

## ЕТАПИ ЕКЗОЦИТОЗУ В БЕЗКЛІТИННІЙ СИСТЕМІ ЗА УМОВ ВИЛУЧЕННЯ ХОЛЕСТЕРОЛУ ІЗ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ ТА СИНАПТИЧНИХ ВЕЗИКУЛ

В. П. ГУМЕНЮК, І. О. ТРИКАШ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: trikash@biochem.kiev.ua*

*В безклітинній системі досліджували вплив холестеролу на процес екзоцитозу. Для зміни вмісту мембранного холестеролу використовували метил- $\beta$ -циклодекстрин. Показано, що вилучення холестеролу з мембран залежить від концентрації метил- $\beta$ -циклодекстрину, часу інкубації та температури середовища. Роль холестеролу вивчали на етапах докінгу синаптичних везикул та їхнього  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульованого злиття, які є складовими процесу мультивезикулярного (складного) екзоцитозу. Методом лазерно-кореляційної спектроскопії встановлено, що за вилучення холестеролу із синаптичних везикул процес їх агрегації або докінгу залишається незмінним. Виявлено, що кінетика  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульованого злиття синаптичних везикул між собою залежить від вмісту холестеролу. Зниження вмісту холестеролу у плазматичних мембранах синаптосом на 8% призводить до інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного злиття їх із синаптичними везикулами. Але у разі видалення 25% холестеролу із плазматичних мембран рівень злиття із синаптичними везикулами не різниться від контролю, можливо, за рахунок зміни фізичних властивостей ліпідного бішару та/або порушення функцій мембранозв'язаних протеїнів. Передінкубація синаптосом із метил- $\beta$ -циклодекстрином зменшувала стимульоване вивільнення глутамату на 32%. Одержані дані свідчать про те, що концентрація холестеролу у плазмалемі та синаптичних везикулах є важливим фактором ефективності синаптичної передачі в нервових закінченнях.*

*Ключові слова: екзоцитоз, злиття мембран, холестерол, синаптичні везикули, синаптосоми.*

**П**роцес екзоцитозу відбувається в декілька етапів: наближення синаптичних везикул (СВ) до плазматичної мембрани, їхній докінг, активація, кальційініційоване злиття із плазмалемою та вивільнення нейромедіатора у пресинаптичну щілину. Для забезпечення ефективної передачі сигналу в нейронах визначальним є етап злиття СВ із плазматичною мембраною, який потребує злагодженої дії протеїнових та ліпідних компонентів. У секреторних клітинах мембранозв'язані протеїни, зокрема SNARE, Rab ГТР-ази тощо, асоціюють із ліпідними мікродоменами, які збагачені на холестерол та сфінголіпіди і функціонують як динамічні утворення та виявляють регуляторний вплив на процес секреції [1–5].

У нейронах більшість холестеролу клітини локалізовано у плазматичній мембрані, хоча його концентрація в СВ вища, ніж у плазмалемі [6, 7]. Здатність холестеролу до спонтанної самоорганізації та формуванню холестерол- та сфінгомієлінзбагачених мікродоменів впливає на розподіл протеїнів та ліпідів у специфічних клітинних компартментах

[8–11]. Холестерол підтримує високу кривизну поверхні везикули та рідиноупорядкований стан мікродоменів мембрани [12–14], що забезпечує регуляцію функціонування іонних каналів, транспортерів та рецепторів [15–18]. Показано, що в регуляції етапів екзоцитозу також задіяні цитозольні протеїни пресинапси, зокрема Sec/Munc 18 та їхні гомологи, які зв'язуються з SNARE-протеїнами родини синтаксинів, що локалізовані в холестеролнасичених мікродоменах мембран клітин PC12 [2, 3, 19], клітин підшлункової залози [20] та синаптосом головного мозку щурів [21, 22].

