom pa PIP<sub>2</sub> močno spodbuja eksocitozo zaradi vezave določenih proteinov (*Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion* (CAPS), Rabphilin, sinaptotagmin), ki pa so pozitivni regulatorji eksocitoze.

PIP<sub>2</sub> je tudi donor DAG in IP<sub>3</sub>. Obe molekuli sta pomembna sekundarna obveščevalca v evkariontskih celicah in sta produkta razgradnje PIP<sub>2</sub> s PLC. IP<sub>3</sub> je vodotopen in v citoplazmi dobro mobilien. Hitro difundira do endoplazmatskega/sarkoplazmatskega retikuluma, kjer se veže na specifični receptor in povzroči vstop prostega Ca<sup>2+</sup> v citoplazmo (44). Prosti Ca<sup>2+</sup> se potem veže na od kalcija odvisne proteine (sinaptotagmine, kompleksine, protein-kinazo C), to pa posledično aktivira fuzijo mešička z membrano (slika 4).

### Sindrom Lowe

Sindrom Lowe ali okulocerebrorenalni sindrom je na kromosom X vezana recesivna bolezen. Zbolijo le moški, ženske so prenašalke. Fenotipsko se izraža z bilateralnimi kongeni-

talnimi kataraktami, mentalno zaostalostjo, neonatalno hipotonijo in renalnim Falconijevim sindromom (reabsorpcijski defekti v proksimalnem tubulu ledvic). Genotipsko gre za mutacijo inozitol-5-fosfataze, katere glavni substrat je  $PIP_2$ . Ker je mutirana, je manj učinkovita, posledično pride do povišane koncentracije  $PIP_2$ , kar povzroči motnje v kroženju membran, zlasti naj bi bila prizadeta od klatrina odvisna endocitoza (45).

DAG po delovanju encima PLC na  $PIP_2$  ostane v lipidnem dvosloju. Prosti DAG modulira delovanje več encimov, eden od njih je tudi od  $Ca^{2+}$  odvisna protein-kinaza C (PKC). Aktivirana PKC fosforilira protein Munc 18-1, zaradi česar se zmanjša njegova afiniteta do sintaksina, to pa omogoči sestavljanje proteinov SNARE in fuzijo (slika 4). DAG neposredno vpliva tudi na pripravo mešičkov na fuzijo (angl. *priming*), in sicer preko regulacije proteina Munc 13-1 (48). Mutacije Munc 13-1, ki preprečijo vezavo DAG, povzročijo smrt miši takoj po rojstvu. Študije na takšnih klonih so pokazale, da vezava DAG na protein Munc 13-1 omogoča celicam, da prilagodijo stopnjo priprave mešičkov na raven, ki ustreza trenutnim potrebam. Skratka, kaskada, ki aktivira encim PLC ter posledično poviša znotrajcelični  $Ca^{2+}$  in tako sproži fuzijo, prav tako poviša koncentracijo DAG v plazmalemi, ta pa z vezavo na Munc 13-1 prilagodi hitrost priprave mešičkov na fuzijo.

DAG ima tudi neposreden vpliv na fuzijo. Churchward in sodelavci so pokazali, da spodbuja fuzijo zaradi intrinzično negativno ukrivljene molekularne zgradbe (51). Nena zadnje pa je DAG pomemben intermediat v sintezi trigliceridov, glicerofosfolipidov in gliceroglikolipidov, ki so pomembni gradniki celičnih membran (52).

### **Anergija celic T (podaljšana ali ireverzibilna inaktivacija/ neodzivnost na lastne antigene)**

Diacilglicerol kinaze (DGK) so skupina encimov, ki katalizirajo konverzijo DAG v fosfatidno kislino. V nestimuliranih celicah je aktivnost DGK običajno nizka, kar omogoča porabo DAG v biosintetskih reakcijah. Ob aktivaciji DGK se poveča sinteza fosfatidne kisline, ki je prav tako bioaktivni lipid. DGK torej služijo kot neke vrste biostikala, ki določajo, kaj se bo zgodilo z membranskim DAG (53). Znano je, da

