



Københavns Universitet



Biologiske pumper og transport i vesikler

Lopez Marques, Rosa Laura; Frøsig, Merethe Mørch; Pedas, Lisbeth Rosager; Günther-Pomorski, Thomas

Publication date:
2012

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Lopez Marques, R. L., Frøsig, M. M., Poulsen, L. R., & Günther-Pomorski, T. Biologiske pumper og transport i vesikler.



Biologiske pumper og transport i vesikler

Insektnedbrydende enzymer i kødædende planter, konkurrencefremmende stoffer, der udskilles fra rødder, og komplekse molekyler, som indgår i biosyntesen af cellevægge transporteres i membransække, som kaldes vesikler. Komplementationsforsøg i modelplanten *Arabidopsis* og gær viser, at der medvirker biologiske pumper, når vesiklerne dannes.

Af Rosa L. López-Marqués, Merethe Mørch Frøsig, Lisbeth Rosager Poulsen og Thomas Günther-Pomorski, Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Evnen til at transportere små og store molekyler fra én del af en celle til en anden eller ud af en celle er helt central for alle eukaryote organismer. Små molekyler transporteres ofte ved diffusion eller via transportkanaler i membranerne, men mange store molekyler transporteres i afsnørede membransække, som kaldes vesikler. En effektiv og målrettet vesikeltransport af byggesten, enzymer og signalmolekyler mm. er afgørende for planters vækst.

En plantes størrelse bestemmes af cellevæggene, som omslutter hver enkelt celle og som er forbundet i sammenhængende et netværk. Når planten vokser, skal cellevæggen strækkes og forstærkes, og det forudsætter transport af både byggesten og cellevæggsdannende enzymer fra cytoplasmaet via plasmamembranen til apoplasten, hvor cellevæggen dannes. Byggesten i form af glykoproteiner og komplekse polysakkarider som hemicellulose og pektin dannes i Golgi. De flere hundrede forskellige enzymer, som medvirker i biosyntesen af plantecellevægge, dannes i det endoplasmatiske retikulum (ER) og modificeres i Golgi. Både byggesten og enzymer transporteres ud til mellemrummene mellem cellerne (apoplasten) i vesikler.

Vesikeltransport har også betydning for planters evne til at optage næringsstoffer fra jorden. Rødderne udskiller rodexudater med kulhydrater, aminosyrer, organiske syrer, fedtsyrer og enzymer, som tilsammen danner et lidt slimet lag uden på rødderne. Rodexudaterne beskytter roden og dens rodhår, og nogle af stofferne fremmer samtidig opløseligheden af næringsstoffer, f.eks. fosfat, som har

lav opløselighed i jordvæsken. Kulhydrater mv. tiltrækker og ernærer mikroorganismer, som er til gavn for planten, heriblandt symbiotiske svampe, mens bioaktive stoffer frastøder eller begrænser skadelige organismers vækst. Planterødder kan også udskille bioaktive stoffer, som øger plantens konkurrenceevne ved at hæmmer andre planters



Figur 1. Kornarten durra (*Sorghum bicolor*) anvendes som foder eller fødevarer. Herover ses en forsøgsmark i Australien, hvor der foretages kontrollerede krydsninger mellem forskellige typer af durra. Fra rodhårene hos durra udskilles rodexudater, som indeholder det bioaktive stof sorgoleone, som virker væksthæmmende på andre planter. Sorgoleone inhiberer elektrontransportprocesser i fotosyntese og respiration, men det kan transporteres sikkert i durraplantens celler og udskilles til omgivelserne via vesikeltransport. Foto: Roslyn M. Gleadow.



vækst som i tilfældet med durra (Figur 1). Et mere eksotisk eksempel på vesikeltransport, er sekretion af enzymer i kødædende planter (Figur 2).

Vesikeltransport fra et sted til et andet i en celle er mindst ligeså vigtig som transport ud af cellerne. Der er f.eks. vesikeltransport af mange forskellige molekyler mellem ER, Golgi og vakuoler. Vesikeltransport fra plasmamembranen til de indre dele af cellen udgør et vigtigt led i planters forsvar. Ved angreb af insekter eller svampe dannes signalmolekyler i og omkring cellevæggen, og disse molekyler sendes ind i cellen, hvor de aktiverer plantens forsvarssystemer.

Vesikler kan ikke ses i et almindeligt lysmikroskop, så først da man kunne studere celler med elektronmikroskopi, opdagede man, at eukaryote organismer transporterer molekyler i vesikler. Med elektronmikroskopi kan man se, at der især findes mange vesikler i tilknytning til membransystemerne ER og Golgi, men man kan ikke se, hvordan vesiklerne dannes.



