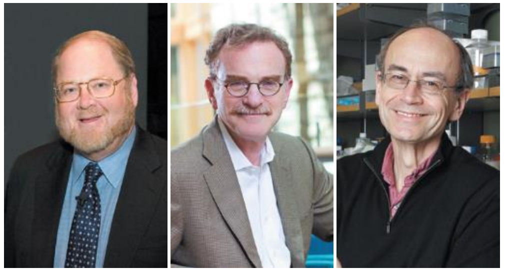
Публичная лекция

Институт цитологии
и генетики СО РАН

30 октября 2013 16.00



Клеточная почта

за что Ротман, Шекман и Зюдхоф
получили Нобелевскую премию
по физиологии и медицине

Сергей Седых (ИХБФМ СО РАН)

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2013

«За исследования регуляции транспорта везикул, основной транспортной системы в клетках»

Медаль Ласкера за исследования в области фундаментальной медицины

- Шекман и Ротман – 2002
- Зюдхоф – 2013 (за работы по высвобождению нейромедиаторов)

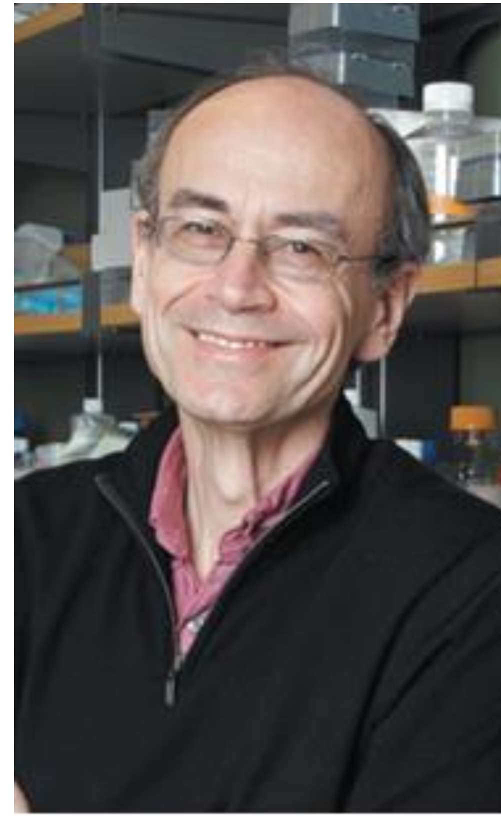
Джеймс Ротман

Йельский Университет, Коннектикут

Рэнди Шекман

Калифорнийский Университет в Беркли, Калифорния

Редактор PNAS
с 2006 по 2011



Кристиан Зюдхоф

Стэнфордский Университет, Калифорния

Состояние науки на конец 1970х

- везикулы принимают участие в транспорте веществ в клетке (Palade, 1975)
- не выделены белки, необходимые для организации секреторных процессов
- недостаточно отработаны генетические подходы, в том числе молекулярного клонирования
- *Saccharomyces cerevisiae* секретирует гликопротеины (Van Rijn, 1972)
- ультраструктура некоторых внутриклеточных органоидов секреторного цикла млекопитающих (Linnemans, 1974)

Работы Ротмана и Шекмана

- начали исследования в конце 1970х
- изучали
  - как образуются везикулы
  - откуда везикулы знают, куда идти в клетке
  - как везикулы сливаются с другими мембранами

Работы Ротмана

- Биохимическая методология
  - процессы жизненного пути аппарата Гольджи *in vitro*
  - в бесклеточной системе выделил белки, которые помогали везикулам отделяться от одной мембраны и сливаться с другой
  - **NSF*** – белок, необходимый для слияния везикул с мембранами
  - выделяли белки из экстрактов клеток млекопитающих, зараженных вирусом, который использует систему везикулярного транспорта

*NSF – N-ethylmaleimide sensitive fusion protein

Работы Шекмана

- Генетический подход
  - мутантные штаммы S. cerevisiae, в которых секретируемые белки не выходили из клетки
  - 23 «секреторных гена», продукты которых участвовали в разных стадиях трансмембранного транспорта (один из этих генов кодировал **NSF**)

Работы Ротмана и Шекмана

- начали исследования в конце 1970х
- изучали
  - как образуются везикулы
  - откуда везикулы знают, куда идти в клетке
  - как везикулы сливаются с другими мембранами
- системы внутриклеточного транспорта у дрожжей и человека устроены одинаковым образом
- описали механизмы слияния везикул, в которых белки везикул и мембран узнают друг друга как «ключ и замок»

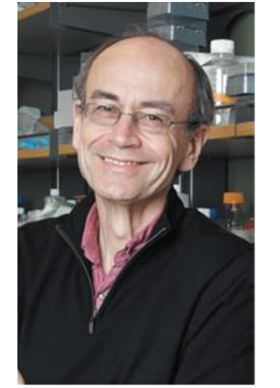
Работы Ротмана и Зюдхофа

- Ротман и Золлнер выделили белки SNARE*, в 1993 году показали, что SNARE находятся и на мембране везикулы, и на мембране-мишени, что определяет судьбу везикулы
- Зюдхоф давно работал с белками SNARE, выяснял их роль в высвобождении нейромедиаторов синпасами

- Schekman «Our work surprisingly converged»

* SNARE – Soluble **NSF** Attachment Protein REceptor

Работы Зюдхофа



- изучал холестерин в лаборатории Брауна и Гольдштейна (получили Нобелевскую премию в 1985 году за рецептор ЛПНП)
- изучал высвобождение нейромедиаторов, выделил ключевые белки, которые
  - доставляют везикулы с нейромедиатором к внешней мембране нейрона
  - вызывают слияние с синаптической мембраной под действием ионов кальция
- 2010 – премия Кавли в области неврологии (Зюдхов, Шеллер, Ротман)
- 2014 – премия Ласкера за основополагающие исследования в области фундаментальных медицинских наук (Шеллер, Зюдхов)

Джеймс Ротман

228 статей
37000+ цитирований

h-index **99**

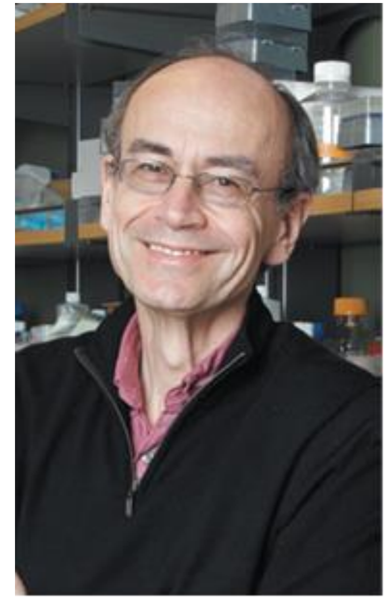
Most cited – **2172, 1863**

Рэнди Шекман

260 статей
24000+ цитирований

h-index **90**

Most cited – **1220, 1156**



Кристиан Зюдхоф

524 статьи
58000+ цитирований

h-index **134**

Most cited – **1620, 1056**

Работы Шекмана: PNAS, 1979

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 76, No. 4, pp. 1858–1862, April 1979
Cell Biology

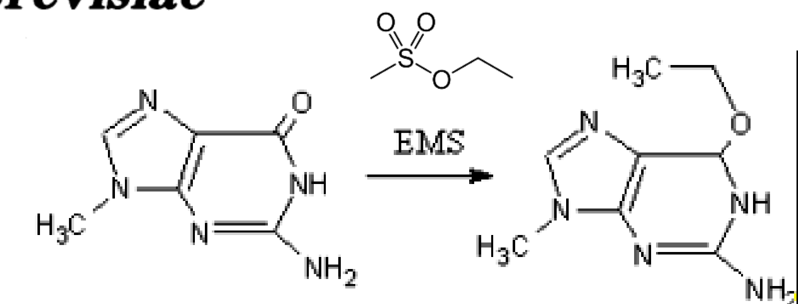
Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*

(secretory mutants/vesicles/membrane assembly)

PETER NOVICK AND RANDY SCHEKMAN

Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, California 94720

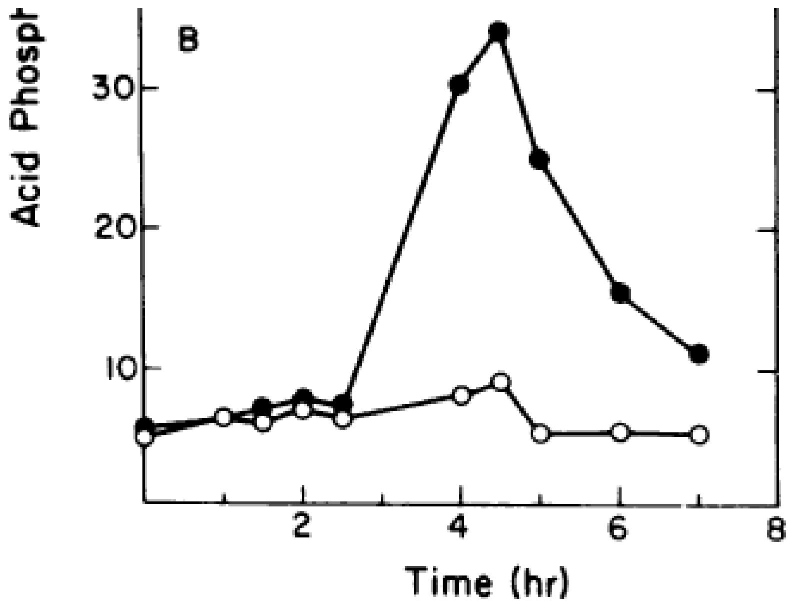
Communicated by Daniel E. Koshland, Jr., January 16, 1979



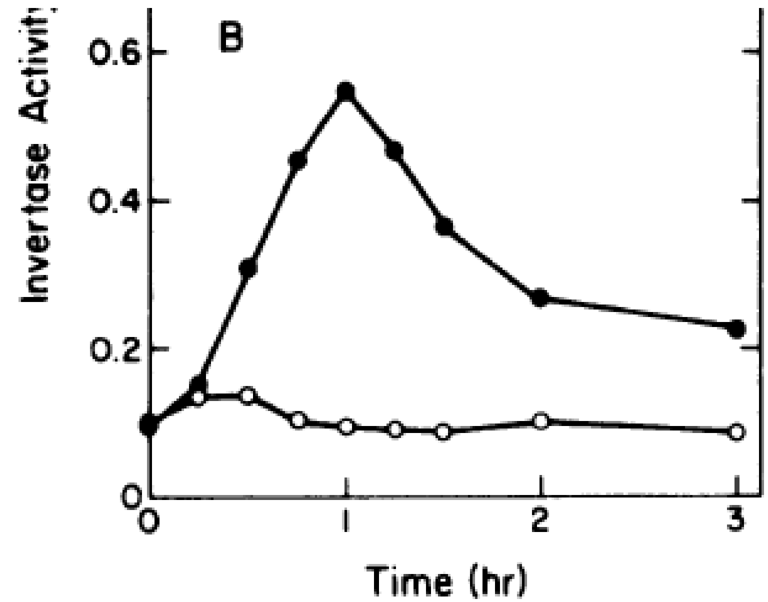
- S. cerevisiae
  - штамм A137 – экспрессирующий кислую фосфатазу
  - коллекционный штамм X2180-1A обрабатывали 3% этилметансульфонатом, вызывающим алкилирование гуанина
  - отбирали температуро-чувствительные клетки, секретирующие кислую фосфатазу (фермент, секретирующийся в плазматическую мембрану)

