

Hücredeki yoğun trafik: vezikülle taşıma

Nuriman Özgüneş¹

¹Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

Ökaryotik hücreler bazı molekülleri, membranlarından oluşturdukları veziküller aracılığı ile içeri alırlar. Bu olaya “endositoz” adını veriyoruz. Hücre membranı, endositozla kaybettiği materyali “egzositoz”la karşılar. Egzositoz, hücre içi membranlardan oluşan veziküllerin, hücre içinden yükledikleri molekülleri, plazma membranı ile kaynaşarak dışarı vermesidir.

Hücre içinde organeller arasında hızlı bir vezikül trafiği vardır. Ancak bu trafiğin çoğu endositoz ve egzositoz ile bağlantılıdır. Egzositozu gerçekleştirecek veziküller endoplazmik retikulum (ER)’da oluşur, Golgi kompleksi ile kaynaşır, Golgi boyunca taşınır ve Golgiden oluşan salınım vezikülleri ile plazma membrana taşınır. Aynı şekilde endositoz sırasında oluşan veziküller endozom kompleksi ile kaynaşır, buradan tomurcuklanan veziküller Golgiye ve lizozomlara taşınır. Endozom → Golgi → ER yönünde bir geri taşınım da yine veziküller aracılığı ile sürer.

VEZİKÜL OLUŞUMU

Egzositoz ve endositozda veziküller, aynı temel mekanizma ile, birkaç basamakta oluşur. Vezikül oluşumunun basamakları sırasıyla;

1. Vezikülün tomurcuklanması ve kılıflı vezikül oluşumu,
2. Vezikülün kılıfından sıyrılması,
3. Vezikülün hedef membranı bulması,
4. Vezikülün hedef membranla kaynaşmasıdır.

1. Vezikülün tomurcuklanması

Hemen hemen incelenen bütün durumlarda vezikülün tomurcuklanmasında kılıf proteinlerinin varlığı gösterilmiştir. Kılıf protein alt birimleri biraraya gelerek 50-100 nm çapındaki genellikle küre biçimini alan kılıfı oluşturur. Kılıf protein alt birimleri sitozolde çözünmüş olarak bulunur. Vezikül oluşacağı zaman bu proteinler kaynak membrana bağlanır ve membranın o bölgedeki yapısını değiştirerek vezikülün tomurcuklanmaya başlamasını sağlar [1-4].

Şu ana kadar iki klatrin ve iki “coat protein (COP)” olmak üzere dört tip kılıf proteini tanımlanmıştır [5]. Ancak hangi kılıf proteini kullanılırsa kullanılsın, vezikül oluşumundaki temel mekanizmanın aynı olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden endositoz ve egzositoz için ortak olan bu mekanizma, bu kısımda anlatılacaktır.

Bu mekanizmayı ana hatları ile şöyle özetleyebiliriz [2,4,6]:

a. Kaynak membranı üzerinde yerleşmiş bir “GEF proteini” (guanin-nükleotid değiştirme faktörü), sitoplazmada bulunan kılıf oluşturucu bir proteinin üzerindeki GDP’yi GTP’ye çevirir. Kılıf oluşturucu protein klatrin kılıfı için ARF (ADP-riboseylation factor); COP II kılıfı için ise Sar 1 proteindir.

b. Kılıf oluşturuucu protein (ARF veya Sar 1), GTP bağladığı anda, içindeki bir yağ asidini açığa çıkarır ve bu yağ asidi aracılığı ile membrana bağlanır. Bir GTPaz olan kılıf oluşturuucu protein, sitozolde alt birimler halinde bulunan kılıf proteinini, membranın kendi bağlandığı bölgesine toplar. Membrana bağlanan kılıf proteinleri biraraya toplanarak sepet gibi bir yapı oluşturur ve membranın bu bölgedeki yapısını bozar. Böylece membranda bir tomurcuklanma oluşur.

Tomurcuklanma, vezikül oluşumuna yol açar ve bazı proteinlerin vezikülü boyun bölgesinden koparması ile kılıflı bir vezikül oluşur.