Figur 2. Kandedbærer er en kødædende plante, som i forlængelse af enkelte blade har en omvendt klokke, som er fyldt med et enzymholdigt sekret. Klokkens indre er beskyttet af et vokslag, så enzymerne ikke angriber planten selv. Kandedbærerne lokker insekter og andre smådyr til klokkens kant ved at udsende duftende nektar. Når insekterne forsøger at lande, glider de ned i den tykflydende og klæbrige væske, hvor de langsomt nedbrydes, så planten kan optage og udnytte næringsstofferne. Kandedbæreren producerer enzymerne i kirtler i klokkens inderside, og de transporteres i vesikler fra Golgi gennem cytosol og plasmamembran ud i klokken. Foto: Merethe Mørch Frøsig.

Mutationer, som påvirker vesikeldannelse

Studier af forskellige organismer, der som følge af mutationer har mistet evnen til at danne vesikler, kan bidrage til at opklare, hvilke gener, der er involverede i vesikeldannelse, og hvordan de proteiner, som generne koder for, fungerer.

Gærstamme uden vesikler

Ofte bruges gær (*Saccharomyces cerevisiae*) som modelorganisme, når man studerer grundlæggende mekanismer i flercellede eukaryote organismer. Gær er velegnet til studier af vesikeldannelse, fordi gærceller har mange af de samme indre membransystemer som plante- og dyreceller.

Amerikanske forskere studerede for år tilbage en muteret gærstamme, som mangler evnen til at danne vesikler. De fandt en mutation i genet *DRS2*, som koder for en biologisk pumpe (Drs2p). Forskere fra Københavns Universitet har ved hjælp af bioinformatiske undersøgelser vist, at Drs2p tilhører en særlig type membranpumper, som kaldes P_4 -ATPaser. P_4 -ATPaser tilhører én ud af fem underfamilier af P-type ATPaserne, hvoraf mange har helt centrale funktioner i levende celler (Boks 1). Studierne af den muterede gærstamme uden *DRS2* viste, at gær skal bruge en funktionel P_4 -ATPase for at kunne danne vesikler. Disse resultater ledte frem til hypotesen, at P_4 -ATPaser spiller en central rolle for alle eukaryoters evne til at danne vesikler. Sekvensen fra *DRS2* i gær blev brugt til at søge efter tilsvarende gener i dyr og planter i sekvensdatabaser over alle offentlige DNA- og aminosyresekvenser.

Mutationer hos rundorme, mus og mennesker

Rundormen *Caenorhabditis elegans* er en almindeligt brugt modelorganisme, som har et meget lille genom. Aminosyresekvensen for P_4 -ATPasen TAT-1 i *C. elegans* ligner sekvensen for Drs2p. Muterede varianter af *C. elegans*, som mangler TAT-1, har flere defekter, som er relaterede til vesikeldannelse. For eksempel kan de ikke danne specialiserede vesikler, som er involveret i import af næringsstoffer fra tarmen.

Mus, som har et defekt gen for P_4 -ATPasen Atp8b3, har også en fænotype, der viser sammenhæng mellem udtryk af en P_4 -ATPase og evnen til at danne vesikler. Atp8b3 er specifikt udtrykt i sædceller. I det yderste af hovedet på en sædcelle fra mus sidder en membranstruktur, som kaldes akrosomet. Når sædcellen møder en ægcelle, sprænges akrosomet, og derved frigives enzymer, der gør sædcellen i stand til at fusionere med ægcellen. Akrosomet bliver dannet ved akkumulering af vesikler fra Golgi. Hos hammus, som mangler P_4 -ATPasen Atp8b3, er vesikeldannelsen i Golgi defekt, og akrosomet er misdannet.

Hos mennesker kan en mutation i genet ATP8B1 give problemer med udskillelse af galde fra leveren til tarmsystemet. Galde er en kompleks væske, som bl.a. indeholder miceller, som dannes ved fusion af galdehyresalte





Boks 1. P-type ATPaser - funktion, placering of struktur

ATPaser er en fællesbetegnelse for mange forskellige enzymer, der spalter ATP. Nogle ATPaser er biologiske pumper, der transporterer forskellige substrater henover en membran. En stor familie af disse pumper har en fosforyleret intermediær form i den katalytiske cyklus, og denne proteinfamilie kaldes derfor P-type ATPaser. P-type ATPaser opdeles i fem underfamilier efter, hvilke molekyler de transporterer eller antages at transportere.

P_1 -ATPaserne transporterer tungmetaller, f.eks. zink- og cadmiumioner. P_2 -ATPaserne omfatter to grupper, der begge transporterer ioner, enten Ca^{2+} eller Na^+/K^+ . P_3 -ATPaserne transporterer protoner og kaldes derfor også H^+ -ATPaser. Der er evidens for, at P_4 -ATPaser er involveret i transport af fosfolipider, men transportmekanismen er ikke opklaret endnu. Der er endnu ikke identificeret substrater, som transporteres af P_5 -ATPaser.