Накопление секреторных белков при повышении температуры

кислая фосфатаза



инвертаза

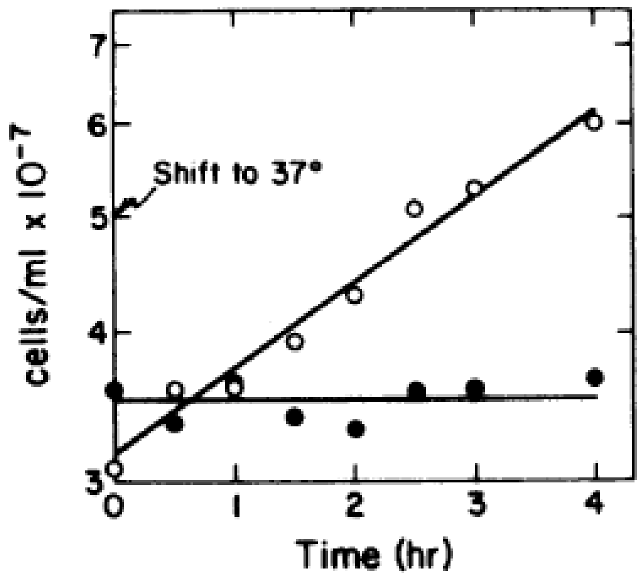


Активность ферментов в цитоплазме клетки

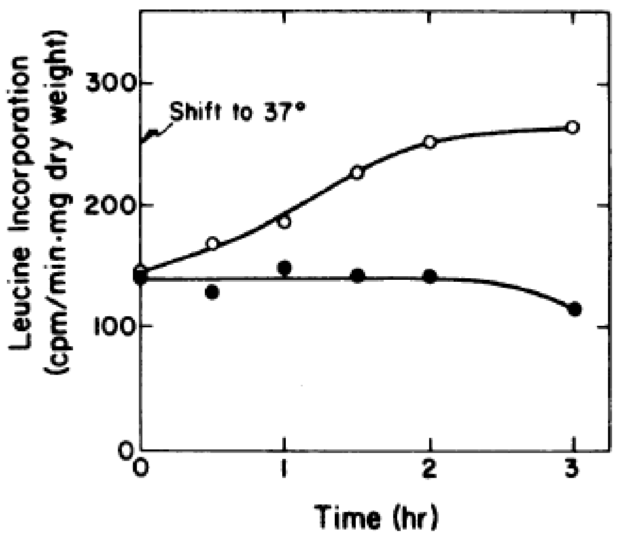
● мутантные клетки ○ штамм дикого типа

Деление клеток останавливается, но синтез белка продолжается

деление клеток



биосинтез белка



● мутантные клетки

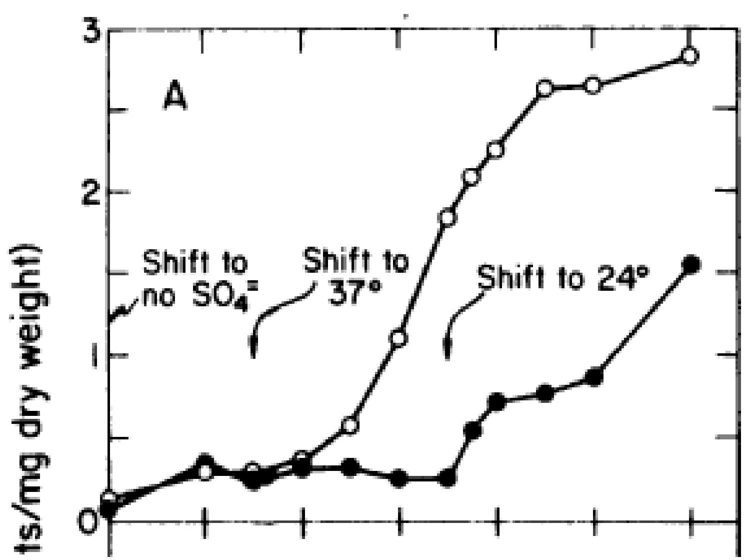
○ штамм дикого типа

Влияние везикулярного транспорта на рост плазматической мембраны

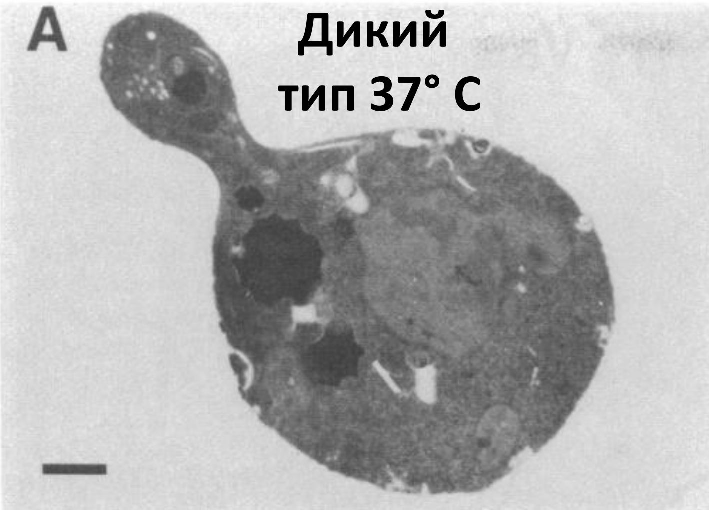
Встраивание пермеазы сульфата

● мутантные клетки

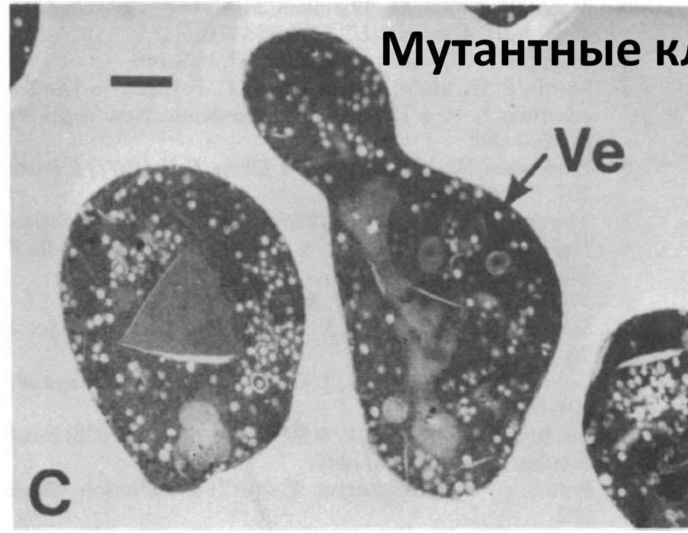
○ штамм дикого типа



Накопление везикул в клетках мутантного штамма при 37°

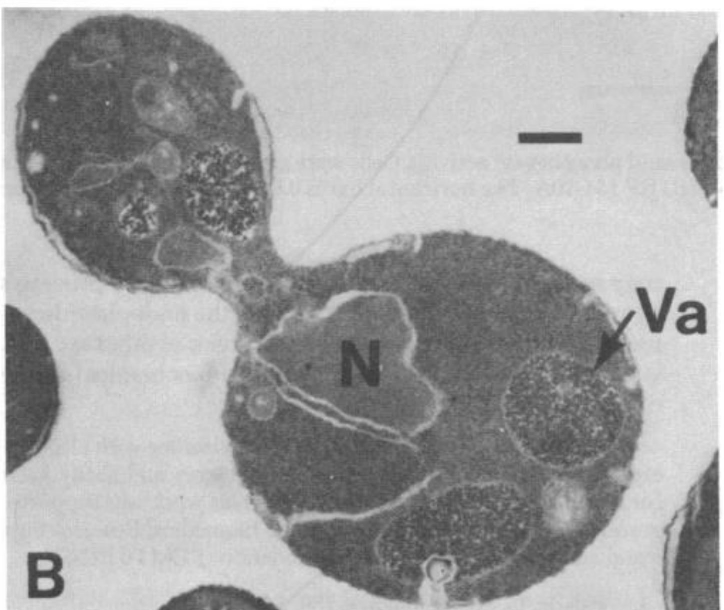


Дикий тип 37° C

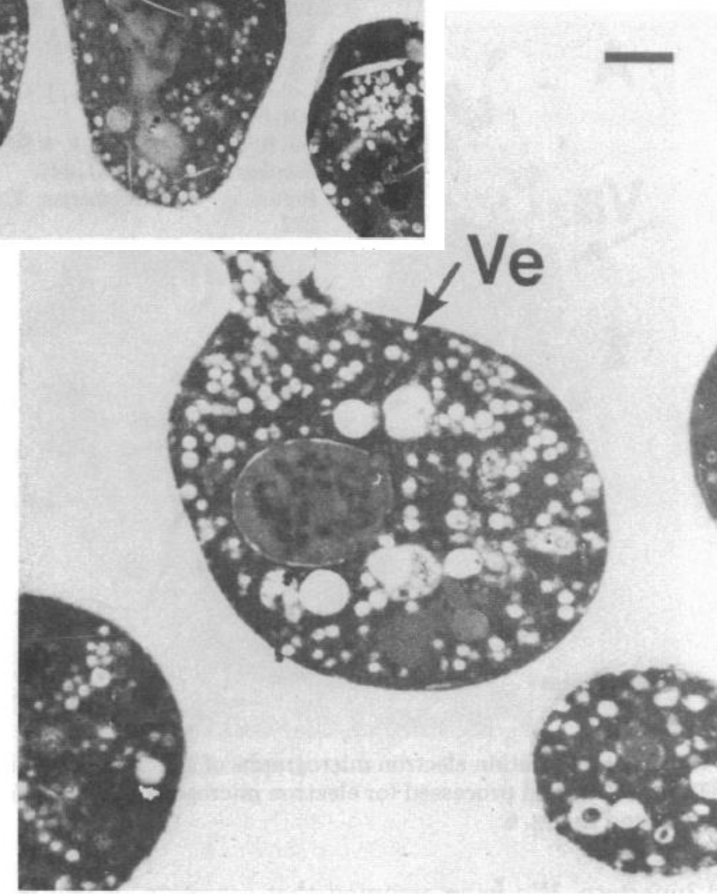


Мутантные клетки, 37° C, 1 час

. USA 76 (1979) 1861



Мутантные клетки, 24° C



Мутантные клетки, 37° C, 3 часа

Накопление кислой фосфатазы в везикулах

Нормальный ген кислой фосфатазы

Дефектный ген

1862 Cell Biology: Novick and Schekman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979)

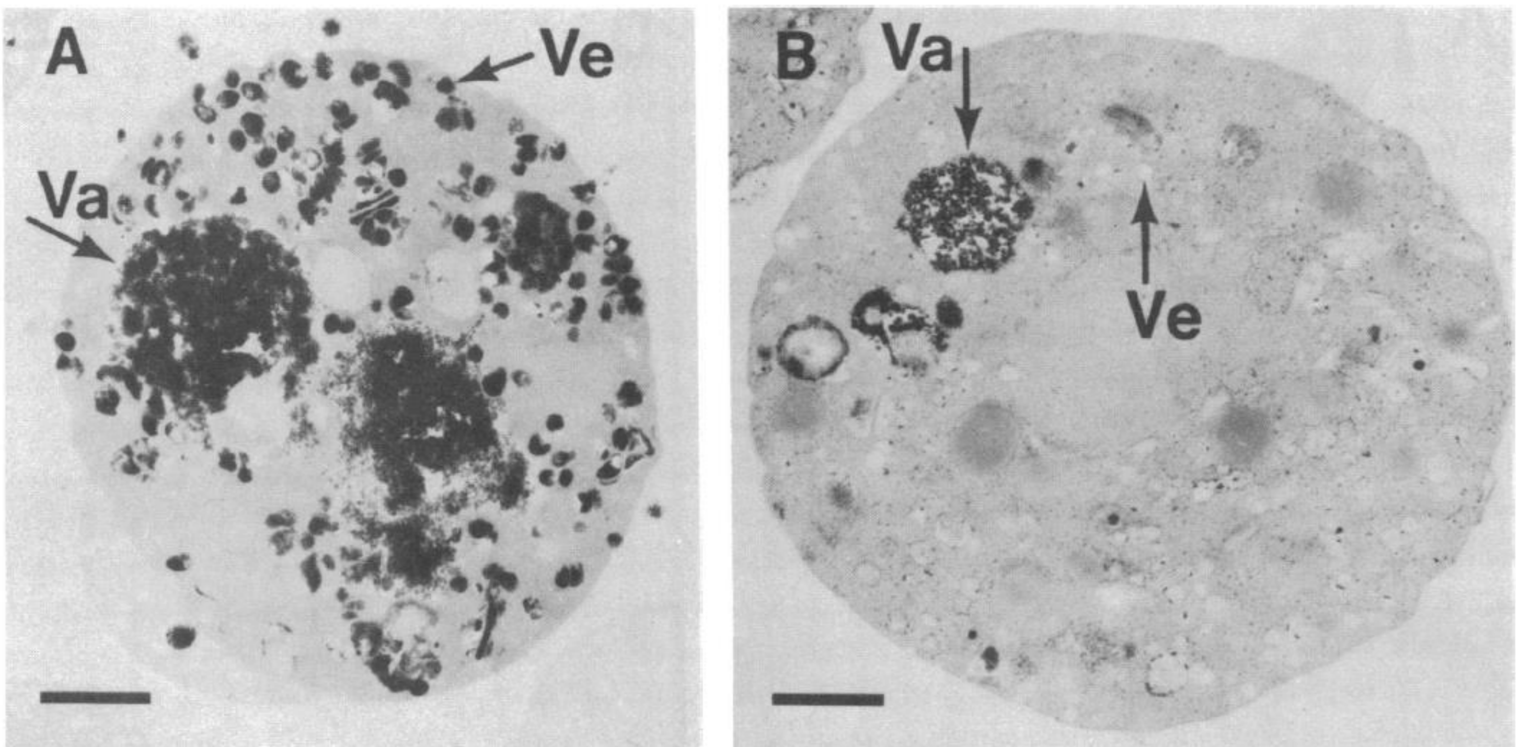


FIG. 7. Thin-section electron micrographs of spheroplasts stained for acid phosphatase activity. Cells were grown in YPD medium, warmed to 37°C for 2 hr, and processed for electron microscopy. (*A*) SF 150-5c; (*B*) SF 154-10A. The horizontal bar is 0.5 μm. Symbols are as described in the legend to Fig. 6.

Novick, Schekman – PNAS, 1979

- разработан генетический подход к изучению секреторных процессов у дрожжей
- при рестриктивной температуре у секреторных мутантов
  - прекращается деление
  - накапливаются секреторные везикулы
- везикулы являются интермедиатами секреторных процессов, прекурсорами плазматической мембраны, их содержимое – прекурсором секретируемых белков

Работы Шекмана: 23 гена секреторного пути (Cell, 1980)

Cell, Vol. 21, 205–215, August 1980, Copyright © 1980 by MIT

Identification of 23 Complementation Groups Required for Post-translational Events in the Yeast Secretory Pathway

Peter Novick, Charles Field and Randy Schekman*
Department of Biochemistry
University of California, Berkeley
Berkeley, California 94720

sis pathways, both in identifying intermediate structures and in providing biochemical assays for assembly steps (Wood and King, 1979). We believe that a similar approach may be useful in unraveling a eucaryotic morphogenesis pathway.