Маніпуляції із вмістом холестеролу дозволили визначити вплив рівня холестеролу на перебіг процесу екзоцитозу в різних секреторних клітинах [23–25]. У разі видалення холестеролу з ліпідних бішарів зменшується мікрор'язкість, що призводить до зростання плинності мембрани і зумовлює зміни у функціонуванні мембранозв'язаних протеїнів [26]. Для зміни рівня мембранного холестеролу використовують водорозчинний агент метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) [27, 28]. Внутрішня гідрофобна кишеня в молекулі МЦД зумовлює

його здатність акумулювати холестерол, а поверхнева гідрофільність молекули циклодекстрину – розчинність у водному середовищі.

Роль мембранного холестеролу в реалізації окремих етапів екзоцитозу є маловивченою. У попередніх дослідженнях з використанням безклітинної модельної системи було ідентифіковано два етапи процесу екзоцитозу: агрегація СВ (без злиття їхніх мембран), що імітує *in vitro* етап докінгу;  $\text{Ca}^{2+}$ -ініційоване злиття СВ із плазматичними мембранами синапсом (злиття гетеротипних мембран) або СВ між собою (злиття гомотипних мембран) [29–31]. Формування комплексів між секреторними везикулами є характерним для складної форми екзоцитозу [32]. Метою нашої роботи було дослідити, як впливає зменшення рівня холестеролу в синапсомах та їхніх мембранних структурах на агрегацію СВ, на  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульоване злиття СВ із плазматичними мембранами синапсом або СВ між собою та на вивільнення глутамату.

### Матеріали і методи

Флуоресцентний зонд R18 (октадецил-родамін Б хлорид) – Molecular Probes, США;  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  (додециловий ефір октаетиленгліколю) – Calbiochem-Behring, США; Трис, метил- $\beta$ -циклодекстрин, АТР (аденозин-5'-трифосфат) – Sigma, США; сефадекс G-75 – Фармація, Швеція; скловолкнисті фільтри Whatman GF/C – Whatman, Велика Британія; ЕГТА (етиленгліколь-біс ( $\beta$ -аміноетиловий ефір)-N, N'-тетраоцтова кислота), сахароза – Реакім, Україна.

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар з масою тіла 200–250 г, яких утримували у звичайних умовах віварію з вільним доступом до їжі та води. Евтаназію їх проводили згідно з міжнародними нормативами гуманного ставлення до тварин.

**Одержання фракції цитозолу, плазматичних мембран та СВ із синапсом.** СВ, плазматичні мембрани та цитозольну фракцію виділяли із синапсом головного мозку щурів методом де Лоренцо [33] у модифікації Л. І. Колчинської зі співавторами [34]. Фракцію грубих синапсом виділяли з гомогенату головного мозку п'яти щурів (загальна маса приблизно 7 г), використовуючи метод диференційного центрифугування.

Із лізату грубих синапсом методами градієнтного та диференційного центрифугування отримували фракції плазматичних мембран, СВ та цитозолу. Фракцію СВ очищали фільтруванням суспензії крізь скловолкни-

тий фільтр Whatman GF/C. Чистоту фракції СВ контролювали за допомогою маркера плазматичних мембран  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТР-ази [34].

### Дослідження злиття мембранних структур.

Злиття мембранних структур кількісно визначали методом флуоресцентної спектроскопії, який базується на зміні величини самогасіння флуоресценції зонду R18 [35]. Флуоресценцію зонду вимірювали при 37 °С та за постійного перемішування на спектрофлуориметрі Hitachi 650 10S, за довжини хвилі збудження 560 нм та емісії 580 нм. Для зменшення впливу світлорозсіювання між кюветою і реєструючою частиною приладу встановлювали фільтр, що відсікає хвилі із довжиною до 530 нм. Одержані методом спектрофотофлуориметрії дані було обчислено та представлено типовими кривими.