P_1 -, P_2 - og P_3 -ATPaserne findes i alle kendte levende organismer, mens P_4 - og P_5 -ATPaserne kun findes i eukaryoter. De fleste af de P-type ATPaser, som kendes i dag, findes i mikroorganismer, heraf mange prokaryoter. I nedenstående figur er underfamilierne placeret, så afstanden mellem dem illustrerer graden af lighed. Det samlede antal kendte P-type ATPaser på tværs af arter er illustreret ved størrelsen af underfamilierne.

P_4 -ATPaserne udgør den største underfamilie i flere eukaryote organismer. Modelplanten *Arabidopsis thaliana* indeholder f.eks. 12 P_4 -ATPaser ud af i alt 45 P-type ATPaser. Den udbredte forekomst af P_4 -ATPaser i eukaryoter tyder på, at de har en vigtig fysiologisk funktion.

De bedst undersøgte P_4 -ATPaser er fra gær (*Saccharomyces cerevisiae*). Gær indeholder fem P_4 -ATPaser, som findes i forskellige membransystemer. To af P_4 -ATPaserne fra gær er lokaliseret i Golgi (Drs2p og Dnf3p), to i plasmamembranen (Dnf1p og Dnf2p) og en (Neo1p) er lokaliseret i specialiserede vesikler.

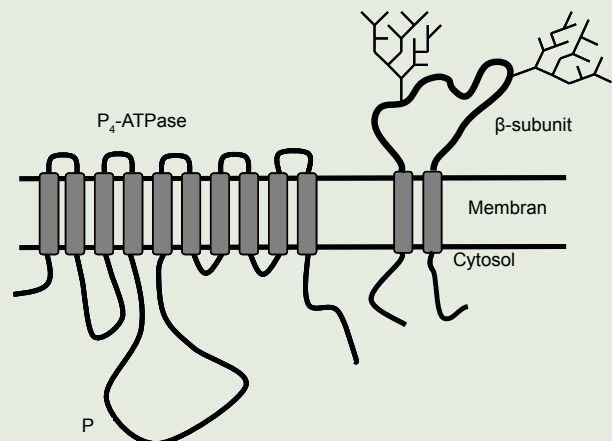
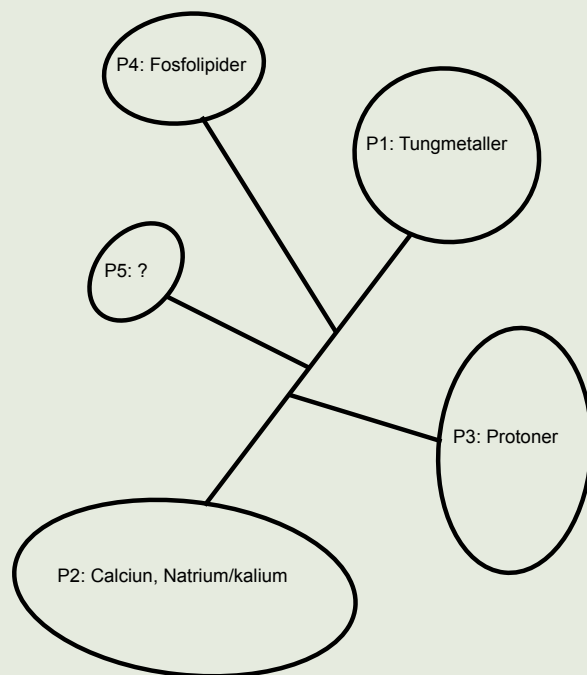
Rundormen *Caenorhabditis elegans* har seks P_4 -ATPaser, TAT-1 til TAT-6. TAT-1, TAT-2 og TAT-5 findes i plasmamembranen. TAT-1 er bl.a. involveret endocytose, mens TAT-5 medvirker til dannelselse af extracellulære vesikler i embryoet. De øvrige er ikke karakteriserede.

Der er identificeret 14 humane P_4 -ATPaser, hvoraf kun få er karakteriserede. Heraf er Atp8b1 blevet lokaliseret til plasmamembranen, og Atp8b3 til Golgi.

De 12 P_4 -ATPaser i *Arabidopsis* betegnes ALA1-ALA12 (for Aminophospholipid ATPase 1 til 12). Ni af disse (ALA4-ALA12) ligner hinanden meget, hvilket tyder på, at de har overlappende funktioner. ALA3 findes i Golgi og ALA2 findes i specialiserede vesikler, som transporterer forskellige stoffer ind i vakuolerne.