23 Genes, 23 Years Later (Cell, 2004)

Table 1. The Function of the Original SEC Genes

Gene	Gene Product Function	Transport Stage	Reference
SEC1	SNARE binding protein	Fusion of secretory vesicles to PM	Carr et al., 1999
SEC2	Exchange protein for Sec4p	Delivery of secretory vesicles to PM	Walch-Solimena et al., 1997
SEC3	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC4	Rab GTPase	Delivery of secretory vesicles to PM	Salminen and Novick, 1987
SEC5	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC6	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC7	Exchange protein for Arf	Vesicle budding from Golgi	Sata et al., 1998
SEC8	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC9	t-SNARE	Fusion of secretory vesicles to PM	Brennwald et al., 1994
SEC10	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC11	Component of signal peptidase	Exit of certain proteins from ER	Böhni et al., 1988
SEC12	Exchange protein for Sar1p	Vesicle budding from ER	Barlowe and Schekman, 1993
SEC13	Component of COP II coat	Vesicle budding from ER	Barlowe et al., 1994
SEC14	PI/PC transfer protein	Vesicle budding from Golgi	Bankaitis et al., 1990
SEC15	Component of exocyst complex	Tethering of secretory vesicles to PM	TerBush et al., 1996
SEC16	Scaffold protein at ER exit site	Vesicle budding from ER	Espenshade et al., 1995
SEC17	SNARE recycling, α-SNAP	Vesicle fusion, multiple stages	Griff et al., 1992
SEC18	SNARE recycling, NSF	Vesicle fusion, multiple stages	Wilson et al., 1989
SEC19	Rab recycling, GDI	Vesicle delivery, multiple stages	Garrett et al., 1994
SEC20	Component of tethering complex	Tethering of Golgi to ER vesicles	Lewis et al., 1997
SEC21	Component of COP I coat	Budding of Golgi to ER vesicles	Hosobuchi et al., 1992
SEC22	v-SNARE	Fusion of ER to Golgi vesicles	Lian et al., 1994
SEC23	Sar1 GTPase activating protein; component of COP II coat	Vesicle budding from ER	Yoshihisa et al., 1993; Barlowe et al., 1994

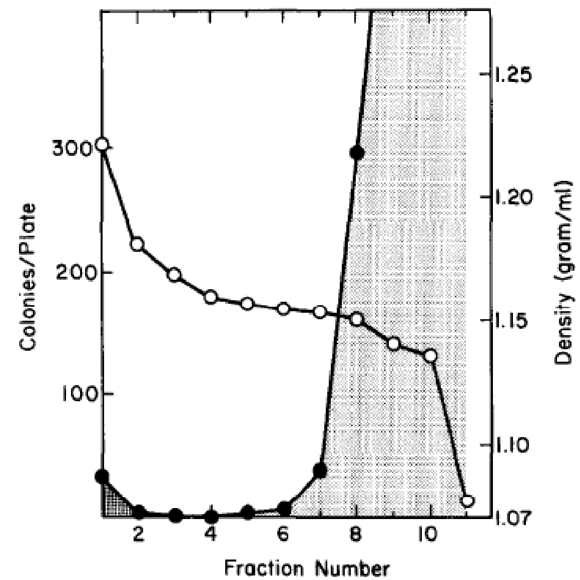


Figure 1. Density Gradient Separation of *sec*1-1 and X2180 Cells

SF150-5C and X2180-1A cells were grown in YPD medium at 25°C. After 3 hr at 37°C, the cells were sedimented, washed and resuspended in 1 ml of water. Cell aliquots were mixed (49.5 A_{600} units of X2180 and 0.5 A_{600} unit of SF150-5C) and sedimented on a Ludox gradient. Fractions were collected and diluted 10^4 fold, and 0.1 ml portions were spread on minimal medium (7 mM phosphate) agar plates. Colonies formed after 2 days at room temperature were stained for acid phosphatase activity (Hansche et al., 1978). Heavy stippling represents the phosphatase-constitutive (*pho*80) *sec*1 colonies (SF150-5C); light stippling represents phosphatase-repressed colonies (X2180).

Работы Шекмана: Cell, 1990

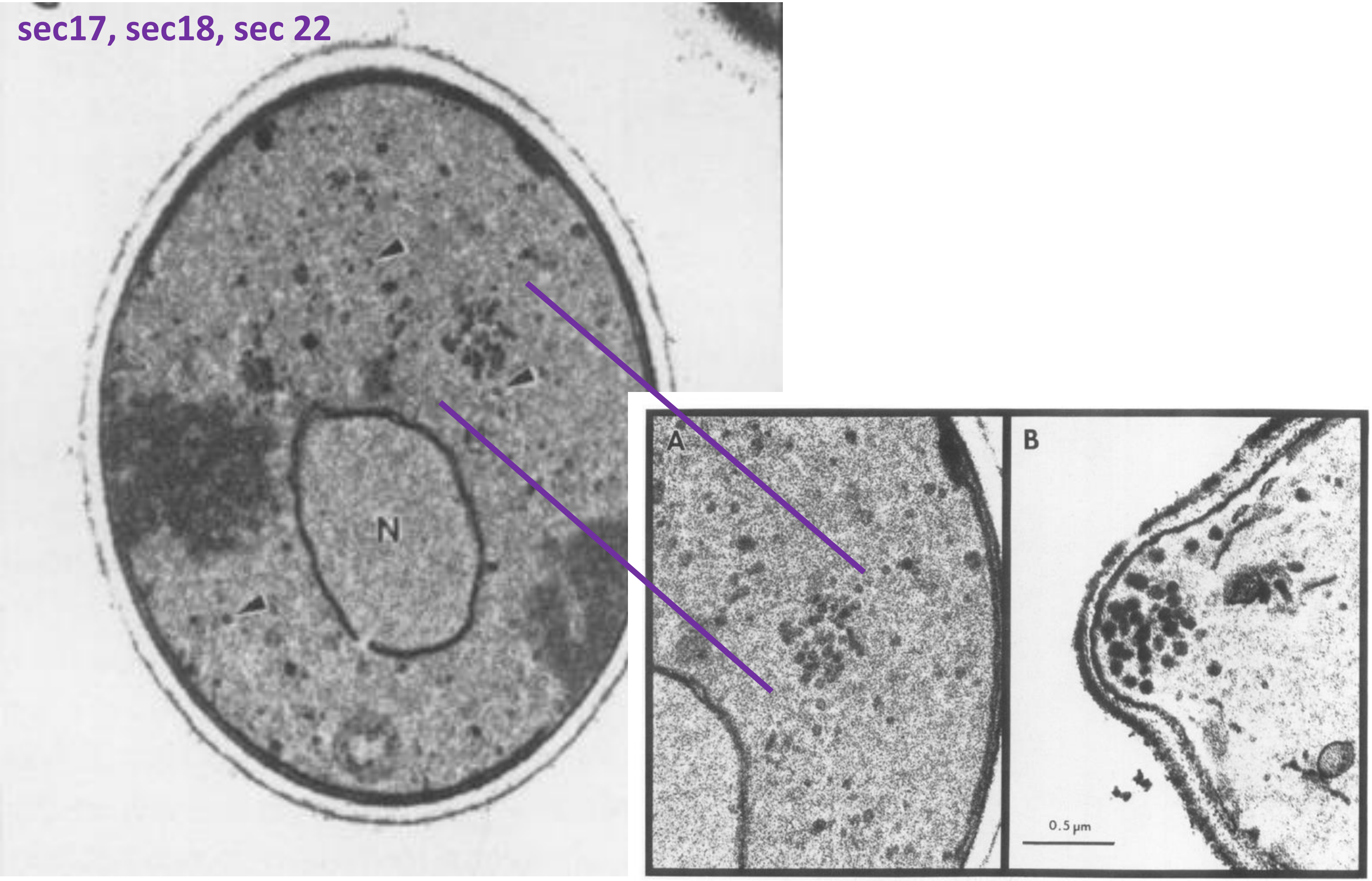
Cell, Vol. 61, 723–733, May 18, 1990, Copyright © 1990 by Cell Press

Distinct Sets of *SEC* Genes Govern Transport Vesicle Formation and Fusion Early in the Secretory Pathway

Chris A. Kaiser and Randy Schekman
Department of Molecular and Cell Biology
Division of Biochemistry and Molecular Biology
University of California
Berkeley, California 94720

Thus, ER to Golgi transport may
lar to the vesicle-mediated proc
transport between Golgi cisterna
idea that carrier vesicles mediate
ganelles is attractive in its simp
mechanisms for ER to Golgi tran
the available data. Tubular con

Накопление предшественников везикул



Количественный анализ малых везикул

Table 1. 50 nm Vesicle Accumulation after 1 hr at 37°C

Strain	Allele	Vesicles per μm^3 of Cell Volume
RSY269	*sec17-1* (37°C)	61.9 ± 1.8
RSY269	*sec17-1* (17°C)	13.0 ± 0.8
RSY387	*sec17-2* (37°C)	58.5 ± 3.4
RSY271	*sec18-1* (37°C)	47.9 ± 3.4
RSY319	*sec18-2* (37°C)	41.0 ± 2.5
RSY319	*sec18-2* (17°C)	12.2 ± 1.6
RSY321	*sec22-1* (37°C)	38.5 ± 2.6
RSY279	*sec22-3* (37°C)	55.3 ± 3.0
RSY277	*sec21-1* (37°C)	22.2 ± 1.5
RSY275	*sec20-1* (37°C)	17.4 ± 1.2
RSY255	*SEC*+ (37°C)	7.7 ± 0.7
RSY255	*SEC*+ (17°C)	11.3 ± 0.8
RSY309	*sec12-1* (37°C)	5.9 ± 0.6
RSY263	*sec12-4* (37°C)	7.3 ± 0.9
RSY265	*sec13-1* (37°C)	7.8 ± 0.7
RSY313	*sec13-3* (37°C)	6.4 ± 0.8
RSY317	*sec16-1* (37°C)	9.8 ± 1.1
RSY281	*sec23-1* (37°C)	11.6 ± 1.2

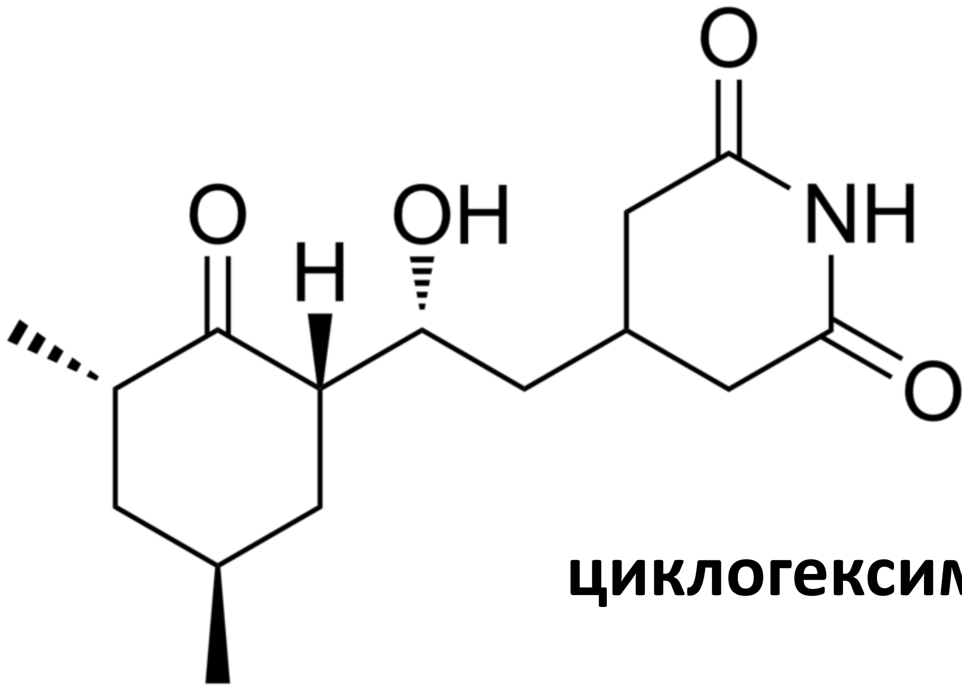
Vesicle density values are given as mean ± standard error of the mean. The standard error is the sample standard deviation divided by the square root of the sample size (n = 32).

sec17, sec18, sec22 – II группа
слияние везикул

sec20, sec21 – промежуточная группа

sec12, sec13, sec16, sec23 – I группа
образование везикул

Влияние ингибитора синтеза белка на накопление везикул



циклогексимид

Взаимодействие между мутациями секреторных генов

Table 3. Growth of Double Mutants at 24°C

	sec13-1	*sec16-1*	*sec17-1*	*sec18-1*	*sec20-1*	*sec21-1*	*sec22-1*	*sec23-1*
sec12-1	−	−	+	+	+	+	+	+
sec13-1		−	+	+	+	+	+	−
sec16-1			+	+	+	+	+	−
sec17-1				−	+	+	+	+
sec18-1					+	+	+	+
sec20-1						+	+	+
sec21-1							+	+
sec22-3								+

−: double mutant does not form a visible colony after 5 days at 24°C. +: double mutant grows as well as wild type at 24°C.

sec12, sec13, sec16, sec23 – I группа (**образование** везикул)

sec17, sec18 – II группа (**слияние** везикул)