До 1 мл цитозольної фракції синапсом (1 мг протеїну/мл) в середовищі 1 мМ ЕГТА, 10 мМ трис-НСІ, рН 8,1 додавали 3–10 мкл суспензії R18-вмісних СВ (0,8 мг протеїну/мл) та 20–60 мкл СВ (2 мг протеїну/мл) або 10 мкл суспензії плазматичних мембран синапсом (3 мг протеїну/мл). У всіх експериментах злиття мембранних структур індукували  $10^{-5}$  М  $\text{Ca}^{2+}$ . Концентрацію вільного кальцію в середовищі вираховували, зважаючи на присутність ЕГТА у розчині.

**Вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату.** Суспензію синапсом (концентрація протеїну 2 мг/мл) в розчині стандартного буфера (126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ HEPES, рН 7,4, 10 мМ d-глюкози), що містить іони  $\text{Ca}^{2+}$ , інкубували 10 хв при 37 °С, потім додавали 500 нМ L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату (1 нмоль/мг протеїну, 238 мКі/ммоль) та інкубували протягом 10 хв при 37 °С. Після інкубації з L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутаматом суспензію розводили 10 об'ємами охолодженого стандартного сольового розчину, центрифугували 10 хв при 4000 g, далі осад ресуспендували в тому самому буфері при 4 °С та використовували для експериментів (концентрація протеїну 4 мг/мл).

Суспензію синапсом розводили стандартним  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісним сольовим буфером до концентрації 0,5 мг/мл. Вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату здійснювали таким чином: 125 мкл синапсом преінкубували 10 хв при 37 °С, додавали 5 мкМ кальцієвого іонофору А 23187 та інкубували протягом 6 хв, після чого швидко осаджували на мікроцентрифузі (20 с при 10 000 g). Аліквоти надосадової рідини (100 мкл) змішували із сцинтиляційною рідиною ACS (1,5 мл) та визначали радіоактивність за допомогою лічильника радіоактивності Tracor Analytic Delta 300. Підвищення рівня позаклітинного

L-[<sup>14</sup>C]-глутамату під час інкубації попередньо завантажених міченим нейромедіатором синапсом при 37 °С протягом різних часових інтервалів визначали як нестимульоване (базальне) вивільнення L-[<sup>14</sup>C]-глутамату. Рівень вивільнення нейромедіатору визначали як відсоток від загального вмісту міченого L-[<sup>14</sup>C]-глутамату. Результати представлено як середній відсоток  $\pm$  квадратична похибка середнього значення ( $M \pm m$ ). Вірогідність оцінювали з допомогою *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали дані при  $P < 0,05$ .

**Умови вилучення холестеролу із плазматичних мембран синапсом та СВ.** Зміну рівня холестеролу в мембранах проводили за допомогою агента метил- $\beta$ -циклодекстрину (МЦД.) Для зменшення рівня холестеролу у плазматичних мембранах застосовували МЦД у концентраціях 2,5, 15, 30 та 40 мМ, а для суспензії СВ у концентраціях 5 та 15 мМ.

Суспензії мембран (2 мг протеїну/мл) інкубували з відповідними концентраціями МЦД за постійного перемішування протягом 30 хв, але при різних температурах – 37 °С для плазматичних мембран та 25 °С для СВ. У подальшому для повного видалення МЦД суспензію плазматичних мембран центрифугували 15 хв при 20 000 g, осад удруге промивали буферним розчином (0,32 М сахарози, 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5).

СВ відділяли від МЦД методом гел'фільтрації на колонці із сефадексом G-75 довжиною 5 см та внутрішнім діаметром 1 см. СВ виходили з вільним об'ємом.

**Визначення рівня холестеролу.** Екстракцію ліпідів із СВ або плазматичних мембран здійснювали методом Даєра [36]. Фракцію вільного холестеролу виділяли методом одномірної ТШХ з використанням системи бензол : етилацетат : льодова оцтова кислота (85 : 15 : 1). Кількісне визначення холестеролу проводили згідно з методом Бойла [37] або методом газорідинної хроматографії на приладі HGRC 5300 Carlo Erba Instruments (Італія). Використовували колонку, заповнену шималітом із фазою OV-1 1,5%, довжиною 0,5 м та внутрішнім діаметром 3 мм при постійній температурі 250 °С.