2. Vezikülün kılıfından sıyrılması

Kılıflı vezikülün sitozole salınmasından hemen sonra kılıf sıyrılır. Bu işlem de yine kılıf oluşturuucu GTPaz'lar (ARF ve Sar 1) tarafından başarılıdır. Bunlar, üstlerinde bağlı GTP'nin hidrolizi ile konformasyon değiştirirler, kendilerini vezikül membranına bağlayan yağ asidini geri çekerler ve vezikülden ayrılırlar. Bu proteinlerin vezikülden ayrılmasının hemen ardından bilinmeyen bir mekanizma ile kılıf depolimerize olur ve vezikül kılıfından sıyrılır [2,6,7].

3. Vezikülün hedef membranı bulması

Organellerin kendilerine özgü varlıklarını sürdürebilmeleri ve taşıma işlemlerinin başarılı bir şekilde yürütülebilmesi için vezikülün doğru hedef membranı bulması gerekir. Bu konuda Rothman tarafından ileri sürülen "SNARE hipotezi" uzun süre kabul görmüştür ve halen bazı değişmelerle kullanılmaktadır (SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor) [2,8]. Bu hipoteze göre; vezikül içindeki bir integral protein (v-SNARE) ile, onunla özgül olarak etkileşebilen bir hedef membran integral proteini (t-SNARE) arasındaki yüksek afinite ve özgül etkileşim, veziküllerin hedeflerini bulmasını sağlamaktadır. SNARE'ler sitoplazma içine sarkan ve reseptör olarak görev yapan integral proteinlerdir. SNARE'ler en çok sinir hücrelerinde çalışılmışlardır [2,9-12]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar SNARE'lerin daha çok membran kaynaşmasında etkin olduğunu düşündürmektedir [13,14].

Veziküllerin "doğru hedefi" bulmalarında etkin olduğu düşünülen bir protein grubu Rab proteinleridir [15]. Rab proteinleri veziküle tutunur ve hedef membran üzerindeki bir efektör proteinle ve SNARE'lerle özgül olarak etkileşerek SNARE kompleksinin (v-SNARE/t-SNARE kompleksi) oluşmasını sağlar. Böylece vezikül doğru hedefi bulur [6].

Ayrıca, Rab proteinlerinin, vezikül tomurcuklanma sırasında bazı bağlayıcı proteinleri (tethering proteins) SNARE kompleksi içine kattıkları, ER → Golgi yönündeki vezikülle taşınmada gösterilmiştir. Bu bağlayıcı proteinler (P115 gibi) vezikülün hedef membrana yanaşması ve kaynaşması sırasında görev yapar. Yani daha vezikül tomurcuklanırken; hedef bulma ve kaynaşma için gerekli moleküler program vezikül içine yerleştirilmektedir [16].

Karşılıklı membranlar üzerindeki SNARE'ler hidrofobik etkileşimlerle ve birbirlerine paralel yerleşerek "halkalı halka" (coiled coil) oluşturarak etkileşirler [17,18]. SNARE'lerin enerji yönünden avantajlı bir kompleks oluşturarak membran kaynaşması önündeki enerji engelini yıktıkları görüşü ağırlık kazanmıştır [19].

4. Membran kaynaşması

Vezikül, hedef membranı Rab proteini, Rab efektörü, SNARE ve bağlayıcı proteinlerin ortak hareketi ile tanır ve membrana yanaşır. Membrana yanaşma sırasında, vezikül ve hedef membranın molekülleri, birbirleri ile etkileşebilecek kadar yakındır. Membran kaynaşması için ise, membranların 1.5 nm kadar yakınlaşmaları ve aradaki su moleküllerinin atılması gerekir. Bu işlemin SNARE'ler tarafından başarılı olduğu zannedilmektedir. Birbirine bağlanacak membranlar üzerinde karşılıklı yerleşmiş bulunan, birbirlerine yüksek afiniteleri olan SNARE'ler sarmal oluşturacak şekilde bağlanırken, membranları çekerek yakınlaştırır ve kaynaşmayı sağlarlar [2,10,11].