Комбинации летальных генов блокируют транспорт белков

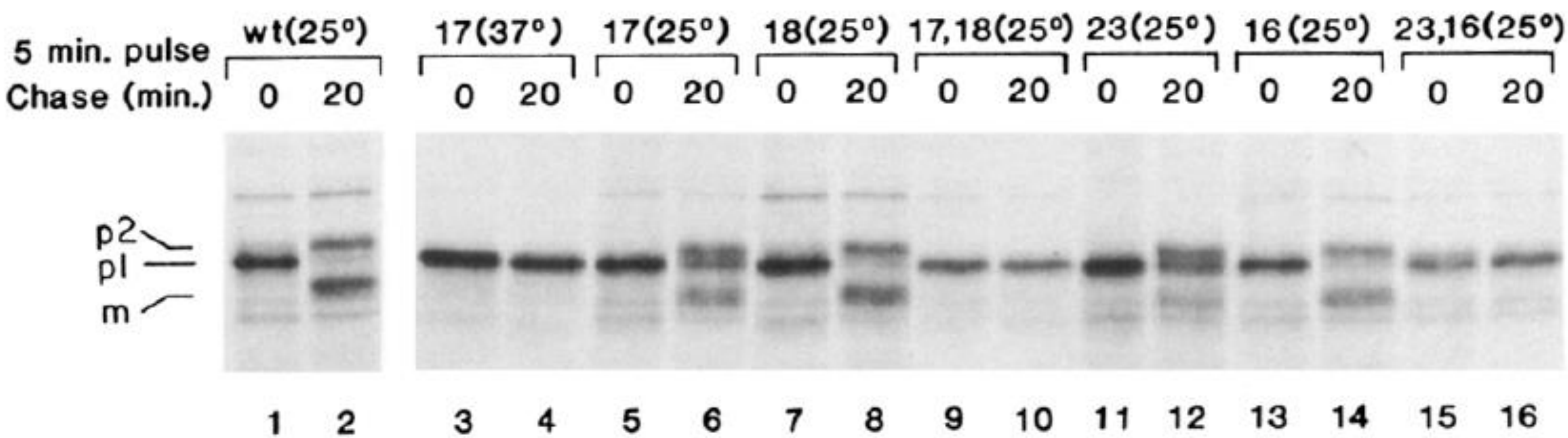
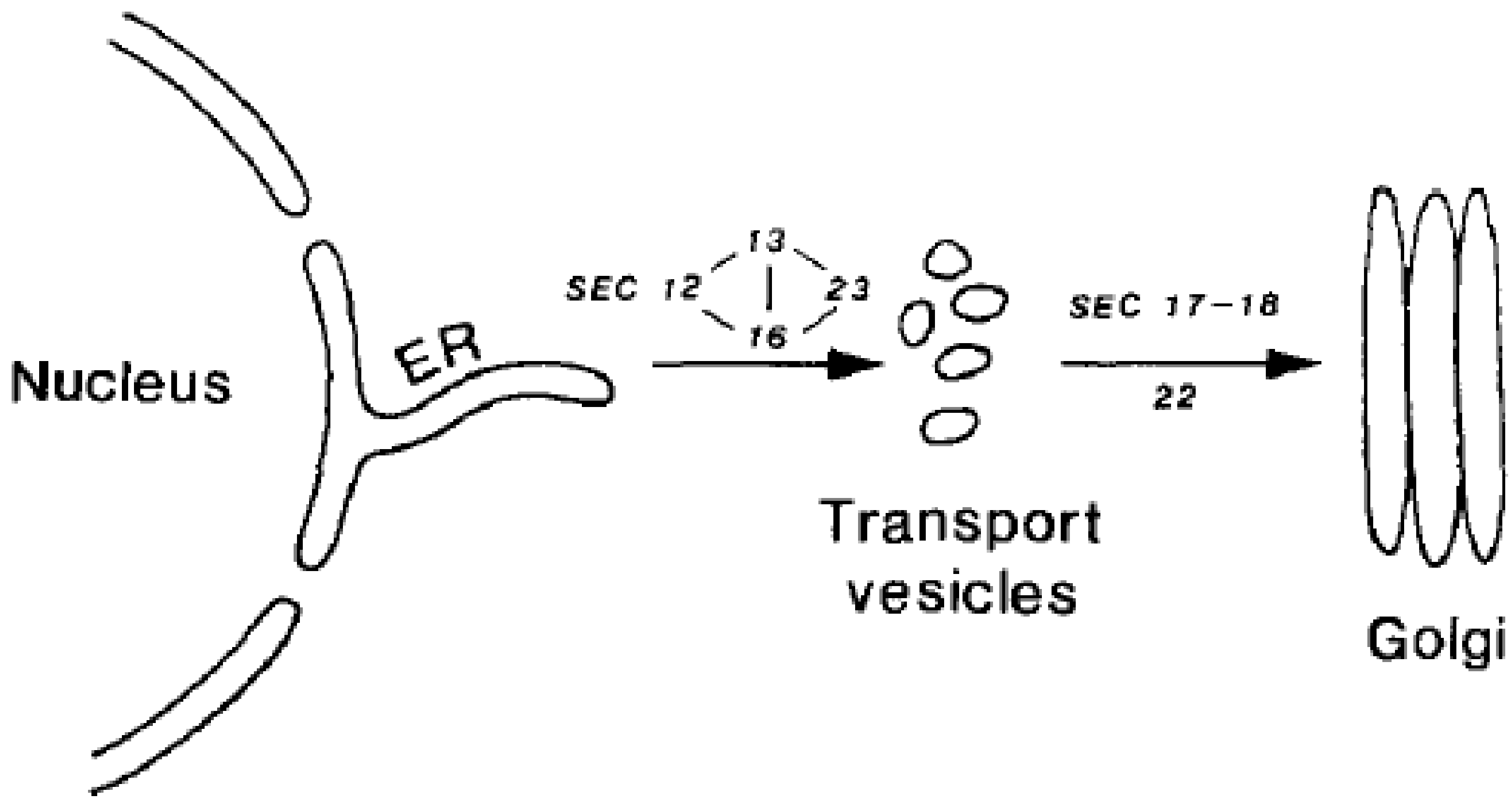


Figure 4. Certain Combinations of *sec* Mutations Block Transport of Carboxypeptidase Y from the ER at 25°C

Kaiser, Schekman – Cell, 1990: посредники между ЭР и АГ

- 12 генов, продукты которых влияют на транспорт между ЭР и АГ
- классифицированы 9 генов по роли в образовании и слиянии прекурсоров везикул
- гены sec12, sec13, sec16, sec23 требуются для образования везикул, накапливающихся в мутантах sec17, sec18, sec22
- при непермиссивной температуре в клетках мутантов sec17, sec18, sec22 накапливаются 50-нм везикулы, происходящие из ЭР
- гомолог sec18 млекопитающих принимает участие в транспорте между цистернами АГ, эндоцитозе, а также в транспорте от ЭР (Ротман)

Kaiser, Schekman – Cell, 1990: взаимодействия между генами



Kaiser, Schekman – Cell, 1990:
функции продуктов генов sec – данные Ротмана

- в транспорте белков между цистернами АГ млекопитающих принимают участие везикулы сходного размера – 50 нм
- слияние везикул АГ с плазматической мембраной происходит *in vitro* в две стадии
  - ингибирование первой стадии приводит к накоплению везикул, не покрытых клатрином
  - непокрытые везикулы образуются и на более поздней стадии, если инактивирован NSF
- sec18 является гомологом NSF
  - NSF взаимодействует с белком SNAP
  - sec17 является гомологом SNAP и взаимодействует с sec18

Публикации Ротмана: Cell, 1984

Cell, Vol. 39, 405–416, December 1984 (Part 1), Copyright © 1984 by MIT 0092-8674/84/120405-12 $02.00/0

Reconstitution of the Transport of Protein between Successive Compartments of the Golgi Measured by the Coupled Incorporation of N-Acetylglucosamine

William E. Balch, William G. Dunphy, William A. Braell, and James E. Rothman
Department of Biochemistry
Stanford University School of Medicine
Stanford, California 94305

essentially intact (Fleischer, 1974) and because it is specialized for protein transport (Farquhar and Palade, 1981; Rothman, 1981; Tartakoff, 1982). Thus membrane components needed for transport should be especially concentrated in Golgi fractions. In addition, the actions of the series of glycosyltransferases present in the sequential cisternae of the stack offer a ready means to measure the

Rothman (Cell, 1984): Введение

- В бесклеточных системах могут быть изучены процессы
  - отпочковывания везикул от мембран
  - транспорта определенных белков (проблема сортировки белков)
  - слияния везикул с определенными мембранами (проблема сортировки везикул)

Использование мутантов по гену N-ацетилглюкозамин трансферазы I

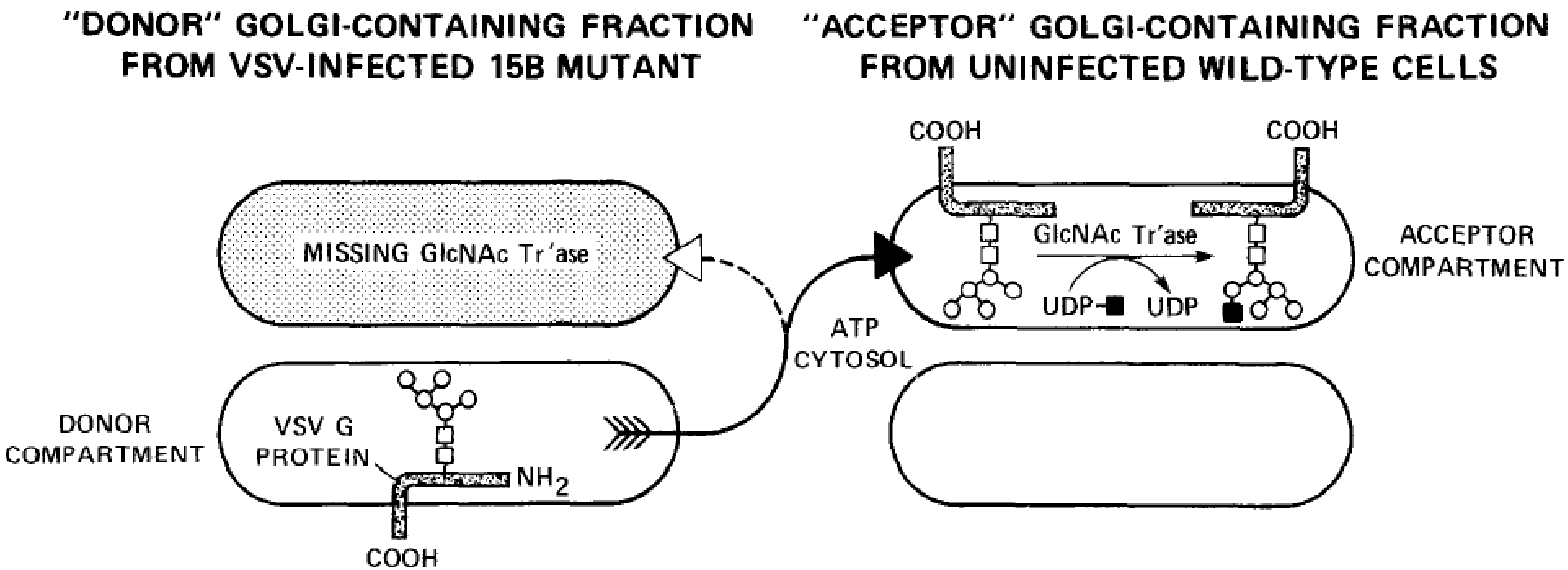
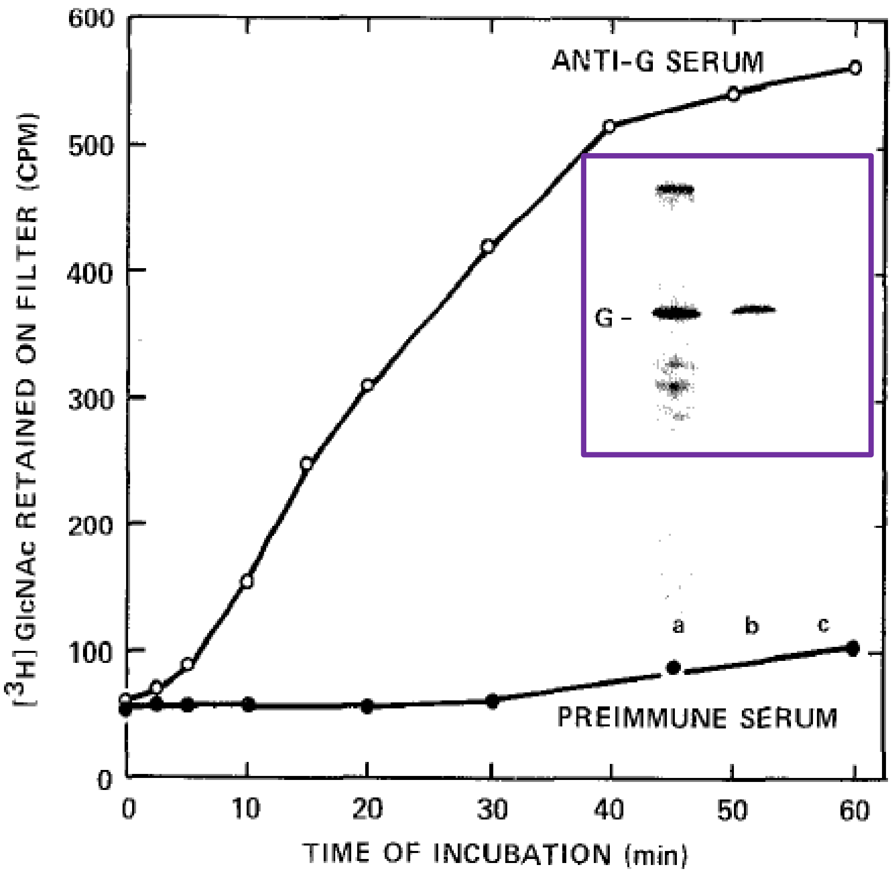


Figure 1. Assay for Transport of a Protein between Successive Golgi Compartments In Vitro, Based on a Transport-Coupled Glycosylation