**Дослідження агрегації СВ методом лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС).** Розмір СВ та їх агрегацію досліджували, використовуючи систему Zetasizer Nano (Malvern 4700, Велика Британія) з гелій-неоновим лазером «ЛГ-111» потужністю 25 мВт та довжиною хвилі 632,8 нм. Прилад Malvern 4700 UK реєструє сигнал розсіювання світла під кутом 90°. Для

визначення розміру частинок в середовищі застосовували програмне забезпечення S 4700, PCS V.1.61, Rev.1, Malvern Instruments LTD 2002. Інтенсивність світлорозсіювання зростає у разі додавання в кювету, яка містила 950 мкл цитозольної фракції синапсом (1 мг протеїну/мл), 50 мкл суспензії СВ (50 мкг протеїну). Вплив МЦД на агрегацію СВ вимірювали при 15 мМ МЦД в середовищі цитозольної фракції синапсом із СВ. Вимірювання проводили при кімнатній температурі.

### Результати та обговорення

**Зменшення рівня холестеролу у плазматичних мембранах синапсом та СВ після інкубації з метил-циклодекстрином.** Для вилучення холестеролу з мембрани синапсом головного мозку щурів потрібно було визначити оптимальні умови інкубації суспензії мембран з агентом МЦД: залежність вилучення холестеролу від концентрації МЦД, від часу інкубації та температури середовища.

За норми рівень загального холестеролу у плазматичній мембрані синапсом складає близько  $0,67 \pm 0,07$  мкмоль/мг протеїну. Під час інкубації фракції плазматичних мембран синапсом із різними концентраціями МЦД (2,5, 15, 30 та 40 мМ) протягом 30 хв при 37 °С рівень вилучення холестеролу зростає зі збільшенням концентрації агента (таблиця).

Як видно з таблиці, найбільше зменшення рівня холестеролу (на 55%) у плазматичних мембранах синапсом спостерігається у разі використання 40 мМ МЦД. Згідно з даними літератури вилучення більше ніж 30% холестеролу від загального вмісту призводить до руйнівних змін у мембрані, тому в подальших експериментах ми використовували МЦД у нижчих концентраціях.

Для того, щоб з'ясувати оптимальний час передінкубації плазматичних мембран із МЦД, суспензію мембран інкубували з 15 мМ МЦД від 10 до 180 хв при 37 °С. Як видно з рис. 1, А, вміст холестеролу в мембранах синапсом залежить від часу інкубації з агентом. Протягом 30 хв інкубації з МЦД інтенсивність вилучення холестеролу є достатньо високою, але надалі цей процес поступово починає сповільнюватись, що вказує на його нелінійний характер у часі.

Що ж до впливу температури, то як показано на рис. 1, Б, з підвищенням температури відсоток вилучення холестеролу з мембрани значно зростає. Таким чином, нами було підібрано умови інкубації плазматичних мембран з МЦД – 30 хв при 37 °С.