Membran kaynaşmasında birden fazla basamağın etkin olduğu zannedilmektedir. Bunlar sırasıyla, tetiklenme, membrana yanaşma, membranların yakınlaşması, protein/lipid karışması, kaynaşma gözeneginin açılması, kaynaşma gözeneginin genişlemesi ve kaynaşma olarak sıralanabilir [8,17,18,20,21].

ENDOSİTOZ

Hücrenin plazma membranı yoluyla büyük parçacıkları, mikroorganizmaları, hatta diğer hücreleri içine almasına "hücre yemesi (fagositoz)" denir. Yine plazma membranı yolu ile sıvı ve çözülmüş moleküllerin hücre içine alınmasına "hücre içmesi (pinositoz)" adı verilmiştir. 1963 yılında De Dove'un önerisi ile bu iki olay "endositoz" adı altında toplanmıştır, ancak son yıllarda endositoz sadece pinositoz anlamında kullanılmaya başlanmıştır ve bu derlemede de o anlamda kullanılacaktır [19,22]. Endositozla içeri alınan moleküllerin bazıları, membran üzerinde yerleşmiş proteinler olan özgül reseptörlerine bağlanarak alınır ki bu işleme "reseptör-yardımlı endositoz" adı verilir. Son yıllarda yapılan en-

dositoz çalışmaları bu alanda yoğunlaşmıştır. Bu yolla, hücre dışında çok az miktarda bulunan moleküller bile seçici bir şekilde hücre içine alınabilmektedir. Hücreye kolesterol alımı bunun en iyi bilinen örneğidir [19,22].

Endositozun genel hatları

Endositoz olayını daha önce anlatılan kılıf proteinleri başlatır. Plazma membranı üzerindeki endositoz yapacak bölgelere, sitoplazmada çözünür halde bulunan kılıf proteinleri tutunur ve kılıflı çukurcuklar oluşur. Bu bölgede ligand bağlı-reseptörler ve bazı membran-aşan (transmembran) proteinler toplanır. Reseptörleri ve bazı proteinleri de içine alarak membranın bu bölgesinin sitoplazmaya kıvrılması ile bir vezikül tomurcuklanır. Vezikül membrandan kopar ve hemen kılıfından sıyrılır. Oluşan vezikül önce "erken endozom" olarak adlandırılan kompartımanla kaynaşır, sonra "geç endozoma" dönüşür veya bir görüşe göre onunla birleşir [20,23]. Geç endozom materyalinin bir kısmı Golgiye dönerken, çoğu lizozoma yönlendirilir.

Klatrin kılıflı çukurcuk oluşumu

Kılıflı çukurcukların endositozdaki rolü uzun yıllardır bilinmektedir. Endositozda kılıf proteini genellikle klatrindir. Klatrin kılıflı çukurcuklar da, daha önce anlatılan temel mekanizma ile oluşur. Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), transferrin, α_2 -makroglobulin, sialoglikoproteinler, insülin, epidermal büyüme faktörü ve polimerik IgA hücre içine bu şekilde alınır [22].

Klatrin kılıfının ana proteini klatrindir. Klatrin alt birimleri biraraya gelerek hegzagon veya pentagon şeklindeki sepetleri oluşturur [20].

Klatrin alt birimlerinin oluşturduğu poligonal sepet içinde, klatrini membrana bağlayan bir adaptör protein de (AP-2) bulunur. Bu adaptör, klatrini membrana sıkıca bağlar. AP-2'nin ayrıca, membran üstündeki sepete alınacak reseptörleri biraraya toplama gibi bir görevinin olduğu gösterilmiştir [18,21].

Endozom kompleksi

Kılıfından sıyrılmış vezikül içindeki reseptör ve ligandlar, önce endozom kompleksinin "erken endozom" olarak adlandırılan bölümüne alınır. Endozom kompleksinin yapısı, hücre tiplerinden kaynaklanan bazı farklılıklara rağmen genel hatları ile aynıdır. Bu kompleks, Golgi kompleksine yakın olmakla birlikte, transgolgiden tamamen farklıdır ve küremsi vakuoller ve vezikül-tübül biçiminde uzantılardan oluşan bir sistemdir. Erken endozom ve geç endozom gibi parçalardan oluşmuş olarak düşünülmektedir [22-24].