P_4 -ATPaser har flere aminosyremotiver tilfælles med de øvrige underfamilier af P-type ATPaser, men de har også motiver, som er specifikke for P_4 -ATPaser. For eksempel har P_4 -ATPaserne hydrofobe aminosyrer i stedet for de anioniske (negativt ladede) aminosyrer, som er involveret i substratbinding hos de P-type ATPaser, som transporterer kationer. Det stemmer overens med hypotesen om, at P_4 -ATPaser transporterer fosfolipider.

Analyse af aminosyresekvenserne og modellering af proteinernes struktur viser, at P_4 -ATPaser har 10 transmembrane domæner og to store loops på den cytosoliske side af membranen ligesom de øvrige P-type ATPaser. De fleste P_4 -ATPaser danner kompleks med et andet protein, en β -subunit, som ikke har en katalytisk funktion. De β -subunits, som findes sammen med P_4 -ATPaser, har to transmembrane domæner og et loop, som er glykosyleret.





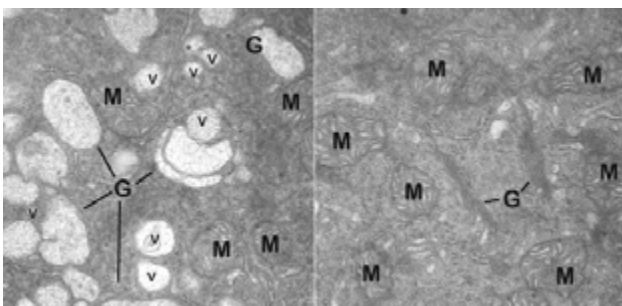
med fosfolipidvesikler, som kommer fra leveren. Hvis man mangler den P_4 -ATPase, som ATP8B1 koder for, kan man ikke optage fedtstoffer og vigtige vitaminer. Symptomerne hos patienter med denne arvelige sygdom (Bylers sygdom) er fejlnæring og leverskader. Bylers sygdom forekommer generelt meget sjældent, men ses oftere hos visse etniske befolkningsgrupper.

Mutation i modelplanten Arabidopsis

Databasesøgninger har vist, at modelplanten Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; almindelig gåsemad) har 12 forskellige P_4 -ATPaser. Kun få af de mutanter, som mangler



Figur 3. Arabidopsis, som mangler P_4 -ATPasen ALA3, har svagere vækst og meget kortere rødder end vildtypen. Vildtypen (tv) og mutanten ala3-4 (th) er dyrket i et gennemsnitligt dyrkningssubstrat i petriskåle, så man kan se rødderne.



Figur 4. Elektronmikroskopi af områder med Golgi i rodceller fra Arabidopsis vildtype (tv) og mutanten ala3-4 (th). I både mutant og vildtype ses mitokondrier (M) og Golgi (G), mens vesikler (v) kun ses i vildtypen. Normalt findes mange vesikler (v) i tilknytning til ER og Golgi, men Arabidopsis, der mangler P_4 -ATPasen ALA3, danner langt færre vesikler end vildtypen. Ved elektromikroskopi får man ikke farvebilleder, men man kan observere vesikler med forskellige grå nuancer i rodceller fra vildtypen. Det tyder på, at de forskelligt farvede vesikler transporterer forskelligt indhold.

en eller to af disse ATPaser har en tydelig fænotype ved dyrkning under optimale forhold, men nogle af dem kan f.eks. få kortere rødder, hvis planterne stresses.

Hos Arabidopsis, der mangler P_4 -ATPasen ALA3, er der en tydelig fænotype. ALA3-mutanten er væsentlig mindre end vildtypen, og dens rødder vokser meget langsommere (Figur 3). Ved elektronmikroskopi af celler i rødderne ses tydeligt, at planter uden ALA3 har problemer med at danne vesikler (Figur 4). Fænotypen (korte rødder og langsom vækst) kan bl.a. skyldes, at planter bruger vesikler til transport af enzymer og byggesten til syntese af cellevæggen. Når der indsættes et funktionelt ALA3-gen i mutanten, vokser rødderne ligesom hos vildtypen.

Flip af fosfolipider og vesikeldannelse

Den membran, der afgrænser en vesikel, består ligesom andre membraner af to lag fosfolipider, som har hydrofile hovedgrupper og hydrofobe haler. En vesikel på 60 nm i diameter har ca. 50% flere fosfolipider i den ydre side af membranen end i den indre. Der må derfor ske en transport af fosfolipider fra den indre side af membranen til den cytosoliske side, når der dannes en vesikel i en celle. Vesikeldannelse menes at foregå ved, at der vokser en 'knop' ud fra membranen, og at denne knop bliver til en vesikel (Figur 5).