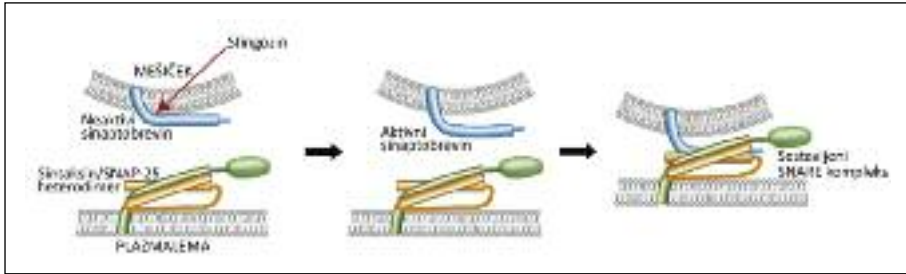
imajo anergične T-celice spremenjen metabolizem DAG. Šele pred kratkim pa so Olenchok in sodelavci pokazali, da prekomerna ekspresija ali inhibicija DGK- $\alpha$  povzroča defekt v receptorskem signaliziranju T-celic, kar je karakteristično za anergijo. Regulacija DAG metabolizma je torej kritična za odločitev, ali se bo ob stimulaciji T-celičnega receptorja zgodila aktivacija ali anergija celice (54). Tukaj se lahko upravičeno vprašamo, ali je spremenjena regulacija metabolizma DAG eden od dejavnikov, ki vodijo v avtoimunske bolezni.

## **SFINGOZIN**

Sfingozin je strukturna osnova sfingolipidov, ki so pomembni gradniki plazmaleme, zlasti membranskih splavov (55–57). Nastane po cepitvi ceramida s pomočjo ceramidaze (56). Običajno se nahaja v obliki sfingozin-1-fosfata, možna pa je tudi resinteza v ceramid (ceramid je eden od pomembnejših sfingolipidov v celični membrani). V vodi je sfingozin topen bolj od večine lipidov, kar mu omogoča prehod v citosol (59). Je potenten sekundarni obveščevalec in uravnava različne celične procese, med katere spadajo tudi rast, migracija in vzdražnost celic, sproščanje nevrotransmiterjev v živčnem sistemu ter inhibicija napestostno odvisnih kalcijevih kanalčkov (56, 60). Vpliva tudi na mobilizacijo znotrajcelične ravni kalcija, bodisi iz notranjih ali zunanjih zalog, kar je eden od glavnih sprožiteljev fuzije mešička z membrano (56, 61). Znotrajcelična koncentracija sfingozina je natančno uravnavana in se spreminja s starostjo. V mišjih možganih je ocenjena na  $0,5 \mu\text{M}$ , v podganjih hipofiznih celicah pa na okoli  $5 \mu\text{M}$ .

Na proces eksocitoze vpliva sfingozin na več posrednih in neposrednih načinov. Verjetno najpomembnejši neposredni način je aktivacija proteina VAMP na sinaptičnem mešičku (slika 5). Aktivirani protein VAMP lahko potem skupaj z drugimi proteini SNARE tvori kompleks SNARE, kar omogoči membranisko fuzijo. Poleg aktivacije proteina VAMP sfingozin vpliva tudi na elektrostatski potencial membranskega dvosloja, kar je ključno pri premagovanju elektrostatskih odbojnih sil pri približevanju membran pred fuzijo. Poskusi na živalih, kjer se protein VAMP ni izražal (Syb2 $^{-/-}$ ), so v nevronih pokazali izrazito





Slika 5. Shema delovanja sfingozina (58). Sfingozin, ki ga ceramida sprosti s hidrolizo ceramida, omogoči sprostitve adsorbirane/inhibiranega citoplazemskega dela sinaptobrevina, ki reagira s površinskimi naboji na površini membrane mešička. Sprostitve predstavlja korak, ki omogoči nadaljnjo interakcijo sinaptobrevina s sintaksin/SNAP-heterodimerom. SNAP – synaptosomal associated protein, SNARE – soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor.