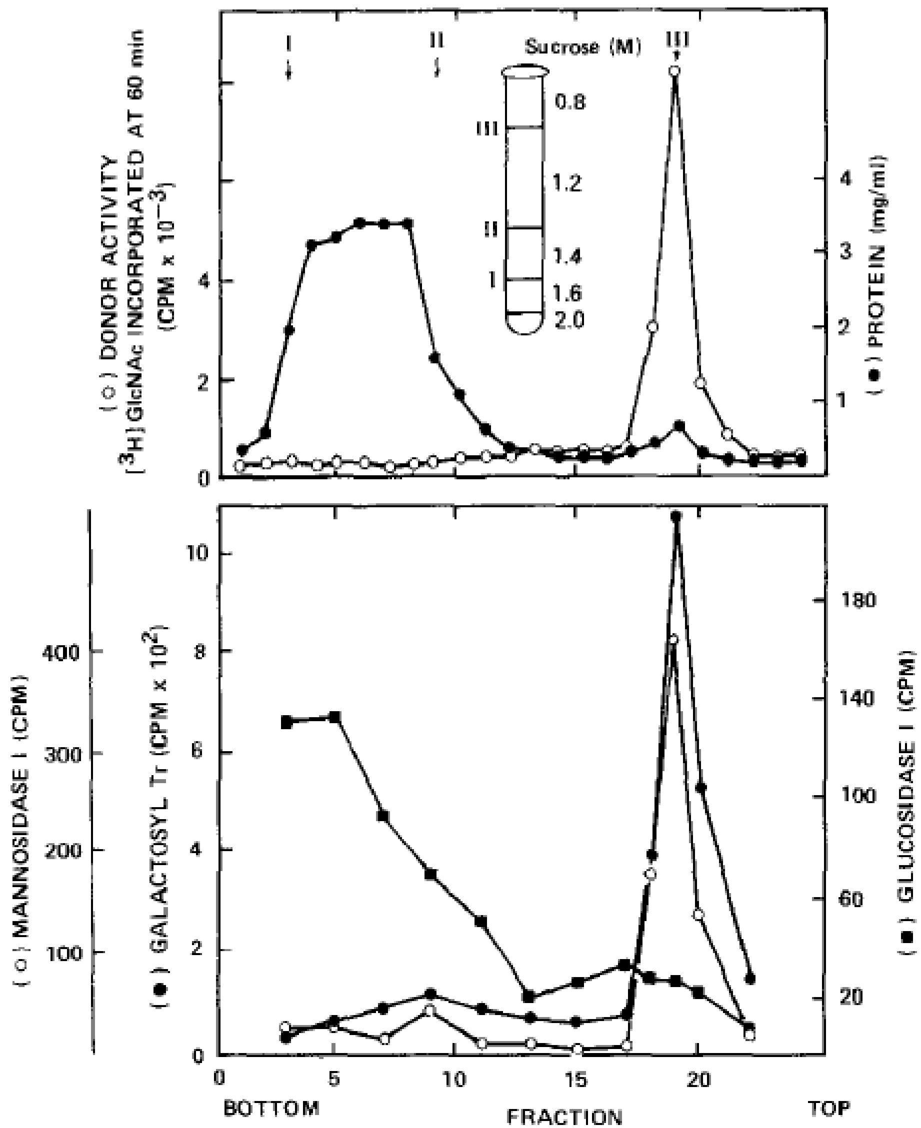
Встраивание [^{3}H]-GlcNAc в белок



○ анти-сыворотка против гликопротеина

● сыворотка до иммунизации

Донорная активность мембран АГ



○ донорная активность

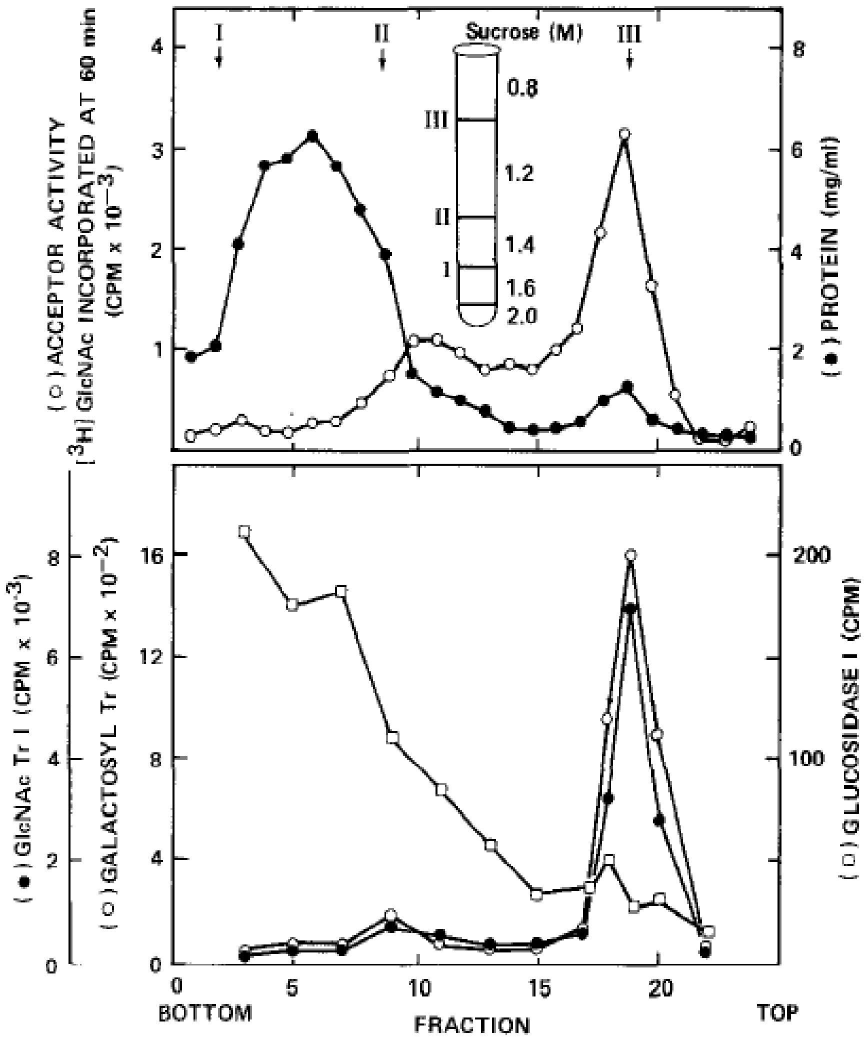
● содержание белка

○ маннозидаза I (АГ)

● галактозилтрансфераза (АГ)

■ глюкозидаза I (ЭПС)

Акцепторная активность мембран АГ



○ акцепторная активность

● содержание белка

○ GlcNAc-трансферазы I (АГ)

● галактозилтрансфераза (АГ)

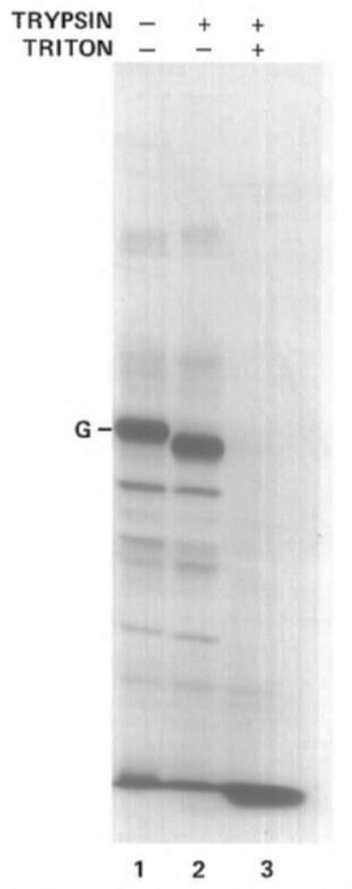
□ глюкозидаза I (ЭПС)

Условия GlcNAc-гликозилирования

Table 3. Summary of Requirements of the Cell-Free System

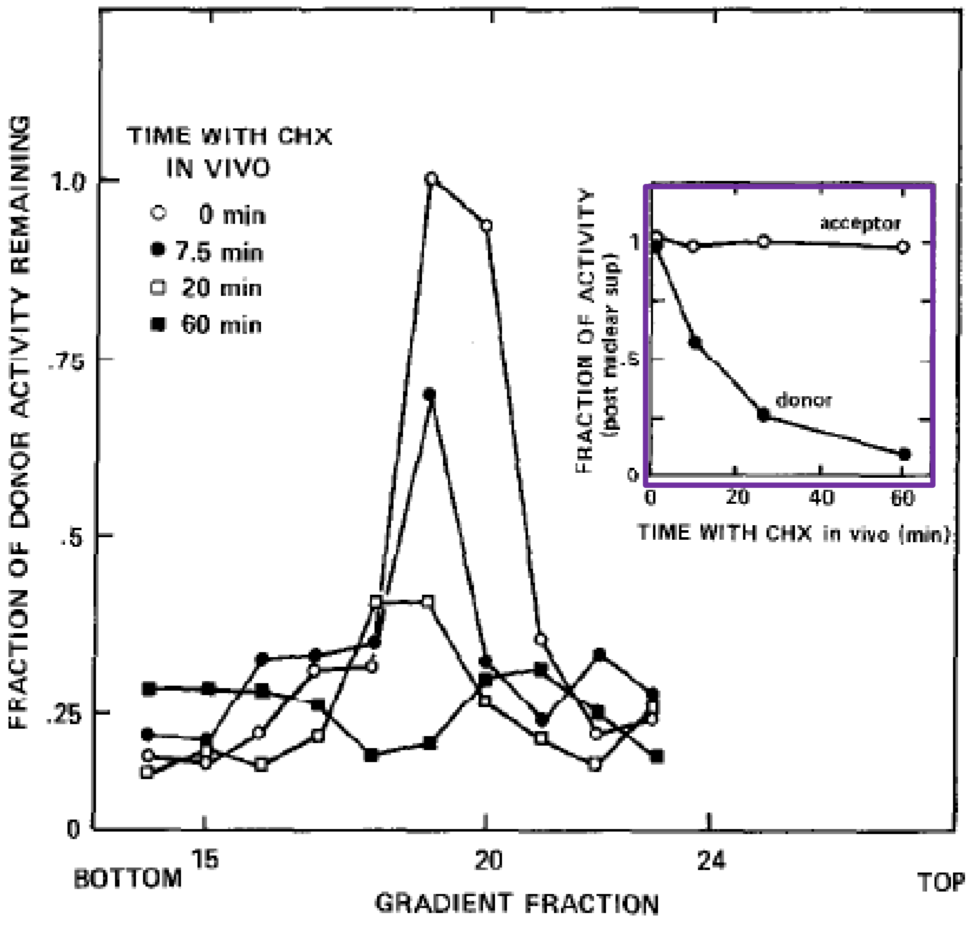
Incubation Condition	^{3}H-GlcNAc Incorporated into G Protein[a]
1. Complete	[1]
2. − triphosphates and regenerating system	0.01
3. − cytosol	0.01
4. − VSV/15B donor fraction	0.01
5. − Wild-type Golgi fraction	0.03
6. − Wild-type Golgi fraction, + Golgi fraction from uninfected 15B	0.02
7. − Mg^{++}	0.02
8. + EDTA	0.03

Гликопротеид имеет трансмембранную природу



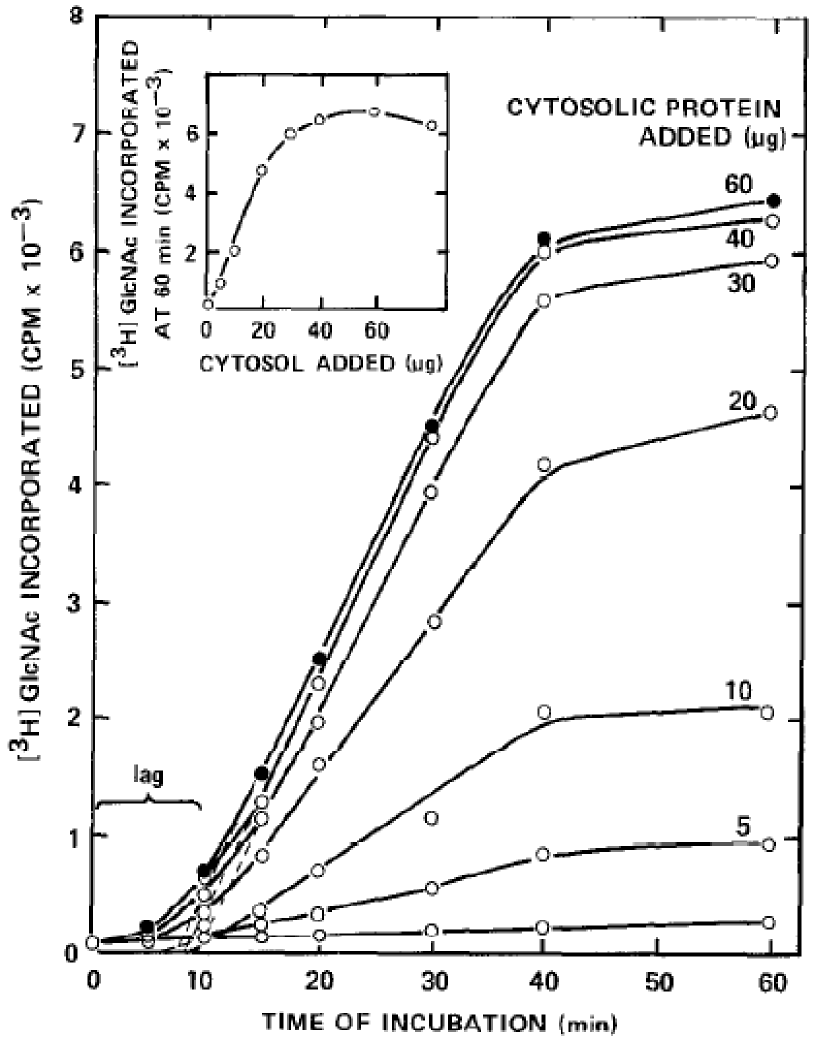
Для эффективного гликозилирования, и фермент, и субстрат должны находиться внутри одной герметичной везикулы.

Ингибирование биосинтеза белка



- ○ акцепторная активность
- ● донорная активность

Влияние компонентов цитозоля



Rothman (Cell, 1984): Обсуждение

- методика позволяет установить источник гликопротеида в АГ, измерить эффективность транспорта между цистернами
- анализ *in vitro* специфичен именно для АГ
  - гликопротеиды плазматической мембраны, эндосом, ЭР – не гликозилируются в этой системе
  - донорная активность располагается только в мембранах АГ
  - субстратом является свежесинтезированный полипептид
  - перенос в следующую мембрану клеток мутантного штамма *in vivo* делает невозможным гликозилирование в клетках дикого типа *in vitro*

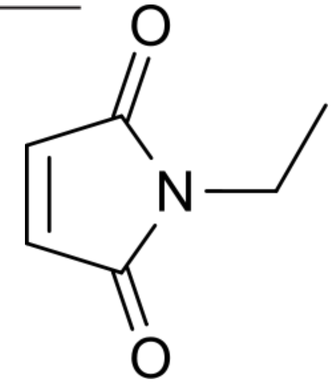
Rothman (Cell, 1984): Возможные механизмы

- гликопротеид, гликозилируемый *in vitro*, содержится в цистернах или в везикулах, которые уже отпочковались от цистерн в ходе гомогенизации?
  - если гликопротеид содержится в везикулах, значит выявлен процесс **слияния** везикулы и мембраны АГ
  - если гликопротеид содержится в цистернах, то выявлен процесс **отпочковывания** и последующего слияния
- имеет ли место *прямое* селективное слияние между определенными цистернами АГ мутантного штамма и дикого типа?

SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion

Thomas Söllner, Sidney W. Whiteheart, Michael Brunner, Hediye Erdjument-Bromage, Scott Geromanos, Paul Tempst & James E. Rothman

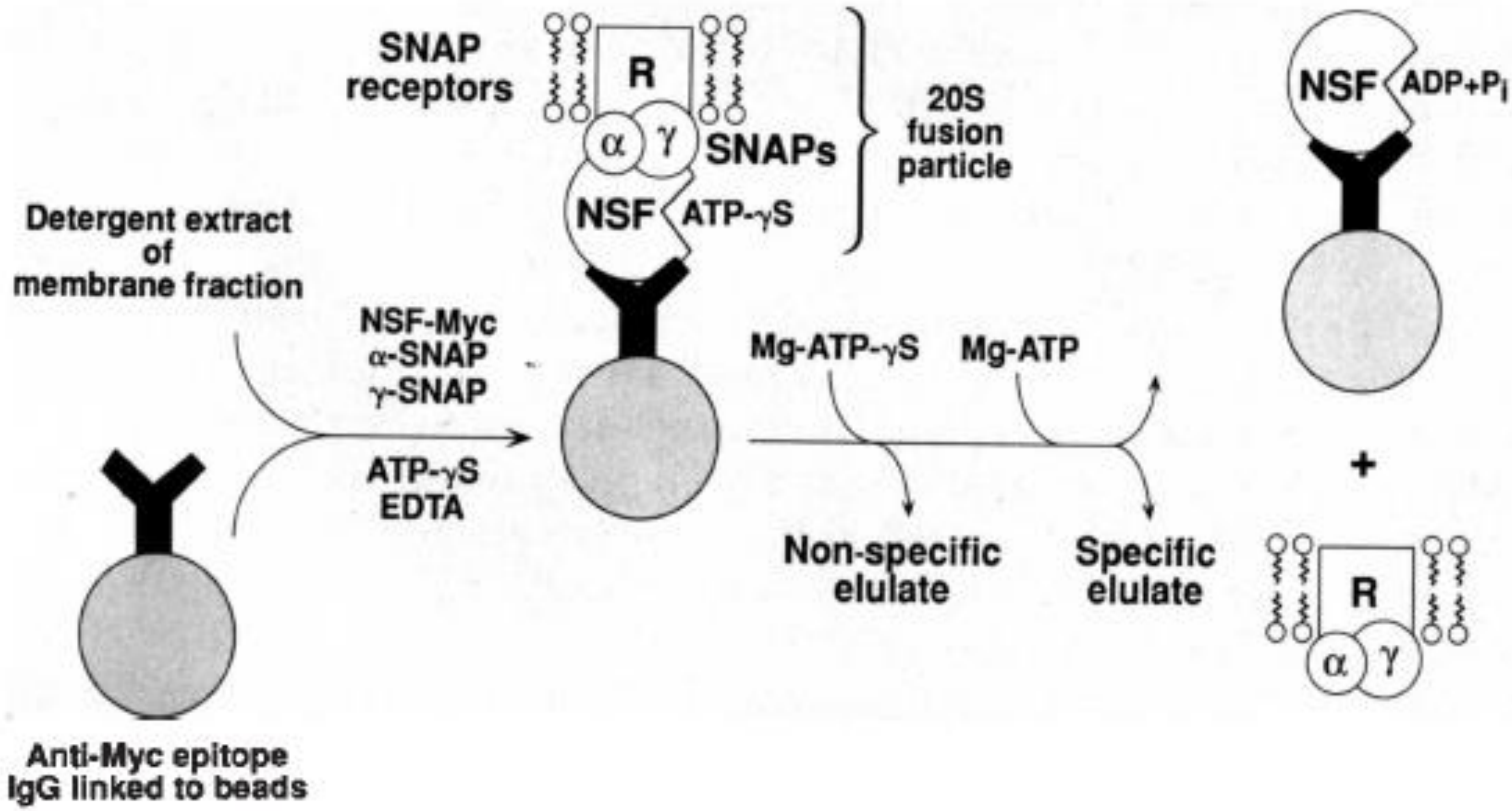
Rockefeller Research Laboratory, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, New York 10021, USA



N-этилмалеид

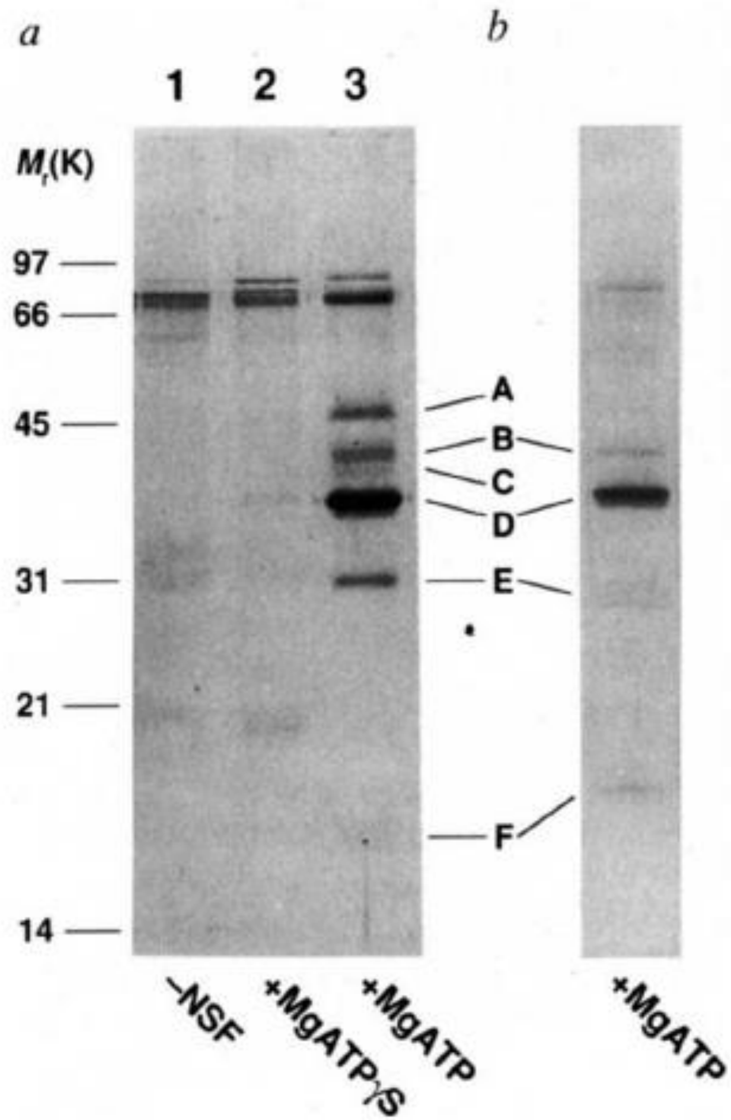
- **NSF** – белок слияния, чувствительный к N-этилмалеиду, тетрамер (мономеры 76 кДа)
- NSF восстанавливает транспорт между цистернами АГ в бесклеточной системе
- в отсутствие NSF везикулы накапливаются на поверхности акцепторной мембраны
- гомолог NSF дрожжей закодирован геном SEC18 (Шекман), продукт которого может замещать NSF *in vitro*
- NSF требуются дополнительные цитоплазматические факторы – α, β, и γ**SNAP**. SEC17 является гомологом α-SNAP

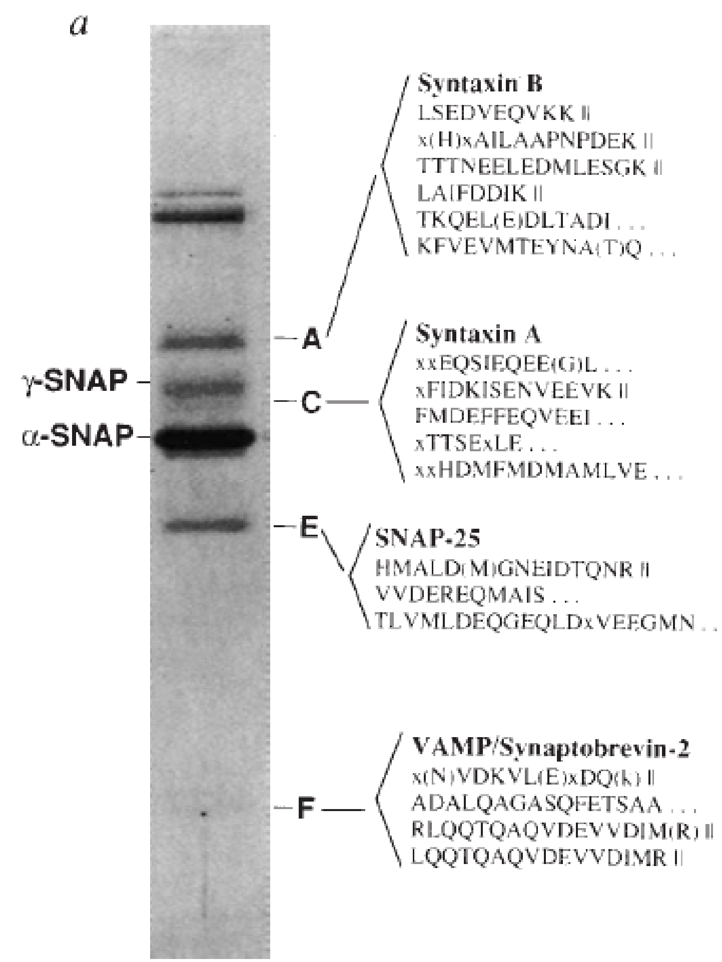
Выделение рецепторов SNAP (SNARE)