Endozom kompleksine giren moleküller (genellikle reseptör + ligand), hedeflerine göre dört yoldan birine girerler:

1. *Membrana dönüş (membrane recycling)*: Endositozla gerçekleşen membran kaybı, egzositoz ve membrana dönüşle dengelenir. Geri dönüş yolu ile, membrandan ayrılan reseptörlerden bazıları da tekrar membrana döner.

Yapılan çalışmalar geri dönüşün veziküllerle sağlandığını, bu veziküllerin çok küçük, şekillerinin ise yuvarlak veya boru biçiminde olabildiğini göstermiştir [25]. LDL ve transferrin reseptörleri membrana dönüş vezikülleri ile geri dönen reseptörlerin iki örneğidir [23,26].

2. *Hücre geçme (transsitoz)*: Bu olay polarize hücrelerde gerçekleşir. Hücrenin bir yüzünden (apikal gibi) endositozla alınan molekül, bir başka yüzünde (bazolateral gibi) egzositozla dışarı verilir [24,27]. Örnek olarak, sinir büyüme faktörünün ileumdan geçişini verebiliriz [25,28]. Bu olayda da kılıflı çukurcuk ve veziküllerin rol aldığı gösterilmiştir [6].

3. *Golgiye taşınım*: Transgolgi ağından endozom sistemine membran aktarımını dengeleyen endozom → Golgi yönündeki bir akış deneysel olarak gösterilmiştir [21,24].

4. *Lizozoma giriş*: Membrana endositozla alınan moleküller bir dakika içinde plazma membranı altındaki erken endozoma, 5-15 dakika içinde geç endozoma ve en sonunda da bahsedilen üç yola girmemişlerse, parçalanmak üzere hidrolitik enzim yüklü lizozoma alınır [22,29].

EGZOSİTOZ

Çeşitli hücre içi membranlara veya plazma membranına gidecek proteinler ER'de sentezlenir ve işlem görür. Sonra taşıyıcı veziküller içinde paketlenerek buradan ayrılır ve Golgi ile kaynaşır. Golgi kompleksi, proteinlerin hedeflerine göre ayrıldıkları merkez olarak kabul edilmektedir. Burada proteinler esas olarak üç farklı hedefe yönlendirilir [26,30]:

1. Lizozoma gidenler,
2. Kontrolsüz ve sürekli bir salınımla plazma membranına gidenler,
3. Kontrollü salınım için, veziküllere alınarak salınım sinyalini beklemek üzere plazma membranının yakınına gidenler.

Bu veziküller yüklerini alarak kaynak membrandan (daha önce anlatılan temel mekanizma ile) tomurcuklanır, ayrılır, hedef membrana yanaşır ve onunla kaynaşır.

Egzositozda üç kılıf proteinin görev aldığı bilinmektedir [4,27,31]. Bunlar;

1. Klatrin/adaptör kompleksi,

2. COP I,

3. COP II.

Bu kılıflar birbirinden hem protein kompozisyonu hem de etki yerleri bakımından farklıdır, ancak etki mekanizmaları benzerdir.

Klatrin kılıfının yapısından endositoz sırasında söz edilmişti. Klatrin, egzositozda da Golgiden geç endozoma giden veziküllerin tomurcuklanıp oluşmasında görev alır [4].

COP I kılıfının yapısı COP II ve klatrin kadar iyi bilinmemektedir. Klatrin kılıfı düzgün, kafes tarzı bir yapı oluşturur; COP I ise membrana bağlı "tüy gibi" yapı oluşturur. COP I, sekiz protein alt biriminden oluşmuştur (7 kotomer proteini, 1 ARF) [28,32].

COP I'in vezikül tomurcuklanmasında görev aldığı yerler ER'den Golgiye, Golginin kendi içindeki taşınım ve Golgiden ER'ye geri taşınımıdır [33].