zmanjšano stopnjo stimulirane eksocitoze. Dodatek sfingozina heterozigotnim nevronom (Syb2+/-) je povečal amplitudo posinaptičnih tokov, medtem ko pri nevronih (Syb2-/-) učinka po dodatku sfingozina niso opazili, kar nakazuje njegovo neposredno delovanje na protein VAMP. Sfingozin deluje tudi kot fiziološki regulator konformacije sintaksina-1 (glej poglavje o proteinih SNARE). Pospešuje povezovanje med proteinoma sintaksinom-1 in Munc-18. Protein Munc-18 se sicer veže na različne konformacijske oblike sintaksina-1, vendar je afiniteta vezave različna. S spremembo konformacije sintaksina-1 se poveča afiniteta vezave na protein Munc-18, kar posledično pospeši interakcijo. Raziskave kažejo, da povečana afiniteta proteina Munc-18 do proteina sintaksin-1 zmanjša število na plazmalemo pripetih mešičkov (angl. *docked vesicles*). Rezultati se skladajo z ugotovitvami, da je Munc-18 eden izmed proteinov, ki nadzira število na fuzijo pripravljenih mešičkov (angl. *ready releasable pool of vesicles*) (62). Mutacije, ki vodijo v kopičenje sfingozina, vodijo v patološka stanja.

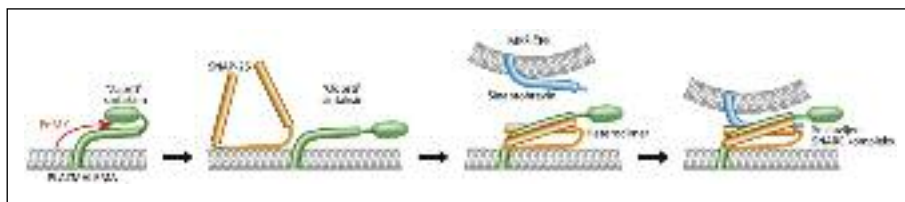
### Niemann-Pickova bolezen tipa A

Niemann-Pickova bolezen tipa A se pojavi zaradi mutacije in izgube funkcije v genu kisle sfingomielinaze. Kisla sfingomielinaza je encim, odgovoren za pretvorbo sfingomielina v ceramid v lizosomih. Njegova odsotnost povzroči kopičenje sfingomielina v teh organih, kar je značilnost Niemann-Pickove bolezni, posledično pa vodi do visoke koncentracije njegovega derivata, sfingozina. Povi-

šanje ravni sfingozina povzroči zmanjšanje števila na fuzijo pripravljenih mešičkov v primarnih nevronih (angl. *ready releasable pool*), kar se fenotipsko izrazi kot mentalna zaostalost (62).

### POLINENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE

Polinenasičene maščobne kisline (PnMK) opravljajo v celici veliko funkcij, med drugim so pomembne pri delovanju ionskih kanalčkov, funkciji citoskeleta in pri eksocitozi. Njihovo delovanje v regulaciji fuzije mešička še ni popolnoma raziskano (63). Pri vretenčarjih sta pomembna zlasti dva tipa PnMK, in sicer so to omega-6 (arahidonska) in omega-3 (dokosaheksaenska) maščobne kisline. Za PnMK je značilno, da jih ne moremo sintetizirati *de novo*, zato jih v telo vnašamo izključno z zaužitjem. PnMK so torej esencialne maščobne kisline (63). Omega-3 in omega-6 maščobne kisline imajo pomembno vlogo tudi pri razvoju in rasti nevronov, hkrati pa so tudi sestavni del fosfolipidnih membran (64, 65). Zaradi ugodnih biofizikalnih lastnosti vplivajo na ukrivljenost in fluidnost oziroma rigidnost bioloških membran. Mutacije s PnMK povezanimi encimi povzročijo mentalno zaostalost, kar nakazuje na pomembno vlogo PnMK pri delovanju nevronov (64, 66). Ne zadosten vnos PnMK med razvojem se izrazi z motenim razvojem možganov (67). Po drugi strani pa hrana, bogata s PnMK, vpliva na izražanje nekaj genov, med katerimi je



Slika 6. Vloga polinenasičene maščobne kisline (PnMK) pri eksocitozi (63). Glavna tarča PnMK je sintaksin v zaprti konformaciji. PnMK povzročijo konformacijsko spremembo sintaksina in tako omogočijo interakcijo s SNAP-25. SNAP – synaptosomal associated protein, SNARE – soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor.

tudi gen za protein Munc-18, kar nakazuje, da so PnMK povezane tudi s proteini SNARE.