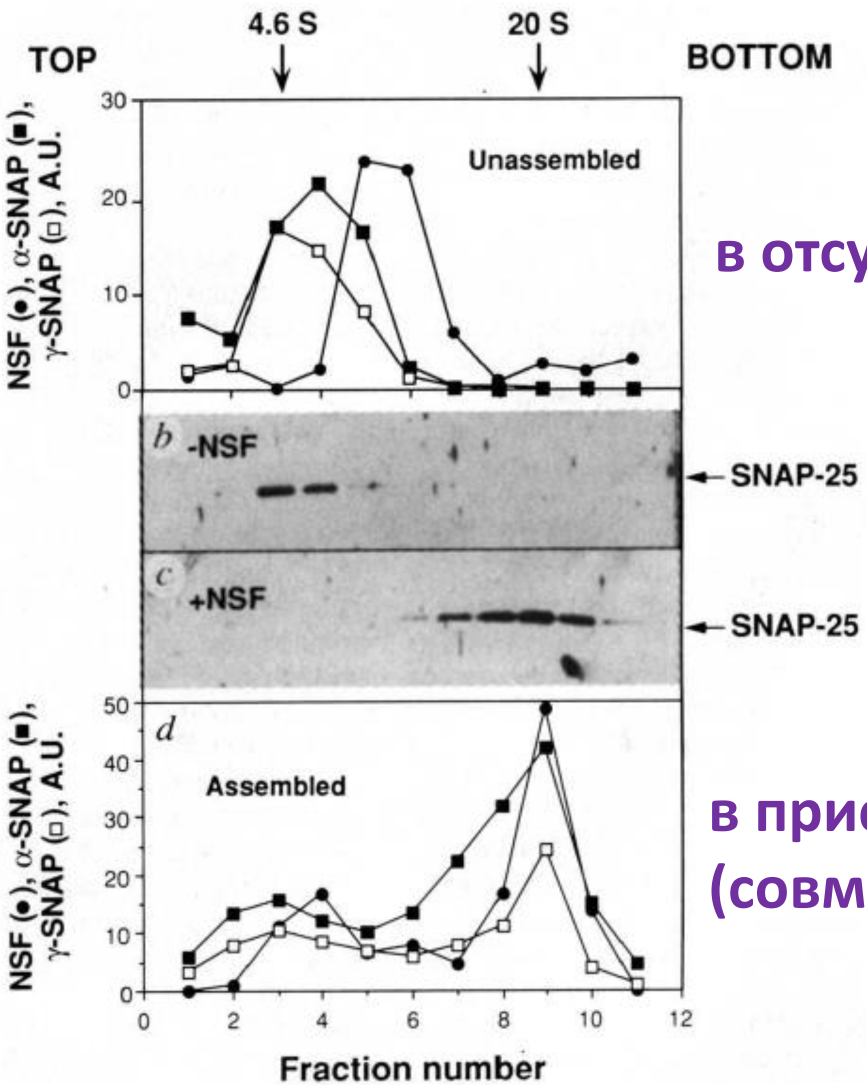
NATURE · VOL 362 · 25 MARCH 1993

Препараты SNAP и SNAPE из мозга быка





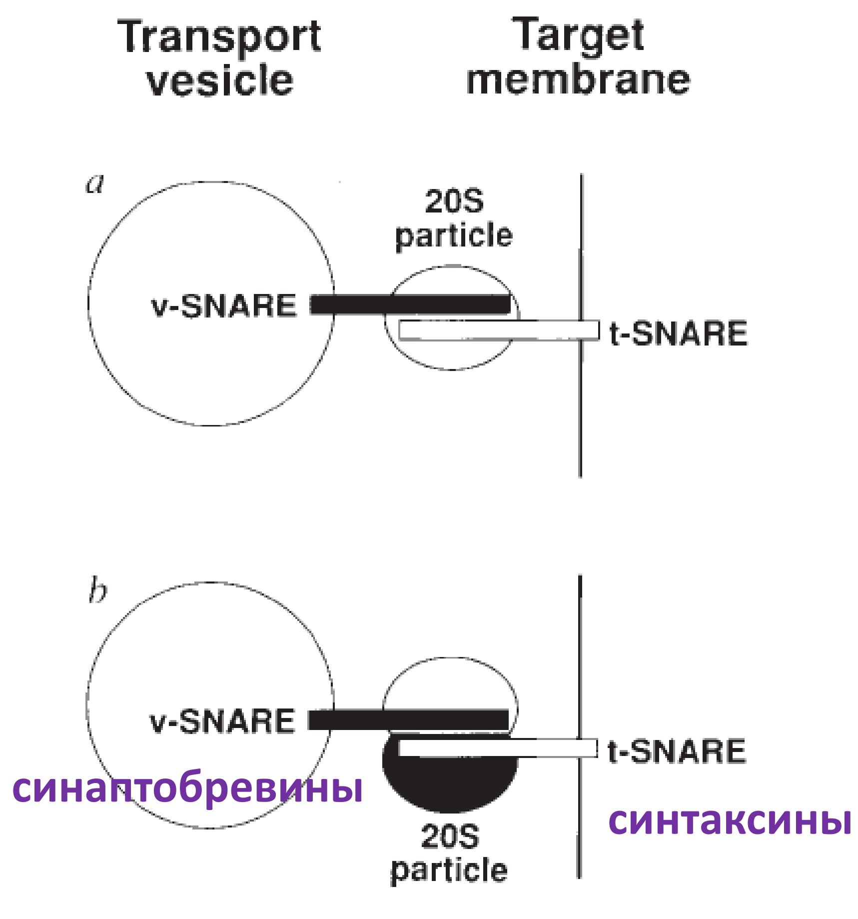
Включение α-SNARE в частицы 20S



в отсутствие NSF – 5S

в присутствие NSF – осаждение в 20S (совместно с NSF, α-SNAP и γ-SNAP)

Результаты – выделены SNARE



– SNARE принимают участие в образовании 20S частицы
– **SNAP-25** обнаружен в пресинаптических мембранах
– **VAMP/синаптобревин** закреплен в мембранах синаптических везикул и необходим для слияния синаптических везикул
– **синтаксин** сосредоточен в зоне везикул и кальциевых каналов

*Griff, **Schekman, Rothman,** Kaiser – Journal of Biological Chemistry, 1992*

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

Vol. 267, No. 17, Issue of June 15, pp. 12106–12115, 1992
Printed in U.S.A.

The Yeast *SEC17* Gene Product Is Functionally Equivalent to Mammalian α-SNAP Protein*

(Received for publication, December 2, 1991)

Irene C. Griff‡§, Randy Schekman¶, James E. Rothman§, and Chris A. Kaiser¶‖**

From the §Program of Cellular Biophysics and Biochemistry, Sloan Kettering Institute, New York, New York 10021, the ‡Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, the ¶Department of Molecular and Cell Biology and Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley, California 94720, and the ‖Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139

- Продукт гена **SEC17** *S. cerevisiae* имеет такие же биохимические свойства, как белок **α-SNAP** млекопитающих
- В экстрактах дрожжей белок Sec17 связывает белок Sec18 (гомолог NSF) в соотношении 1 к 1.

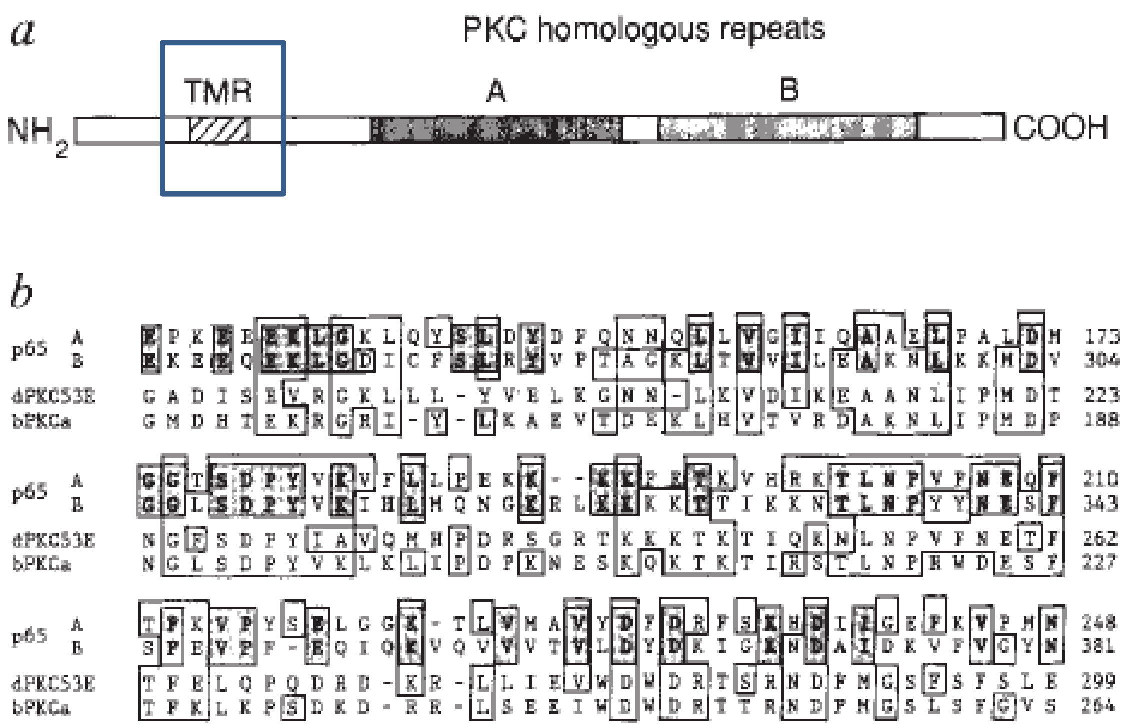
Работы Зюдхофа – Nature, 1990

Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C

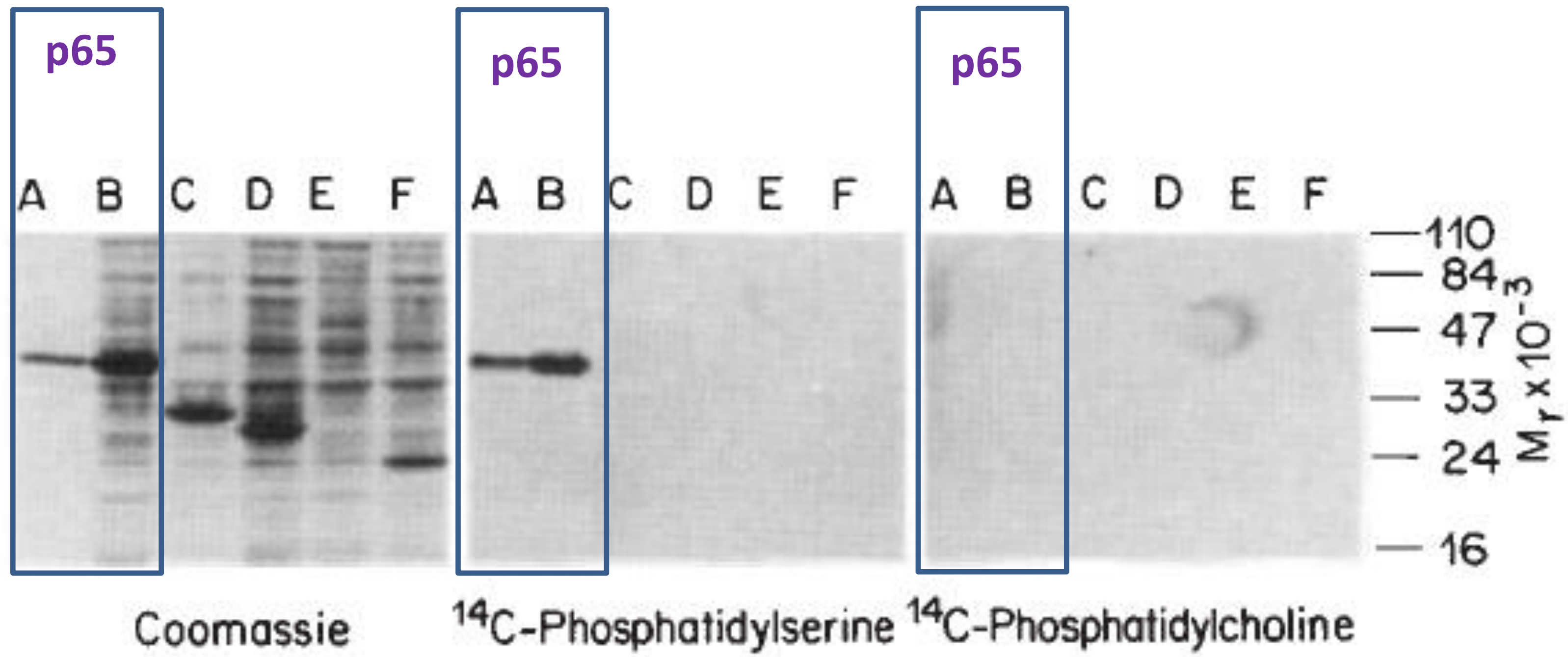
Mark S. Perin*, Victor A. Fried†, Gregory A. Mignery*‡, Reinhard Jahn§ & Thomas C. Südhof*‡||

* Howard Hughes Medical Institute and ‡ Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75235, USA
† St Jude Children's Research Hospital, Department of Biochemistry, Memphis, Tennessee 38101, USA
§ MPI für Psychiatrie, Abteilung Neurochemie, 8033 Planegg-Martinsried, FRG

Клонирование белка p65



Гомология **p65** и регуляторного домена **PKC**



Анализ сродства p65

TABLE 1 Inhibition by lipids of haemagglutination by recombinant p65

Compound	Minimal inhibitory concentration	
Phosphatidylserine	0.4 μM ± 0	4
Phosphatidylinositol	0.6 μM ± 0.2	4
Sulphatides	0.4 μM ± 0	4
Phosphatidylglycerol	0.4 μM ± 0	4
Trisialoganglioside (GT1b)	0.9 μM ± 0.5	7
Disialoganglioside (GD1)	3.9 μM ± 1.4	4
Monosialoganglioside (GM3)	7.8 μM ± 2.7	4
Monosialoganglioside (GM2)	34 μM ± 16.0	4
Monosialoganglioside (GM1)	19 μM ± 8.0	5
Lysophosphatidylserine	200 μM ± 0	4
Lysophosphatidylinositol	>200 μM	4
Lysophosphatidylglycerol	>200 μM	4
Lysosulphatides	>200 μM	4
Phosphatidylethanolamine/ phosphatidylcholine	>200 μM	4
Diacylglycerol	>200 μM	4
Cerebrosides	>200 μM	4
Oleic acid	>100 μM	4

Sudhof – Nature, 1993

Synaptic vesicle fusion complex contains *unc-18* homologue bound to syntaxin

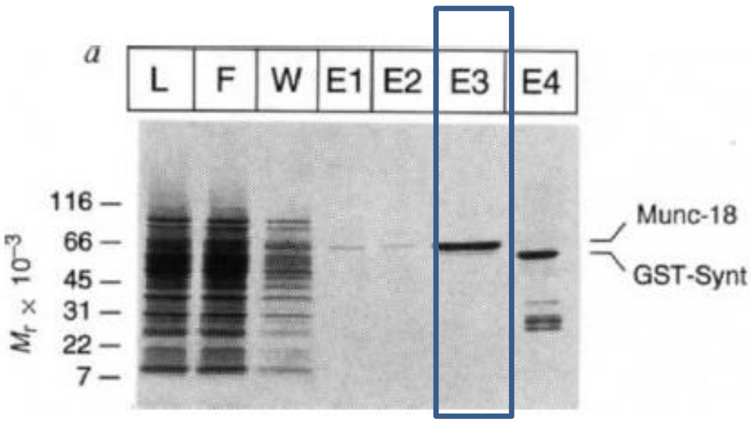
Yutaka Hata[*†], Clive A. Slaughter[*] & Thomas C. Südhof[*†‡]

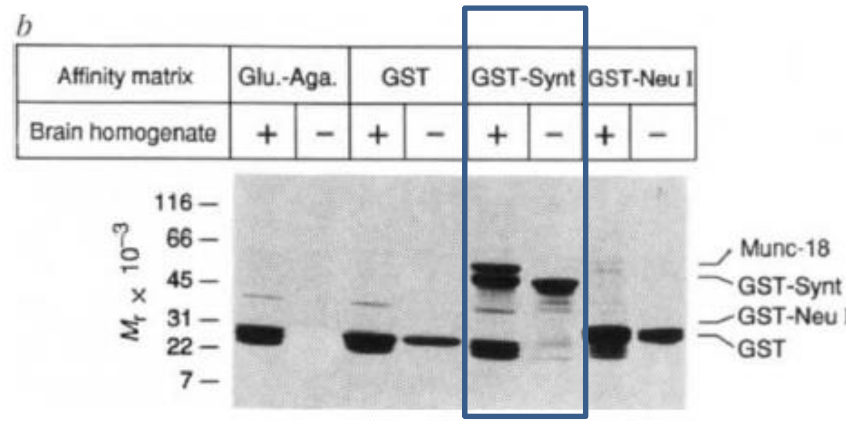
[*] Howard Hughes Medical Institute and [†] Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, Texas 75235, USA