COP II proteini bağlandığı membranda elektron-yoğun bir kılıf oluşturur. Bu kılıfın proteini, beş alt birimden oluşan bir komplekstir. COP II protein kılıfı, ER'den Golgiye giden vezikül oluşumunda görev alır [34].

ER'den Golgiye, Golginin kendi içinde ve bu organeller boyunca geri taşınım ve kullanılan sinyaller hakkında geniş bilgi için 6, 13 ve 30-34. numaralı kaynaklara başvurunuz.

Kontrolsüz salınım

Egzositozda kontrolsüz salınım yolu, bütün ökaryotik hücrelerde görülür. "ER → Golgi → transgolgi ağı" yolunu izler. Bu yol, plazma membranının protein ve lipidlerinin ve hücre dışı materyalin çoğunun sağlanma yoludur. Kontrolsüz egzositoz herhangi bir sinyal beklemeyebilir. Veziküller plazma membranına ulaştığında, hemen kaynaşarak içeriklerini membrana ve dışarıya boşaltırlar [4,6,24,30].

Kontrollü salınım [2,8,31,35]

Kontrollü salınım, sekresyon vezikülleri aracılığı ile daha özgül iş gören hücrelerde gerçekleşir. Bu veziküller, bir sinyale (mesela Ca^{++} konsantrasyonunda yükselme) yanıt olarak egzositozu gerçekleştirir. Kontrollü egzositoz; sinir ileticilerinin, hormonların, enzimlerin ve sitokinlerin salınımında kullanılır. Ayrıca; lipidlerin, reseptörlerin ve taşıyıcıların plazma membranındaki miktarını kontrolde de bu yol kullanılır.

İnsüline cevap olarak glikoz taşıyıcılarının hücre yüzeyinde belirmesi kontrollü egzositozun bir örneğidir.

Kontrollü egzositozda görev alan "salınım vezikülleri" önce "olgunlaşmamış salınım vezikülü" halinde

transgolgi ağından ayrılır. Olgunlaşmamış vezikülden, klatrin kılıflı veziküllerin ayrılarak, geç endozoma gitmesi ve asiditenin giderek artması ile içerikleri yoğunlaşır. Bunlara salınım (sekresyon) vezikülü adı verilir. Salınım vezikülleri plazma membranı yanında salınım sinyali verilene kadar bekler.

Salınım vezikülüne alınan proteinlerin seçiminin hangi sinyalle sağlandığı henüz bilinmemektedir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yapılan deneyler, salınım proteinlerinin ortak bir sinyal kullandıklarını göstermektedir.

Salınım veziküllerinin plazma membranı ile kaynaşması için gereken sinyal, genellikle hormonlar ve diğer kimyasal habercilerdir. Bunların reseptörlerine bağlanması ile hücre içi sinyaller oluşur ve salınım vezikülleri plazma membranı ile kaynaşarak egzositozu gerçekleştirir. Sinir hücrelerinde egzositoz için beklenen sinyal, aksiyon potansiyelindeki değişimdir.

Salınım vezikülleri daha önce sözü edilen mekanizma ile membran kaynaşmasını gerçekleştirdikten sonra, içerikleri hücre dışına verilir ve plazma membranının yüzey alanı geçici olarak artar. Ancak bu kısa sürer ve membran fazlası endositozla geri alınır.

SİNAPTİK VEZİKÜLLER

Kontrollü salınımın en fazla çalışılmış ve en iyi anlaşılabilmiş örneği, hücreler arası sinir iletiminde ana yol olan sinaptik iletimdir.

Nöronlar; glutamat, glisin ve asetil kolin gibi sinir ileticilerini, küçük (~50 nm çapında) sinaptik veziküllerden salırlar. Bu veziküllerin oluşumu, hedef membranı bularak yanaşması ve kaynaşması, diğer veziküller için anlatılan temel mekanizmalar ile aynıdır [9]. Sinaptik veziküllerin salınımında, kontrollü ve kontrolsüz egzositozla ortak noktalar vardır [12,36,37].