Det antages, at eukaryote celler danner vesikler ved hjælp af specifikke proteiner, som får fosfolipider til at "flippe" til den cytosoliske side af plasmamembranen eller golgimembranen. Proteiner med denne enzymaktivitet kaldes "flippaser", mens proteiner, der transporterer fosfolipider den modsatte vej, kaldes "floppaser". Selvom enzymaktiviteten er beskrevet, kan der være lang vej til identifikation af det eller de proteiner, som har den pågældende aktivitet.

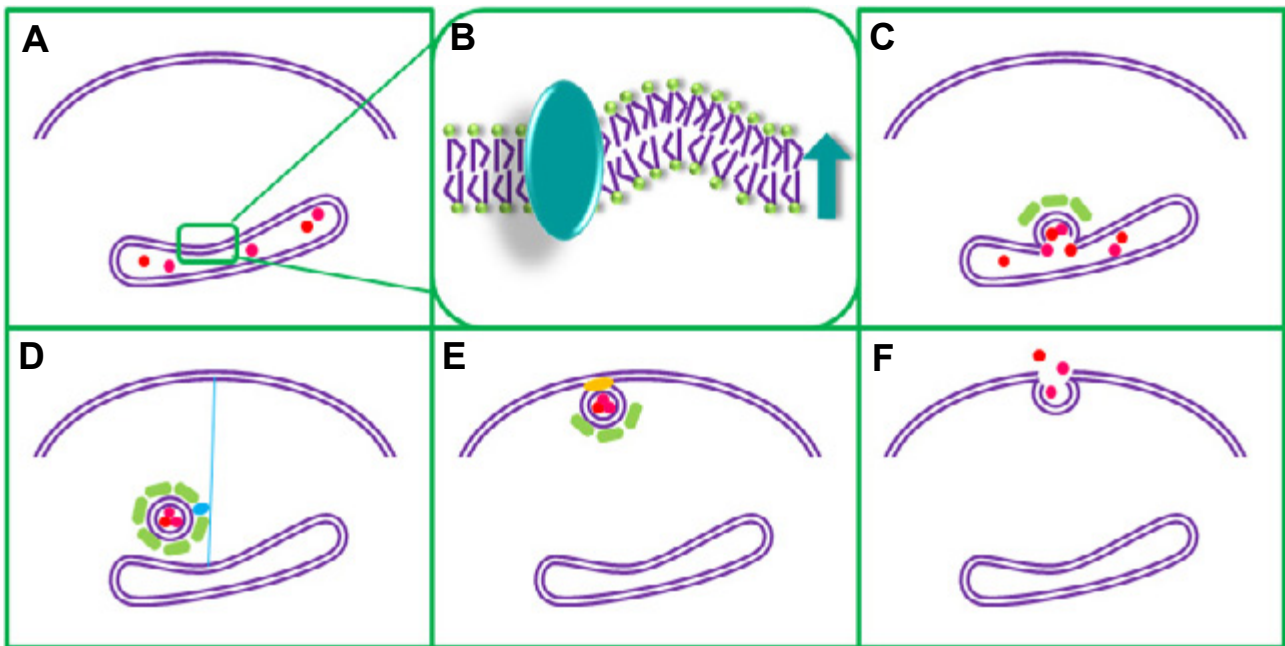
Er en flippase en P_4 -ATPase?

Studierne af mutanter af gær, dyr og planter viser, at P_4 -ATPaser er nødvendige for dannelse af vesikler i både encellede og flercellede eukaryoter, men det er endnu ikke klarlagt, hvordan P_4 -ATPaserne medvirker til processen. Har P_4 -ATPaser flippase-aktivitet, eller leverer de blot energi til et andet enzym, når de spalter ATP?

Vores mål er at finde ud af, hvordan P_4 -ATPaser medvirker til vesikeldannelse i planter. I følge vores model dannes vesikler ved, at en P_4 -ATPase flipper fosfolipider til den cytosoliske side af en membran (Golgi, vakuole og plasmamembran mm.). I følge vores hypotese er specifikke P_4 -ATPaser direkte involveret i vesikeldannelse, fordi de har flippase-aktivitet og transporterer fosfolipider til den cytosoliske side af en membran.