Pred kratkim je Davletov s sodelavci pokazal, da dodatek arahidonske kisline sinaptični membrani pospeši formacijo kompleksa SNARE, najverjetneje preko aktivacije sintaksina. Podatek nakazuje, da PnMK spodbujajo eksocitozo (slika 6) (63). Kako torej arahidonska kislina pospešuje interakcije proteinov SNARE? Citosolni protein Munc-18 je glavni vezavni partner sintaksina. V kompleksu Munc 18-sintaksin-1 protein Munc-18 deluje kot »sponka« in drži sintaksin-1 v zaprti, neaktivni obliki. Najverjetneje upogljiva arahidonska kislina prodre v hidrofobne žlebe med vijačnice sintaksina, kar povzroči konformacijsko spremembo in omogoči nastanek kompleksa SNARE (slika 6) (29, 64). Princip delovanja arahidonske kisline je enak pri vseh izoblikah sintaksina, kar nakazuje na ohranjeno naravo delovanja arahidonske kisline.

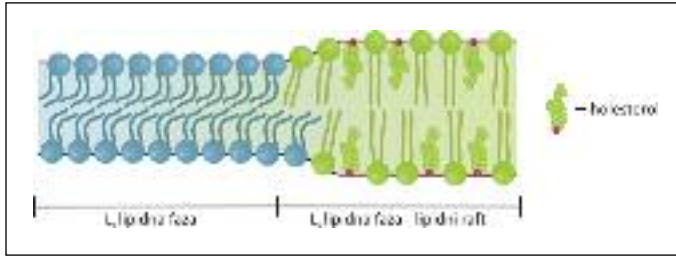
Sintaksin je transmembranski protein, lokaliziran na plazmalemi. Ta lokacija mu omogoči, da hitro zazna spremembe koncentracije arahidonske kisline. Za sproščanje arahidonske kisline iz membrane je odgovoren encim fosfolipaza A2. Do dovolj velikih sprememb v koncentraciji arahidonske kisline torej prihaja le v okolici fosfolipaze A2, kar omogoči specifično aktivacijo sintaksina v bližini tega encima (64). Sklepamo lahko, da poleg arahidonske kisline tudi fosfolipaza A2 igra pomembno vlogo v regulaciji eksocitoze. Poleg naštetega so PnMK tudi substrat za sintezo nekaterih bioaktivnih metabolitov (npr. prostaglandinov in eikozanoidov). Čeprav so sintaksini prikazani kot posredovalci delovanja PnMK v procesu eksocitoze, pa ne moremo izključiti morebitnega vpliva lokalnega lipidnega metabolizma tudi na ostale proteine, pomembne pri procesu eksocitoze.

## Znižana koncentracija polinenasičenih maščobnih kislin v krvi

Znižane koncentracije omega-3 ali omega-6 PnMK v krvi so bile opažene pri bolnikih z depresijo, bipolarno motnjo, shizofrenijo, otroško hiperaktivnostjo in avtizmom. Pri shizofreniji so opazili znižane koncentracije dokosaheksaenske in arahidonske kisline v krvnih lipidih. Na miših je bilo pokazano, da se ekstremno neravnovesje maščobnih kislin, npr. visoke ravni dokosaheksaenske kisline in nizke ravni omega-6 maščobnih kislin odraža v rastni zaostaloosti (67). Zmanjšan vnos omega-3 maščobnih kislin med razvojem se odraža tudi v različnih spremembah vidne funkcije pri različnih vrstah, PnMK naj bi namreč imele pomembno vlogo v razvoju retine (67, 71).