Sinir ileticileri, sinaptik veziküle sinir ucunda özel ATPaz'ların sağladığı enerji ile yüklenir. Sinaptik veziküllerin bazıları, egzositoz için membran üstündeki "aktif bölge"lere yönelirler, çoğunluğu ise sitoplazmada yedekte bekler [38]. Aksiyon potansiyelinin presinaptik sinir ucunu depolarize etmesi ile, voltaj-kapaklı Ca^{++} kanalları açılır ve Ca^{++} konsantrasyonu kanal çevresinde 100 μM 'a ulaşır. Bu olaydan 200 μs aniye sonra ve belki daha da kısa sürede egzositoz gerçekleşerek sinir ileticileri yoğun şekilde sinaptik veziküllerden salınır [39,40]. Sinir ileticilerinin salınım hızının yüksekliği, kaynaşma için gerekli elemanların, karşılıklı membranlar üstünde hazır beklediğini düşündürmektedir.

Sinaptik veziküllerin membranla kaynaşmasında, diğerlerinde olduğu gibi SNARE proteinleri ve bunlara ek olarak ATP, ATPaz NSF, Rab 3a, nSec1 ve SNAP

(synaptosomal-associated protein) proteinlerinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Sinaptik kaynaşmada etkin olan SNARE'ler, vezikül üstünde bulunan sinaptobrevin (VAMP) ve plazma membranı üzerinde bulunan sintaksin ve SNAP-25'tir [41].

Sinaptik egzozitoz Ca^{++} tarafından kontrol altında tutulur. Kontrolde sintaksin önemlidir. Sintaksin bir yandan SNAP-25 ve sinaptobrevin ile etkileşirken, diğer yandan Ca^{++} kanalları ve Ca^{++} bağlayıcı bir protein olan sinaptotagmin ile bağlantılıdır. Ca^{++} iyonunun yokluğunda sinaptotagmin, membran kaynaşmasının gerçekleşmesini engeller [41].

Sinaptik veziküller membranla kaynaştıktan sonra hızla yenilenmeleri gerektiği için; hemen endositozla geri alınır. Bazıları geri dönüş endozomu kanalı ile sinaptik vezikülü oluştururken, bazıları da klatrin kılıfından sıyrılıp hemen yedek veziküllere katılır [42].

EGZOSİTOZU AYDINLATAN TOKSİNLER: KLOSTRIDIUM NÖROTOKSİNLERİ

Klostridium nörotoksinleri, klostridium bakterisinden salınan tetanoz ve botulinum toksinleri, egzozitozu inhibe ettikleri için membran kaynaşmasında görevli proteinlerin belirlenmesinde önemli rol oynamışlardır.

Tetanoz toksininin aksine botulinum toksinleri, başka proteinlerle kompleks yaparak bağırsakta yıkıma direnir ve sağlam halde absorplanır. İnsanda beş serotipi (A, B, E, F, G) etkin olan botulinum toksinleri bakteriden tek zincir halinde salınır ve daha sonra bakteri veya konak proteazları tarafından kırılarak çift zincirli hale dönüştürülür: L ve H zincirleri. Toksik olan L zinciri, H zincirine disülfid köprüsü ile bağlı kalır. Bunlar bağırsak epitelinde geçtikten sonra lenfler yolu ile vücutta yayılır ve seçici olarak motor nöronlara bağlanır. Seçicilikleri H zincirinden kaynaklanır. Toksinler, reseptör yardımcı endositozla hücre içine alınır. Sitolde L zinciri H zincirinden ayrılır. L zincirinde, çinkoya bağımlı metalloproteazlarla ortak bir motif vardır [43].

Toksinlerin L zinciri, sinir iletiminde görevli birkaç proteini kırarak sinir ileticilerinin salınmasını engeller. Fark edilen ilk substrat, sinaptik vezikül membranının integral bir SNARE proteini olan sinaptobrevindir. Toksinler, aynı şekilde plazma membranı SNARE proteinleri olan sintaksin ve SNAP-25'i de kırar. SNAP-25 integral bir protein değildir fakat bir yağ asidi ile membrana tutunmuştur. Bu üç proteinin egzozitozdaki rolü, toksinler aracılığı ile fark edilmiştir. Tetanoz toksini ve botulinum toksininin B, D, F ve G tipleri VAMP proteini kırar. SNAP-25, botulinum toksininin A, C ve E tipleri tarafından kırılır. Sintaksin ise botulinum C tarafından kırılır [44].