Vi har fokuseret på vesikeldannelse fra Golgi, fordi der dannes mange vesikler fra dette membransystem. Af de 12 P_4 -ATPaser, som findes i Arabidopsis, er kun ALA3 blevet lokaliseret til Golgi, og kun ALA3-mutanten mangler vesikler, så derfor har vi studeret dette protein i detaljer. Vi





Figur 5. Model for dannelsen af vesikler og direkte transport fra Golgi til plasmamembranen. Golgi ses som en pølseformet struktur og plasmamembranen som en 'halvcirkel' (A). Golgi indeholder molekyler (røde prikker), der skal sendes ud af cellen. I følge vores hypotese dannes vesikler ved, at der transporteres (flippes) fosfolipider fra den inderste side af Golgis membranen (lumen) til den cytosoliske side ved brug af energi fra spaltning af ATP (B). Pilen indikerer den retning, som flippasen transporterer fosfolipiderne. Den voksende vesikel bliver beskyttet af en kappe af proteiner (grøn) (C). Vesiklen transporteres langs cytoskelettet til plasmamembranen (D) ved at binde til et protein (blå), der kan vandre langs cyto-skelettet. Et proteinkompleks (gul) binder vesiklen helt tæt til plasmamembranen, og den beskyttende proteinkappe fjernes, når vesiklen ankommer til plasmamembranen (E). Vesiklens membran fusioneres med plasmamembranen, og indholdet udskilles til omgivelserne (F).

anvender bl.a. komplementationsforsøg i gær (Boks 2) til at undersøge funktionen af ALA3.

Flippaser og membran-asymmetri

Membraner består hovedsageligt af fosfolipiderne fosfatidylcholin (PC), fosfatidylserin (PS) og fosfatidylethanolamin (PE). Når en membran dannes i ER, er der lige mange af de fleste fosfolipider på begge sider af membranen. I Golgi og plasmamembranen er der asymmetri, fordi flippaser hele tiden transporterer PE og PS til cytosolsiden af membranen. Mutanter, som mangler disse flippaser, kan ikke etablere denne asymmetri.

Fænotype af gær uden Drs2p

I vildtypen af gær findes PS og PE primært på plasmamembranens cytosoliske side. I gær, som mangler P_4 -ATPase Drs2p, findes PS og PE også på den ydre side. Forskellen viser sig fænotypisk ved, at vildtypen i modsætning til mutanten kan vokse på et dyrkningsmedium, som indeholder de toksiske peptider duramycin og papuamid. Disse peptider binder til PS og PE i plasmamembranens ydre lag hos mutanten, så der dannes huller i membranen.

Komplementationsforsøg

Vi indsatte et plasmid med genet for P_4 -ATPase ALA3 fra Arabidopsis i den muterede gærstamme, der mangler

Drs2p (Boks 2). Dette komplementationsforsøg viste, at ALA3 alene ikke kan erstatte Drs2p i gær, men når ALA3 udtrykkes sammen med en β -subunit, kan Drs2p-mutanten vokse på et dyrkningsmedium med toksiske peptider ligesom vildtypen. Vi har testet tre forskellige ALA3-interagerende β -subunits (ALIS1, ALIS3 og ALIS5) med samme resultat. ALA3 virker altså sammen med forskellige β -subunits fra planten, men ikke sammen med, den β -subunit fra gær, som virker sammen med Drs2p.

Grundforskning til nytte for industri

Forskningsresultaterne viser, at P_4 -ATPaser er nødvendige for vesikeldannelse i gær, dyr og planter, og at P_4 -ATPase ALA3 sammen med en β -subunit er nødvendig for vesikeldannelse i Arabidopsis. Forsøg med fluorescerende fosfolipider viser, at Drs2p sammen med sin β -subunit fra gær kan flippe fosfolipider til den cytosoliske side af en membran. Disse resultater understøtter vores hypotese: at specifikke P_4 -ATPaser er direkte involverede i vesikeldannelse, fordi de har flippase-aktivitet.

Vi mangler et eksperimentelt bevis på, at det er selve lipidtransporten i et specifikt område på en membran, der er den direkte årsag til dannelse af vesikler, og vi mangler at vise, at en P_4 -ATPase sammen med en β -subunit har flippase-aktivitet uden andre medvirkende faktorer. Vi forsøger nu at oprense store mængder af ALA3-ALIS1-proteinkomplekset med henblik på at teste dets funktion i





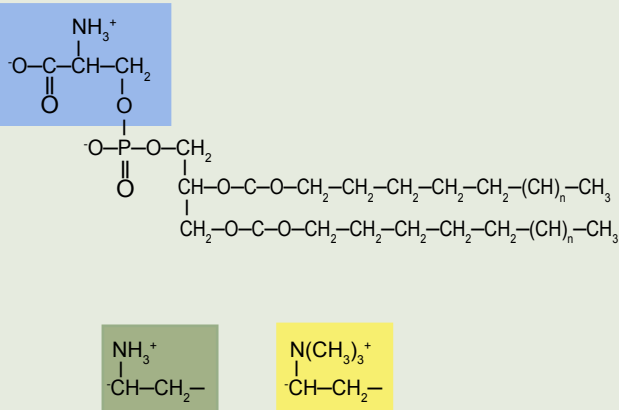
Boks 2. Komplementationsforsøg i gær

Enzymer med en grundlæggende biologisk funktion i en kompleks flercellet organisme kan ofte udføre en tilsvarende funktion i en anden eukaryot organisme. Ofte anvendes gær som modelorganisme, når enzymer fra en plante analyseres i komplementationsforsøg.