## HOLESTEROL

Celične membrane so sestavljene iz več kot 2.000 vrst lipidov, ki jih v grobem lahko delimo na fosfolipide, sfingolipide in sterole (72). V preteklosti so na te strukture gledali kot na tekoči dvodimenzionalni mozaik, v katerem plavajo proteini. Posledično bi to pomenilo, da so proteini v dvosloju enakomerno razporejeni ter dovzetni za hitro lateralno difuzijo, vendar pa zlasti novejši poskusi kažejo, da se lahko lipidni dvosloj nahaja v dveh različnih stanjih (73). Urejeno lipidno fazo (angl. *liquid-ordered*,  $L_o$ ) sestavljajo v glavnem sfingolipidi, nasičeni fosfolipidi in holesterol, medtem ko so glavna sestavina neurejene lipidne faze (angl. *liquid-disordered*,  $L_d$ ) fosfoglicerolipidi in PnMK (72). Razlike v lastnostih lipidnih faz so gonilna sila, ki poganja njihovo lateralno ločevanje. V literaturi se namesto  $L_o$ -lipidne faze pogosto uporablja izraza



Slika 7. Shema lipidnega splava (78). Lipidna neurejena faza (angl. liquid disordered,  $L_d$ ) membrane, sestavljena večinoma iz fosfo-glicerolipidov in polinenasičenih maščobnih kislin (senčeno modro), in lipidna urejena faza (angl. liquid ordered,  $L_o$ ) membrane oz. membranski splav, sestavljen v glavnem iz sfingolipidov, nasičenih fosfolipidov in holesterola (senčeno zeleno). Membranski splavi imajo pri eksocitozi pomembno vlogo. Trenutno sprejeta teorija namreč pravi, da so splavi mesta na plazmalemi, kjer prihaja do membranske fuzije, vendar pa naši poskusi tega ne podpirajo neposredno.

membranski splav (angl. raft) in s holesterolom bogate domene (angl. cholesterol-rich domains) (slika 7).

Pri nastanku membranskih splavov ima holesterol izjemno pomembno vlogo. Je glavna gonilna in podporna molekula procesa nastajanja splavov, obenem pa je njegova koncentracija glavni dejavnik, ki določa njegovo stabilnost in strukturo (74). Kljub dejstvu, da so membranski splavi relativno majhne (submikroskopske) strukture, pa imajo za eksocitozo velik pomen. Služijo namreč kot mesta za specifične proteinsko-lipidne reakcije, med drugim predstavljajo tudi sidrišča za določene fuzijske proteine (npr. proteine SNARE) in napetostno odvisne  $Ca^{2+}$ -kanale. Torej je verjetno, da so membranski splavi ali njihova neposredna okolica mesto na lipidnem dvo-sloju, kjer prihaja do fuzijskih dogodkov.

Manipulacija celične koncentracije holesterola ima dramatičen učinek na eksocitozo. Metil-beta-ciklodekstrin (MBCD), specifični vezalec holesterola, je sposoben znižati koncentracijo holesterola v plazmalemi ter posledično porušiti strukturo membranskih splavov. Temu sledi razkropitev kritičnih proteinskih in lipidnih komponent fuzijskega ustroja, kar vodi v zmanjšano stopnjo eksocitoze (80). MBCD povzroči dozno odvisno inhibicijo fuzije ter občutljivost fuzije za prosti  $Ca^{2+}$  (to pomeni, da je za enak obseg eksocitoze potrebna višja koncentracija prostega  $Ca^{2+}$ ). Zanimivo je, da lahko z dodajanjem eksogenega holesterola ali holesterolu podobnih lipidnih molekul stopnjo fuzije izboljšamo ali celo popolnoma odpravimo

učinek MBCD. Lipidi z enako ali večjo negativno intrinzično ukrivljenostjo (npr.  $\alpha$ -tokoferol) povrnejo sposobnost fuzije, ne pa tudi občutljivost do prostega  $Ca^{2+}$ . Le dodatek eksogenega holesterola povrne tako sposobnost kot tudi učinkovitost fuzije (51). Iz tega lahko sklepamo, da je od  $Ca^{2+}$ -odvisna fuzija odvisna od celovitosti membranskih splavov, najverjetneje zaradi potrebe po prostorski organizaciji proteinov na fuzijskem mestu (82).