Выделение и описание белка

специф.
элюат

связывает
синтаксин



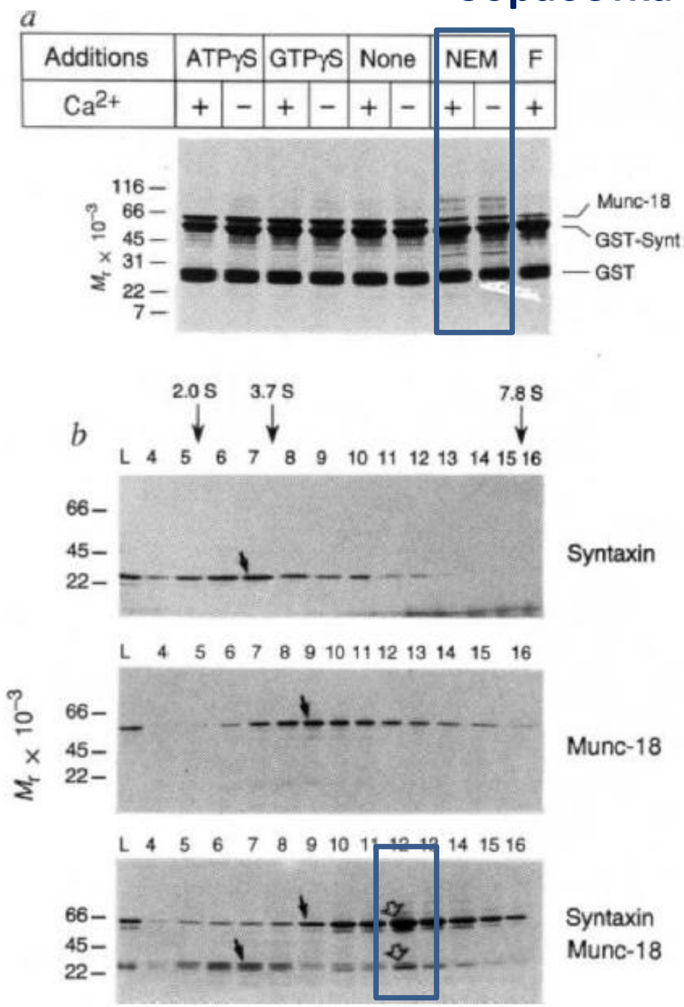


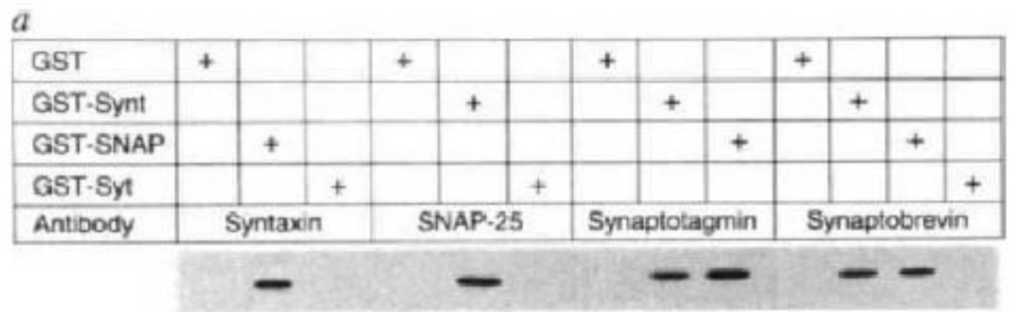
Гомологи Munc-18

```
C.e.    MQNVKHSYLACSSSSGCQFFSLFLSLCHAEHQIQTLSPSFAYTLLIFALLVSDKSEIALLSRHTHTYIFLPISSVHPSL    79

             N-T                                              #17A
RAT     MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGE---WKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINK-RREPLPSLEAVY    75
BOV     MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGE---WKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINK-RREPLPSLEAVY    75
C.e.    ELLPFVVFMHMRKLLNDVIRPLKKGDGRSAWNVLIVDTLAMRMLSSCGKMHNIMEEGITIVEDLNK-RREPLPTLEAIY   157
SEC1         MSDLIELQRNYLIGVLNQIETKNNLKFLIIDKTVETILSYLFLTPQELLNNVTSVDLIDSPTRKGQSSIEAIY    73

                                #17B                             #18
RAT     LITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN-ELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYS-LDSADS   152
BOV     LITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN-ELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYS-LDSADS   152
C.e.    LIAPTAESIDKLIQDYCARNL--YKCAHVFFTEACSDQLFS-TLSKSAAARFIKTLKEINIAFTPYESQVFN-LDSPDT   232
SEC1    ILEPTKYNINCIDADFMVRPP-KYRRCHIRFLPGLTNPIFQFFQSKRYIAQNLESFKPIELGFFVKESQFFETLQMEHS   151

RAT     FQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYK-----------------DNALLAQLIQDKLDAYKA   214
BOV     FQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYK-----------------DNALLAQLIQDKLDAYKA   214
C.e.    FFLYYNAQKQGGLTSNLERIAEQIATVCATLGEYPSLRYRADFE-----------------RNVELGHLVEQKLDAYKA   294
SEC1    LQVFFNNNCKALIPTNVRKIVGSLVSLGVITGEYPIVRYSVSNPVEEEDARNGNAVVNANSLTRSIANAFQIAIDTYAR   230

RAT     DDPTM-GEGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYK--YETSGIGEARVKE----VLLDEDDD   286
BOV     DDPTM-GEGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYK--YETSGIGEARVKE----VLLDEDDD   286
C.e.    DDPSM-GEGADKARSQLIIIDRGYDAITPLLHELTLQAMCYDLLGIENDVYK--YETGGSDENLEKE----VLLDENDD   366
SEC1    NNPDFPPQNTERPRSILIITDRTLDPFAPILHDFSYQAMAYD-LVANVDTQKDIYHYSAENEAGEQEEKVSKLVDLYDP   308
```

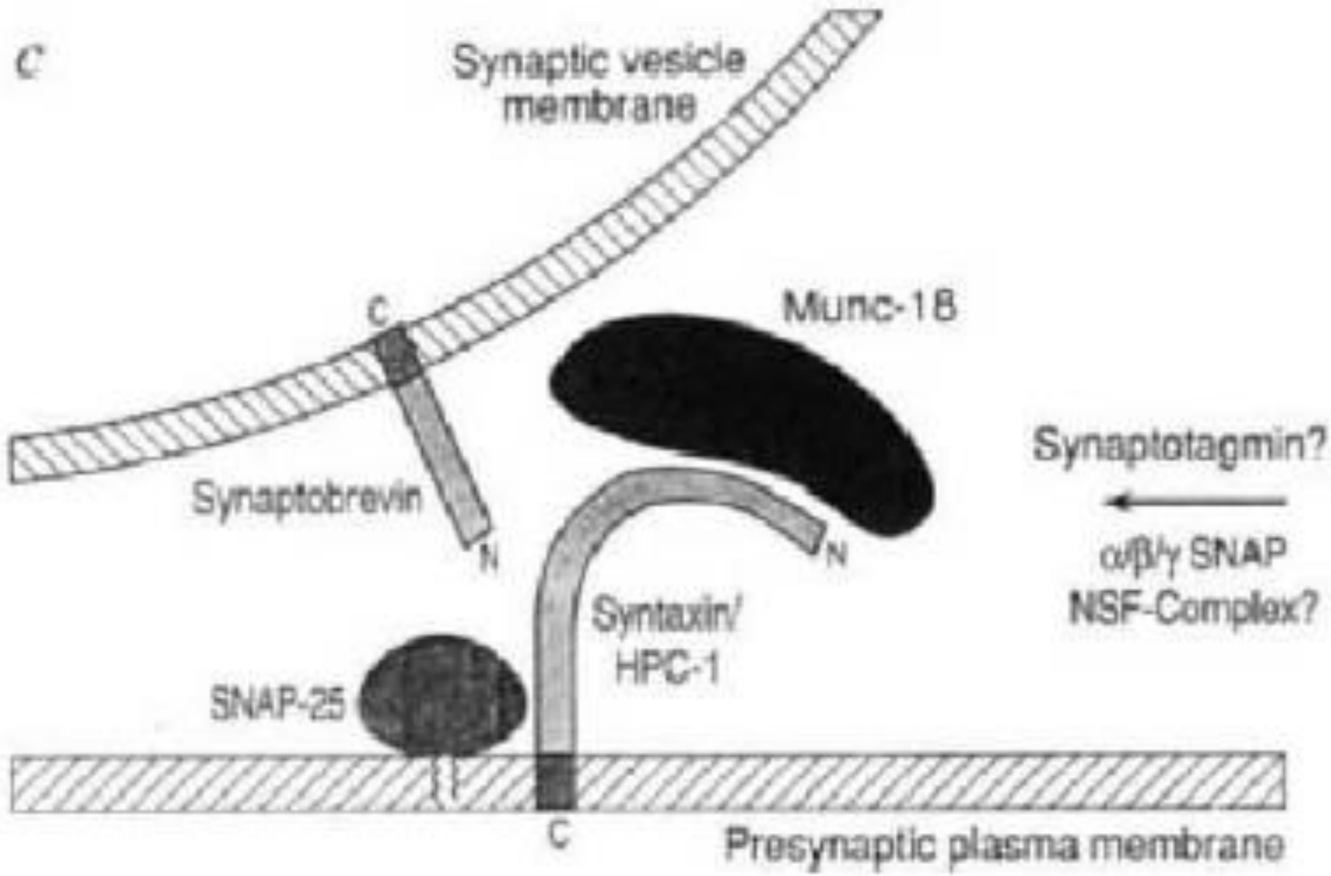
Эффекты лигандов

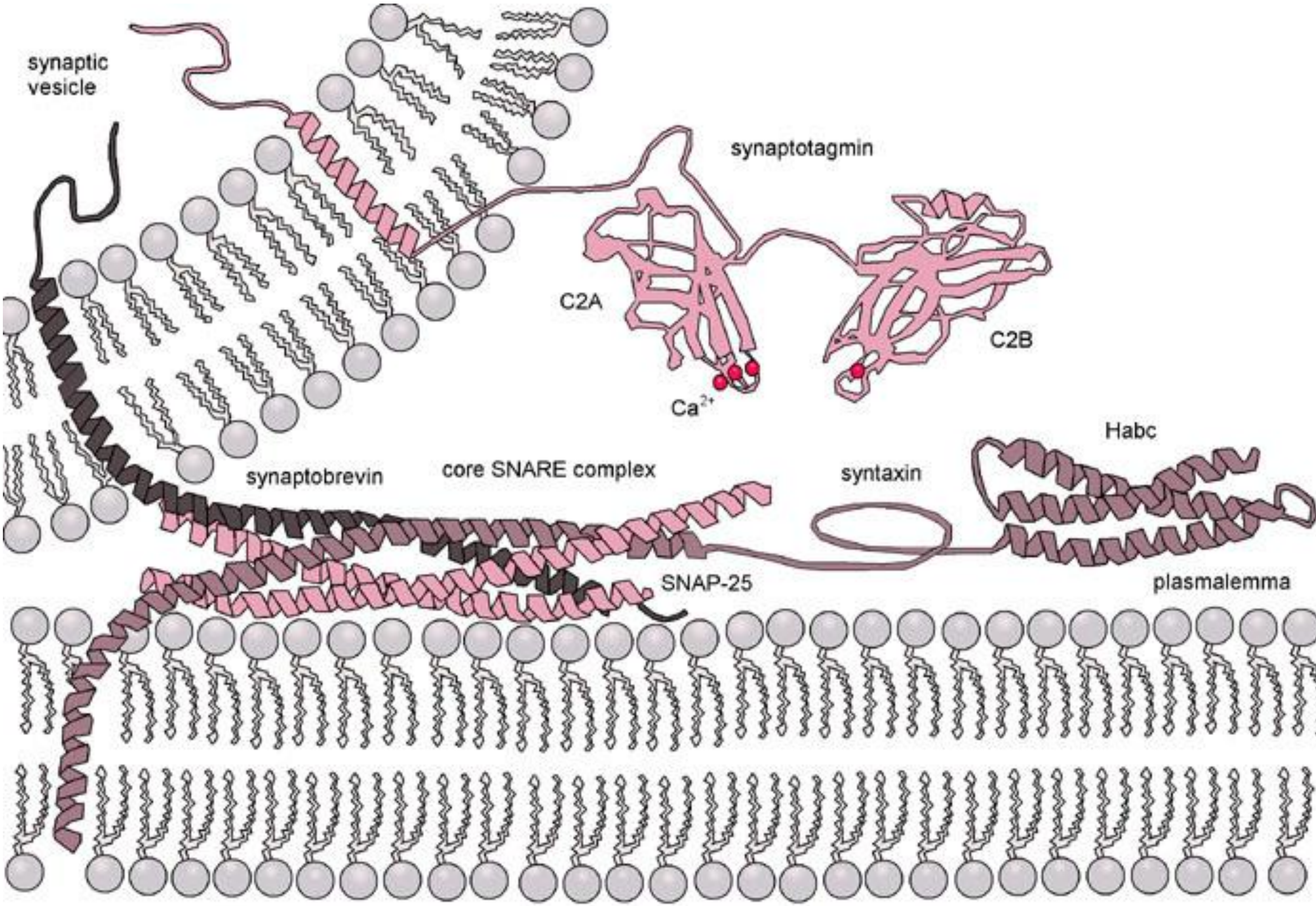
обработка N-этилмалеидом





Sudhof – Nature, 1993: заключение




synaptic
vesicle
synaptotagmin
C2A
C2B
Ca^{2+}
Habc
synaptobrevin
core SNARE complex
syntaxin
SNAP-25
plasmalemma

Это фантастическая история, за относительно короткое время, 25-30 лет, мы прошли путь от полного незнания того, как происходит транспорт при помощи мембранных везикул до понимания того, какие белки в этом участвуют и как именно это происходит.
Эти трое сделали самые-самые важные открытия.

Вильям Викнер, биохимик из Нью Гемпшира

We have three scientists who were marching to their own drummer, scientifically

Science, 2013