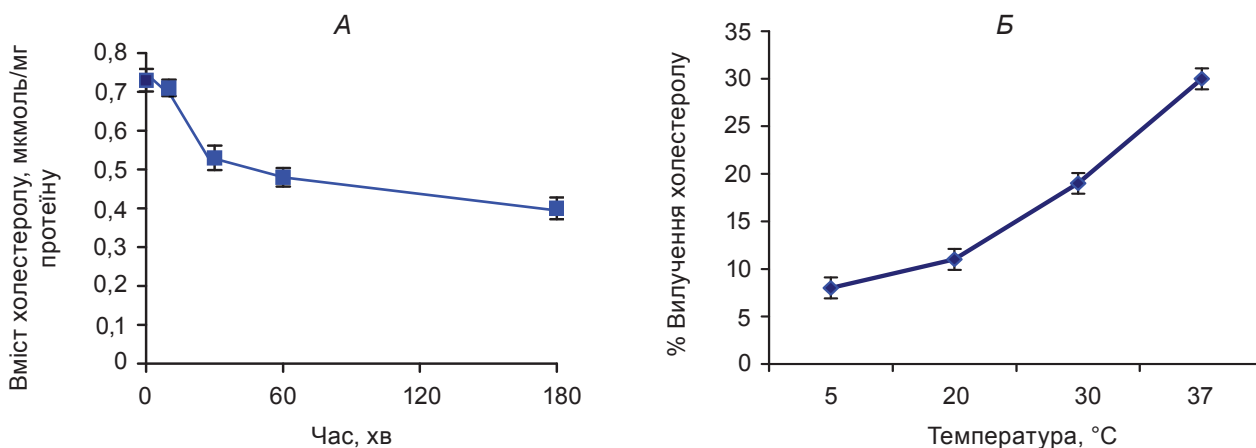


Рис. 1. Рівень вилучення холестеролу із плазматичної мембрани синапсом залежить від часу (А) та температури інкубації (Б). Концентрація МЦД в середовищі інкубації становила 15 мМ. Аналогічний тип залежності від температури і часу інкубації спостерігається у разі застосування МЦД в концентрації 2,5 мМ

Згідно з одержаними результатами концентрація холестеролу в СВ становить 0,88 мкмоль/мг протеїну, що свідчить про вищий вміст холестеролу в мембрані СВ порівняно із плазматичними мембранами. На рис. 2 показано, що після обробки суспензії СВ МЦД (5 та 15 мМ) рівень холестеролу знижується та становить 0,7 мкмоль/мг протеїну та 0,52 мкмоль/мг протеїну відповідно. Таким чином, за визначених умов інкубації СВ з МЦД 5 мМ агента вилучає з СВ 20% загального холестеролу, а 15 мМ МЦД – 40%.

**Агрегація СВ в умовах зменшеного рівня холестеролу в мембрані.** Раніше методом ЛКС було встановлено, що за відсутності іонів кальцію в середовищі, яке містить цитозольні протеїни синапсом, СВ можуть створювати агрегати діаметром 100–300 нм [31]. У рамках цього дослідження було продемонстровано, що розподіл розмірів частинок у суспензії контрольних СВ знаходиться в межах 150–200 нм (рис. 3, А). Після інкубації суспензії СВ з 15 мМ МЦД розподіл розмірів частинок в середовищі не змінюється і знаходиться в діапазоні 130–180 нм (рис. 3, Б). Таким чином, в системі гомотипних мембран СВ показано, що у разі вилучення холестеролу із СВ процес їх агрегації або докінгу залишається незмінним.

**Ca<sup>2+</sup>-ініційоване злиття СВ із плазматичними мембранами зі зменшеним рівнем холестеролу.** Для зменшення рівня холестеролу у плазматичних мембранах спочатку було використано МЦД в концентрації 2,5 мМ. Така концентрація агента призводить до зменшення рівня холестеролу не більше ніж на 10% від загального (таблиця). На рис. 4 показано, що рівень ініційованого кальцієм злиття між СВ та плазматичними мембранами зі зменшеним на 8% рівнем загального холестеролу знижується порівняно з контролем. На 4-й хвилині спостереження рівень злиття СВ та плазматичних мембран за норми складає 24%, тоді як злиття СВ з обробленими 2,5 мМ МЦД плазматичними мембранами сягає на 4-й хвилині 14% від максимального. Тобто в експериментах *in vitro* вилучення 8% холестеролу із плазматичних мембран синапсом призводить до зниження рівня їх Ca<sup>2+</sup>-залежного злиття із СВ майже вдвічі.