Holesterol vpliva na fuzijo membran tudi neposredno, in sicer preko modulacije fizikalnih lastnosti membrane, kot sta fluidnost in/ali ukrivljenost (83). Churchward in sodelavci so pokazali, da lahko z nadomestitvijo holesterola v membrani z dioleoilglicerolom (lipid, ki ima dvakrat višjo negativno intrinzično ukrivljenost) popolnoma rešimo sposobnost fuzije in da za to potrebujemo samo polovico molarne množine, medtem ko z molekulami, ki imajo ukrivljenost manjšo od holesterola, fuzije ni možno rekonstruirati (slika 3) (51). Sklepamo lahko, da je za fuzijo potrebna ustrezna koncentracija intrinzično negativno ukrivljenih molekul, katerih ukrivljenost je enaka ali večja od holesterola. To omogoči nastanek visoko negativno ukrivljenih struktur, ki so potrebne za nastanek fuzijske pore (slika 3) (11). Poleg vsega napisanega pa lahko holesterol, kot ligand ali kofaktor, neposredno modulira delovanje aktivnosti proteinov, nujnih pri fuziji (84). Eden od takšnih primerov je interakcija med sinaptofizinom in proteinom VAMP, ki je odvisna od koncentracije holesterola na mestu fuzije.

## Niemann-Pickova bolezen tipa C1

Za Nieman-Pickovo bolezen tipa C1 je značilna izguba funkcije proteina NPC1, ki je integralni protein membrane in deluje kot transportni protein holesterola v postlizosomalne strukture. Celice brez proteina NPC1 izražajo okvaro transporta holesterola iz poznih endosomov in lizosomov. V nevronih se bolezen izraža kot znižana koncentracija holesterola v distalnih aksonih, verjetno zaradi zmanjšane transporta. Posledično pride do napredujoče izgube aksonov in kopičenja neesterificiranega holesterola v endocitotski poti, kar se klinično kaže kot napredujoča bolezen z nevrodegenerativnimi simptomi (cerebelarna ataksija, disartrija, disfagija, distonija itn.), okvaro jeter in prezgodnjo smrtjo (povprečje okoli 16 let) (86, 87).

## ZAKLJUČEK

V zadnjih desetletjih se je znanstveni pogled na vlogo lipidov v procesu eksocitoze, zlasti pri membranski fuziji, korenito spremenil. Lipidi so postali enakovredni dejavniki, ki na eksocitozo vplivajo preko dveh glavnih mehanizmov. Pri prvem gre za interakcije s proteini, ki sodelujejo v eksocitozi, z drugim mehanizmom pa lipidi neposredno vplivajo na lastnosti membrane, kot sta fluidnost in lokalna ukrivljenost, in tako spodbujajo ali inhibirajo membransko fuzijo. Kljub očitnemu napredku pri razumevanju teh interakcij pa ostaja še veliko odprtih vprašanj, zlasti na molekularski ravni, na rešitev katerih pa bo potrebno še malo počakati.

## LITERATURA

1. Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 1975; 189 (4206): 867.
2. Gerber SH, Südhof TC. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. 2002; 51 Suppl 1: S3–11.
3. Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol*. 1987; 3: 243–93.
4. Kozlovsky Y, Chernomordik LV, Kozlov MM. Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J*. 2002; 83 (5): 2634–51.
5. Rituper B, Zorec R, Davletov B. Lipid-protein interactions in exocytotic release of hormones and neurotransmitters. *Clinical Lipidology*. 2010; 5 (5): 747–61.
6. Lang T, Halemani ND, Rammner B. Interplay between lipids and the proteinaceous membrane fusion machinery. *Prog Lipid Res*. 2008; 47 (6): 461–9.
7. Rohrbough J, Broadie K. Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6 (2): 139–50.
8. Williams D, Vicogne J, Zaitseva I, et al. Evidence that electrostatic interactions between vesicle-associated membrane protein 2 and acidic phospholipids may modulate the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2009; 20 (23): 4910–9.
9. Kinnunen PK, Holopainen JM. Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Rep*. 2000; 20 (6): 465–82.
10. Lam AD, Tryoen-Toth P, Tsai B, et al. SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell*. 2008; 19 (2): 485–97.
11. Jorgacevski J, Fosnaric M, Vardjan N, et al. Fusion pore stability of peptidergic vesicles. *Mol Membr Biol*. 2010; 27 (2–3): 65–80.
12. Fernandez JM, Neher E, Gomperts BD. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature*. 1984; 312 (5993): 453–5.
13. Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, et al. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol*. 1994; 4 (1): 1–4.
14. Zorec R, Sikdar SK, Mason WT. Increased cytosolic calcium stimulates exocytosis in bovine lactotrophs. Direct evidence from changes in membrane capacitance. *J Gen Physiol*. 1991; 97 (3): 473–97.
15. Stenovec M, Kreft M, Poberaj I, et al. Slow spontaneous secretion from single large dense-core vesicles monitored in neuroendocrine cells. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1270–2.
16. Jahn R, Scheller RH. SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7 (9): 631–43.

17. Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1744 (3): 493–517.
18. Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, et al. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 1993; 75 (3): 409–18.
19. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, et al. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (26): 15781–6.
20. Breckenridge LJ, Almers W. Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84 (7): 1945–9.
21. An SJ, Grabner CP, Zenisek D. Real-time visualization of complexin during single exocytic events. *Nat Neurosci*. 2010; 13 (5): 577–83.
22. Van den Bogaart G, Holt MG, Bunt G, et al. One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17 (3): 358–64.
23. Mohrmann R, de Wit H, Verhage M, et al. Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. *Science*. 2010; 330 (6003): 502–5.
24. Berginc-Dolenšek A, Ožek B, Starič F, et al. Botulizem. *Zdrav Vestn*. 2004; 73: 877–83.
25. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 1992; 359 (6398): 832–5.
26. Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, et al. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J*. 1993; 12 (12): 4821–8.
27. Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, et al. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J Biol Chem*. 1994; 269 (32): 20213–6.
28. Toonen RF, Verhage M. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol*. 2003; 13 (4): 177–86.
29. Connell E, Darios F, Broersen K, et al. Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. *EMBO Rep*. 2007; 8 (4): 414–9.
30. Graham ME, Barclay JW, Burgoyne RD. Syntaxin/Munc18 interactions in the late events during vesicle fusion and release in exocytosis. *J Biol Chem*. 2004; 279 (31): 32751–60.
31. Rickman C, Medine CN, Bergmann A, et al. Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction. *J Biol Chem*. 2007; 282 (16): 12097–103.
32. Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, et al. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (8): 2697–702.
33. Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, et al. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron*. 2001; 29 (1): 131–43.
34. Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, et al. Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (13): 9037–42.
35. Guan R, Dai H, Rizo J. Binding of the Munc13-1 MUN domain to membrane-anchored SNARE complexes. *Biochemistry*. 2008; 47 (6): 1474–81.
36. Corvera S, D'arrigo A, Stenmark H. Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11 (4): 460–5.
37. Poccia D, Larijani B. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem J*. 2009; 418 (2): 233–46.
38. Eberhard DA, Cooper CL, Low MG, et al. Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase c and removal of ATP. *Biochem J*. 1990; 268 (1): 15–25.
39. Gong LW, Di Paolo G, Diaz E, et al. Phosphatidylinositol phosphate kinase type Iγ regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (14): 5204–9.
40. Waselle L, Gerona RR, Vitale N, et al. Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol*. 2005; 19 (12): 3097–106.
41. Aikawa Y, Martin TF. ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol*. 2003; 162 (4): 647–59.
42. James DJ, Khodthong C, Kowalchuk JA, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol*. 2008; 182 (2): 355–66.
43. Hammond GR, Dove SK, Nicol A, et al. Elimination of plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is required for exocytosis from mast cells. *J Cell Sci*. 2006; 119 (Pt 10): 2084–94.
44. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, et al. Calcium signalling – an overview. *Semin Cell Dev Biol*. 2001; 12 (1): 3–10.
45. Mccrea HJ, De Camilli P. Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24: 8–16.
46. Craig TJ, Evans GJ, Morgan A. Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313. *J Neurochem*. 2003; 86 (6): 1450–7.
47. Barclay JW, Craig TJ, Fisher RJ, et al. Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem*. 2003; 278 (12): 10538–45.