Der anvendes en mutant af gær, der mangler et gen, og som har en genkendelig fænotype som følge af den genetiske defekt. Fænotypen kan f.eks. være kuldefølsomhed eller manglende evne til at vokse på et bestemt dyrkningsmedium. Hvis et gen fra en flercellet organisme kan erstatte det manglende gen, vil den komplementerede mutant vokse på samme måde som vildtypen.

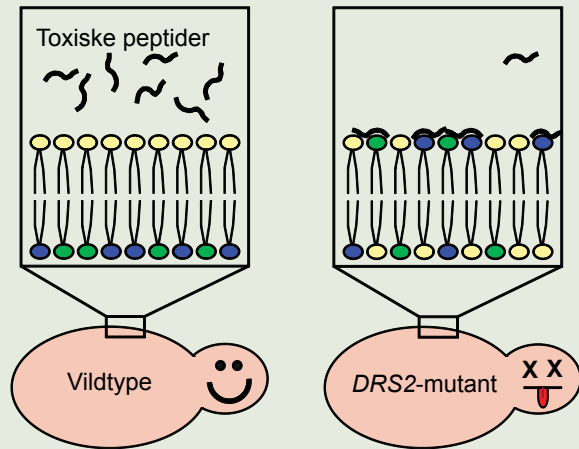
Vi har brugt komplementationsforsøg i gær til at undersøge om P₄-ATPasen ALA3 fra *Arabidopsis* kan erstatte P₄-ATPasen Drs2p, som har flippase-aktivitet i gær. Hvis det er tilfældet, vil det understøtte vores hypotese om, at ALA3 medvirker til vesikeldannelse i planter på samme måde, som Drs2p gør i gær.

I vildtypen af gær er plasmamembranens fosfolipider ordnet, så det ydre lag fortrinsvis består af fosfatidylcholin (PC), mens den cytosoliske side består af fosfatidylserin (PS) og fosfatidylethanolamin (PE). I molekylstrukturen herunder er fosfolipidernes hovedgrupper markeret med gult (PC), grønt (PE) eller blåt (PS).



Gærmutanten, som mangler Drs2p, kan ikke transportere PE og PS til den cytosoliske side af plasmamembranen. Det ydre lag af plasmamembranen hos mutanten indeholder således både PC, PE og PS.

Den manglende evne til at transportere PE og PS fra yderside til den cytosoliske side af plasmamembranen kan detekteres ved hjælp af de toksiske peptider duramycin og papuamid. Disse peptider binder til hhv. PE og PS men ikke til PC. Vildtypen kan derfor vokse, selvom disse toksiske peptider tilsættes til dyrkningsmediet, mens DRS2-mutanten dør.



For at sikre, at det ikke er andre genetiske defekter, der forårsager fænotypen hos gærmutanten, laves først et komplementationsforsøg, hvor et plasmid, som indeholder DRS2, indsættes i mutanten. Herunder ses kolonier af gær, som er dyrket med (th) eller uden (tv) toksiske peptider i dyrkningsmediet. Når det testes om planteproteinet ALA3 kan erstatte Drs2p, indsættes et plasmid med ALA3-genet i gærmutanten, som mangler genet DRS2.



Øverst ses mutanten, derefter vildtypen og nederst ses mutanten med et intakt DRS2 på et plasmid. Dyrkningsforsøget viser, at mutanten kan vokse ligesom vildtypen, når den har fået indsat et plasmid med DRS2.



Øverst ses vildtypen, derefter mutanten. I række 3 ses DRS2-mutanten med ALA3 fra *Arabidopsis* på et indsat plasmid. I række 4, 5 og 6 ses DRS2-mutanten med ALA3 mutanten sammen med en β -subunit, hhv. ALIS1, ALIS3 og ALIS 5. Resultaterne af dyrkningstesten viser, at ALA3 ikke kan komplementere fænotypen, medmindre der samtidig indsættes et gen, som koder for en af de tre β -subunits (ALIS1, ALIS3 eller ALIS5), der danner kompleks med P₄-ATPaser i planter.