Цілком логічно було з'ясувати вплив вилучення більшої кількості холестеролу із плазматичної мембрани на процес їхнього злиття з СВ. Як видно з таблиці, 25% холестеролу вилучається після передінкубації плазматичних мембран з 15 мМ МЦД, що було використано в подальших дослідженнях. Рівень

Вилучення холестеролу із плазматичних мембран синапсом під час інкубації з різними концентраціями МЦД протягом 30 хв при 37 °C

Концентрація МЦД, мМ	2,5	15	30	40
Вилучення холестеролу із плазматичних мембран синапсом, % від контролю	8 ± 2	25 ± 4	40 ± 5	55 ± 5

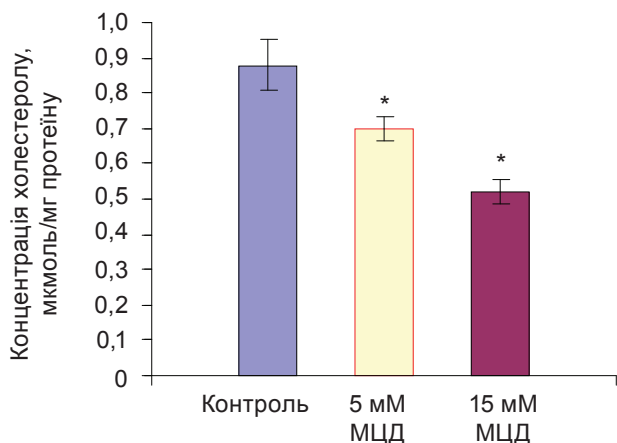


Рис. 2. Рівень загального холестеролу в СВ після обробки їх 5 та 15 мМ МЦД. Суспензію СВ інкубували із вказаними концентраціями агента МЦД протягом 30 хв при 25 °С за постійного перемішування. Холестерол визначали як описано в методах.  $P < 0,05$

злиття СВ та плазматичних мембран із зниженим на 25% рівнем загального холестеролу не відрізняється від контрольного дослідження (рис. 5). Цей неочікуваний результат вказує на відсутність кореляції між рівнем холестеролу у плазматичних мембранах та їхньою здатністю до  $\text{Ca}^{2+}$ -регульованого злиття. Можна припустити, що значне вилучення холестеролу

(близько 25%) призводить до зміни структури мембрани, а саме підвищення її плинності, що прискорює злиття мембран і заважає реєстрації процесу, що досліджується.

**Вплив вилучення холестеролу з СВ на їх  $\text{Ca}^{2+}$ -ініційоване гомотипове злиття.** Як було продемонстровано нами раніше в експериментах *in vitro*, СВ здатні до гомотипного або мультивезикулярного злиття у відповідь на додавання  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ [30].

В рамках цієї роботи було досліджено вплив зменшення холестеролу в мембранах СВ на процес  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного їхнього злиття. В експериментах були використані СВ з рівнем холестеролу меншим на 20 та 40% від контрольного. Як видно з рис. 6, у разі додавання кальцію до суспензії контрольних СВ (без інкубації з МЦД) у середовищі цитозольної фракції синаптосом, рівень злиття мембран на 4-й хв складає 20% від максимального. В умовах вилучення 20% холестеролу рівень гомотипового злиття СВ на 4-й хвилині сягає 15%, а за вилучення 40% холестеролу цей процес ще більше уповільнюється і дорівнює 10% від максимального.

Отже показано, що вилучення холестеролу з СВ пригнічує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне злиття їхніх мембран, що може бути обумовлено порушенням функції протеїнів, які опосередковують цей процес.