Tetanoz ve botulinum toksinlerinin substratlarını inceleme yoluyla egzozitozda görev alan proteinler önemli ölçüde aydınlatılabilmektedir. Membran trafiğini anlamaya yönelik daha ileri çalışmalarda ve özellikle nöronlar arası iletişimin incelenmesinde de, yine bu toksinler kullanılmaya devam edilecek gibi gözükmektedir.

Kaynaklar

1. Pryer N, Wuestehube L, Schekman R. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:471-516.
2. Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature (Lond)* 1994; 372:55-63.
3. Barlowe CL, Orci T, Yeung M, et al. COP II: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the ER. *Cell* 1994; 77:895-907.
4. Schekman R, Orci L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 1996; 271:1526-33.
5. Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:187-98.
6. Rothman JE, Wieland FT. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 1996; 272:227-34.
7. Tanigawa G, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Helms JB, Rothman JE. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 1993; 123:1365-71.
8. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362:318-24.
9. Li L, Chin LS. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:942-60.
10. Ferro-Novick S, Jahn R. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 1994; 370:191-3.
11. Bennett MK, Scheller RH. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2559-63.
12. Hay JC, Scheller RH. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:505-12.
13. Kaiser C, Ferro-Novick S. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:477-82.
14. Nichols BJ, Pelham HRB. SNAREs and membrane fusion in Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:9-31.
15. Martinez O, Goud B. Rab proteins. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1404:101-12.
16. Brittle EE, Waters GM. ER-to-Golgi-traffic- this bud's for you. *Science* 2000; 289:403-4.
17. Hardwick KG, Pelham HRB. SED5 encodes a 39 kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *J Cell Biol* 1992; 119:513-21.
18. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, et al. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 1998; 395:347-53.
19. Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, et al. Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 1997; 272:28036-41.
20. Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:173-93.
21. Pearse BMF, Robinson MS. Clathrin, adaptors and sorting. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:151-71.

22. Van Deurs B, Petersen OW, Olsnes S, Sandvig K. The ways of endocytosis. *Int Rev Cytol* 1989; 117:131-77.
23. Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Olrrschot V, Schwartz AL. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 1991; 65:417-27.
24. Borgne RL, Hoflack B. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:195-209.
25. Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gordon P, Orci L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *J Biol Chem* 1982; 257:7936-9.
26. Brown MS, Andersen RGW, Goldstein JL. Recycling receptors. *Cell* 1983; 32:663-7.
27. Tuma PL, Hubbarol AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 2003; 83:871-932.
28. Siminoski K, Gonnella P, Barmanke J, Owen L, Neutra M, Murphy RA. Uptake and transepithelial transport of nerve growth factor in suckling rat ileum. *J Cell Biol* 1986; 103:1979-90.
29. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989; 5:483-525.
30. Füllekrug J, Nilsson T. Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:77-84.
31. Robinson MS. Coats and vesicle budding. *Trends Cell Biol* 1997; 7:99-102.
32. Lowe M, Kreis TE. Regulation of membrane traffic in animal cells by COP I. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:53-66.
33. Gaynor EC, Graham TR, Emr SD. COP I in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COP I mutants point the way? *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:33-51.
34. Barlowe C. COP II and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:67-76.
35. Tooze SA. Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404:231-44.
36. Bennett MK. Ca²⁺ and the regulation of neurotransmitter secretion. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7:316-22.
37. Gasnier B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 2000; 82:327-37.
38. Robinson LJ, Martin TFJ. Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:483-92.
39. Llinas R, Steinberg IZ, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 1981; 33:323-51.
40. Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 1991; 11:1496-507.
41. Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:19-49.
42. Murthy VN, Stevens CF. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* 1998; 392:497-501.
43. Nieman H, Blasi J, Jahn R. Clostridial neurotoxins: New tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol* 1994; 4:179-85.
44. Dolly O. Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. *Headache* 2003; 43(Suppl 1):516-24.