48. Bauer CS, Woolley RJ, Teschemacher AG, et al. Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *J Neurosci.* 2007; 27 (1): 212–9.
49. Rhee JS, Betz A, Pyott S, et al. Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell.* 2002; 108 (1): 121–33.
50. Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, et al. Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron.* 2002; 33 (3): 411–24.
51. Churchward MA, Rogasevskaia T, Brandman DM, et al. Specific lipids supply critical negative spontaneous curvature – an essential component of native Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane fusion. *Biophys J.* 2008; 94 (10): 3976–86.
52. Brose N, Rosenmund C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 23): 4399–411.
53. Merida I, Avila-Flores A, Merino E. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem J.* 2008; 409 (1): 1–18.
54. Olenchock BA, Guo R, Carpenter JH, et al. Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat Immunol.* 2006; 7 (11): 1174–81.
55. Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (17): 2270–84.
56. Colombaioni L, Garcia-Gil M. Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 46 (3): 328–55.
57. Posse De Chaves EI. Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758 (12): 1995–2015.
58. Darios F, Wasser C, Shakirzyanova A, et al. Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron.* 2009; 62 (5): 683–94.
59. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9 (2): 139–50.
60. Titievsky A, Titievskaya I, Pasternack M, et al. Sphingosine inhibits voltage-operated calcium channels in GH4C1 cells. *J Biol Chem.* 1998; 273 (1): 242–7.
61. Zorec R. Calcium signaling and secretion in pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab.* 1996; 7 (10): 384–8.
62. Camoletto PG, Vara H, Morando L, et al. Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18. *PLoS One.* 2009; 4 (4): e5310.
63. Darios F, Connell E, Davletov B. Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol.* 2007; 585 (Pt 3): 699–704.
64. Darios F, Davletov B. Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature.* 2006; 440 (7085): 813–7.
65. Svennerholm L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res.* 1968; 9 (5): 570–9.
66. Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, et al. *FACL4*, encoding fatty acid-Coa ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 2002; 30 (4): 436–40.
67. Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61 (1): 61–9.
68. Barceló-Coblijn G, Kitajka K, Puskas LG, et al. Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1632 (1–3): 72–9.
69. Rickman C, Davletov B. Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. *Chem Biol.* 2005; 12 (5): 545–53.
70. Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, et al. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev.* 2004; 44 (6): 509–38.
71. Agbaga MP, Mandal MN, Anderson RE. Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J Lipid Res.* 2010; 51 (7): 1624–42.
72. Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 426 (2): 208–24.
73. Wiśniewska A, Draus J, Subczynski WK. Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. *Cell Mol Biol Lett.* 2003; 8 (1): 147–59.
74. Silvius JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1610 (2): 174–83.
75. Lindner R, Naim HY. Domains in biological membranes. *Exp Cell Res.* 2009; 315 (17): 2871–8.
76. Lang T, Bruns D, Wenzel D, et al. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 2001; 20 (9): 2202–13.
77. Xia F, Gao X, Kwan E, et al. Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem.* 2004; 279 (23): 24685–91.
78. Goncalves PP, Stenovec M, Chowdhury HH, et al. Prolactin secretion sites contain syntaxin-1 and differ from ganglioside monosialic acid rafts in rat lactotrophs. *Endocrinology.* 2008; 149 (10): 4948–57.

79. Salaün C, James JJ, Chamberlain LH. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*. 2004; 5 (4): 255–64.
80. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, et al. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*. 1997; 38 (11): 2264–72.
81. Churchward MA, Rogasevskaia T, Höfgen J, et al. Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane fusion. *J Cell Sci*. 2005; 118 (Pt 20): 4833–48.
82. Furber KL, Churchward MA, Rogasevskaia TP, et al. Identifying critical components of native Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane fusion. Integrating studies of proteins and lipids. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1152: 121–34.
83. Dufourc EJ. Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol*. 2008; 1 (1–4): 63–77.
84. Churchward MA, Coorsen JR. Cholesterol, regulated exocytosis and the physiological fusion machine. *Biochem J*. 2009; 423 (1): 1–14.
85. Mitter D, Reisinger C, Hinz B, et al. The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J Neurochem*. 2003; 84 (1): 35–42.
86. Wasser CR, Ertunc M, Liu X, et al. Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *J Physiol*. 2007; 579 (Pt 2): 413–29.
87. Rimkunas VM, Graham MJ, Crooke RM, et al. TNF- $\alpha$  plays a role in hepatocyte apoptosis in Niemann-pick type C liver disease. *J Lipid Res*. 2009; 50 (2): 327–33.

Prispelo 22.2.2011