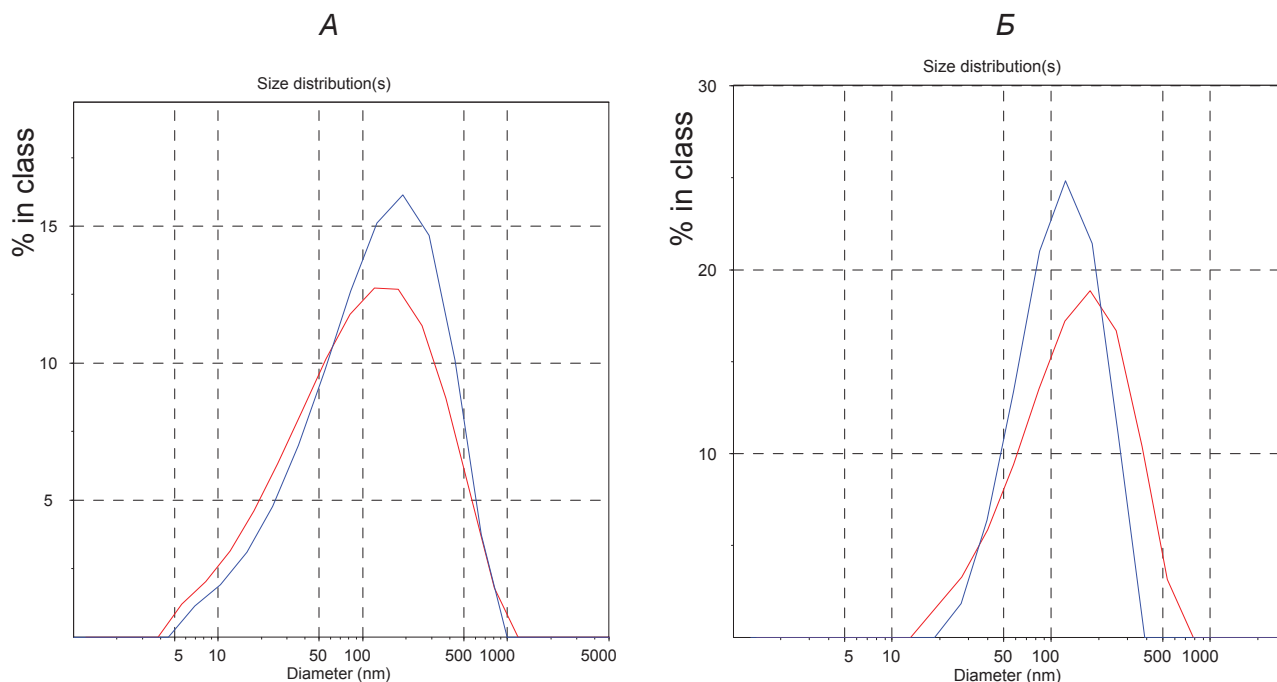


Рис. 3. Розподіл розмірів частинок в контрольній суспензії СВ (А) та обробленій 15 мМ метил-циклодекстрину (Б). Криві на кожному рисунку описують результати двох послідовних вимірювань

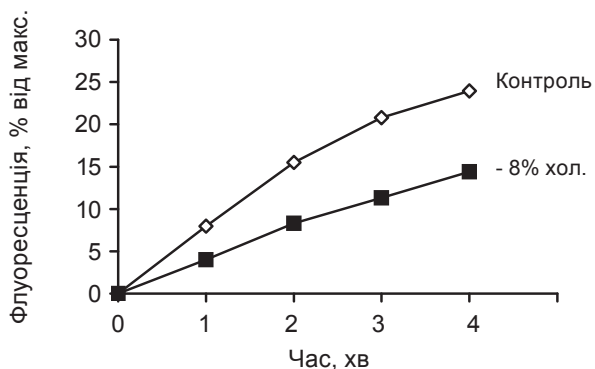


Рис. 4.  $Ca^{2+}$ -ініційоване злиття СВ з плазматичними мембранами зі зменшенням на 8% рівнем загального холестеролу. Тут і на рис. 5, 6 дані представлені типовими кривими