På baggrund af komplementationsforsøgene i gær kan vi konkludere, at et proteinkompleks bestående af ALA3 og et ALIS-protein kan medvirke til flippase-aktivitet på samme måde som Drs2p i gær, men vi kan ikke afvise, at ALA3-komplekset interagerer med andre proteiner i gær.





kunstige membransystemer. Hvis vi kan se vesikeldannelse i kunstige membraner, vil vi have det endelige bevis på, at P₄-ATPasen ALA3, danner vesikler ved at katalysere transport af fosfolipider til den cytosoliske side af en membran, og vi vil kunne identificere eventuelle andre medvirkende faktorer.

Vesikeldannelse og transport samt sekretion er vigtige processer for alle eukaryote organismer. Af ren grundvidenskabelig interesse, ønsker vi at identificere alle involverede proteiner samt at klarlægge, hvordan vesikler dannes. Vores forskning har dog også et anvendt perspektiv. Størstedelen af de enzymer, som produceres i industrien, transporteres ud af produktionsorganismene i vesikler. Ved at modificere vesikeldannelse og sekretion kan produktionen af enzymer og andre bioaktive stoffer optimeres, og det kan både give en økonomisk og en ressourcemæssig gevinst.

Også i landbruget kan vores grundforskning få betydning, omend på længere sigt. Med et indgående kendskab til biosyntese af bioaktive stoffer i planter og transporten af dem, kan der udvikles afgrøder, som har bedre konkurrenceevne overfor ukrudt og et bedre forsvar overfor sygdomme og skadedyr.

Referencer og videre læsning

- López-Marqués RL, Holthuis JCM, Günther-Pomorski T (2011) Pumping lipids with P4-ATPases. *Biological Chemistry* 392:67-76
- López-Marqués RL, Poulsen LR, Hanisch S, Meffert K, Buch-Pedersen MJ, Jakobsen MK, Pomorski TG, Palmgren MG (2010) Intracellular Targeting Signals and Lipid Specificity Determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase Complex Reside in the Catalytic ALA α -Subunit. *Molecular Biology of the Cell* 21:791-801
- López-Marqués RL, Poulsen LR, Palmgren MG (2012) A putative plant aminophospholipid flippase, the Arabidopsis P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a β -subunit. *PLoS One* 7:e33042. doi:10.1371/journal.pone.0033042
- Palmgren MG, Axelsen KB (1998) Evolution of P-Type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1365:37-45.
- Palmgren MG, Nissen P (2011) P-Type ATPases. *Annual Review of Biophysics* 40:243-66
- Pomorski T, Lombardi R, Riezman H, Devaux PF, van Meer G, Holthuis JCM (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p Are Required for Phospholipid Translocation across the Yeast Plasma Membrane and Serve a Role in Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 14:1240-1254
- Pomorski T, Holthuis JCM, Herrmann A, van Meer G (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *Journal of Cell Science* 117: 805-813
- Poulsen, LR, López-Marqués, RL, McDowell, SC, Okkeri, J, Licht, D, Schultz, A, Pomorski, T, Harper, JF & Palmgren, MG (2008). The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the Golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *The Plant Cell* 20: 658-676

Peng X, Okkeri J, Hanisch S, Hu RY, Xu Q, Pomorski TG, Ding XY (2009). Identification of a novel mouse P4-ATPase family member highly expressed during spermatogenesis. *Journal of Cell Science* 122: 2866-2876

Om forfatterne



Rosa L. López-Marqués studerede kemi og har en ph.d. i biokemi og molekylærbiologi (2004) fra Sevilla Universit i Spanien. Hun påbegyndte sin forskning i planters biologiske pumper og membraner ved Københavns Universitet samme år via et Marie Curie postdoc fellowship og blev lektor i 2012.



Merethe Mørch Frøsig afsluttede sit kandidatstudium i Biologi-Bioteknologi ved Københavns Universitet i 2010. I december samme år påbegyndte hun sit ph.d. studium med støtte fra Det Frie Forskningsråd til at studere fysiologisk funktion og regulering af lipidflippaser.



Lisbeth Rosager Poulsen blev cand. agro. i 2004 og afsluttede sin ph.d. i 2008 indenfor plantefysiologi med fokus på P-type ATPaser. Hun har siden 2008 arbejdet som postdoc med speciale i flippaser, hvor gær bruges som modelorganisme og værktøj til at udtrykke og karakterisere planteflippaser.



Thomas Günther-Pomorski studerede biofysik ved Humboldt Universitetet i Berlin, hvorfra han også har sin ph.d. (1996). Frem til 2008, hvor han blev ansat som lektor på Københavns Universitet, havde han postdoc ansættelser, hvor han fokuserede på medicinske aspekter af membraners biofysik.

Finansiering af forskningen

Forskningen i planters P₄-ATPaser er støttet af Forskningsrådet for Natur og Univers, Lundbeck, Carlsberg og Danmarks Grundforskningsfond.