**Стимульований екзоцитоз глутамату за умови зменшення вмісту холестеролу в синаптосомах.** СВ та плазматичні мембрани, які ізольовані із синапсом, являють собою модельну систему, що дозволяє досліджувати регульоване злиття ліпідних бішарів мембран — етап екзоцитозу, який передуює викиду нейромедіатора. Для вивчення процесу вивільнення нейромедіатора використовували ізольовані нервові терміналі з головного мозку (синаптосоми), які попередньо навантажували міченим L-[ $^{14}C$ ]-глутаматом. Процес екзоцитозу стимулювали додаванням іонофору А 23187, що ініціювало вхід іонів кальцію з позаклітинного середовища в синаптосоми. Вплив холестеролзв'язуючого агента МЦД на  $Ca^{2+}$ -стимульоване вивільнення глутамату з'ясували в умовах обробки синапсом МЦД в концентрації 15 мМ. Як встановлено нами раніше, інкубація плазматичних мембран із 15 мМ МЦД, що призводить до вилучення 30% холестеролу, не впливає на злиття плазматичних мембран із СВ (рис. 3). На рис. 7 показано, що вивільнення [ $^{14}C$ ]-L-глутамату із синапсом із контрольним рівнем холестеролу та після їхньої передінкубації з 15 мМ МЦД протягом 30 хв при 37 °C є різним. Під час обробки синапсом МЦД рівень стимульованого викиду нейромедіатора зменшується на 32% порівняно з контролем. Отже, на відміну від безклітинної системи на синапсосомах у разі зміни вмісту холестеролу зафіксовано інгібування процесу екзоцитозу.

У нервових терміналях холестерол обумовлює злагоджену роботу протеїнів СВ та нейрональної плазмалеми, що відповідають за передачу сигналу в ЦНС [38].

Рівень вилучення холестеролу з мембрани залежить від концентрації МЦД, часу інкубації, температури та типу клітин [23–25, 27]. Було встановлено, що обробка нейронів 10 мМ МЦД зменшувала рівень холестеролу не тільки у плазматичній мембрані, але й опосередковано в мембрані СВ, що призводило до збільшення спонтанного злиття СВ та вивільнення нейромедіаторів [39]. Слід зазначити, що інкубація з МЦД мембранних фракцій має перевагу перед нативними клітинами, тому що дозволяє уникнути перерозподілу холестеролу у внутрішньоклітинних компартментах.

Відомо, що МЦД видаляє холестерол як із ліпідних мікродоменів, так і з мембрани в цілому. В деяких видах клітин в умовах короткого терміну інкубації або дуже низької концентрації МЦД зареєстровано вибіркоче вилучення холестеролу з ліпідних доменів мембрани, яке не призводило до зміни рівня холестеролу за їхніми межами [40]. Зазвичай для зменшення рівня холестеролу застосовують МЦД в концентраціях від 1 до 15 мМ, але в умовах однакових концентрацій МЦД та часу інкубації цей процес у різних типів клітин відрізняється і його важко прогнозувати [27, 41–43]. З погляду на це, нам достеменно зменшити рівень холестеролу у плазматичній мембрані синапсом нижче ніж на 5% було складно.

Під час інкубації клітин з 5–15 мМ МЦД протягом більше ніж 2 год з мембрани вилучалось близько 80–90% загального холестеролу, внаслідок чого клітини втрачали свою морфологію і життєздатність [41, 42]. Разом з тим, життєздатність нейронів не була порушена після передінкубації їх з 15 мМ МЦД протягом 1 год при 37 °C [44]. За дії високих концентрацій циклодекстрину було зареєстровано гемоліз

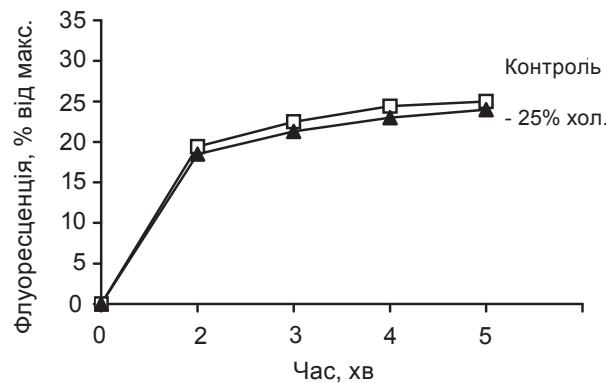


Рис. 5. Рівень  $Ca^{2+}$ -ініційованого злиття СВ та плазматичних мембран зі зменшенням на 25% рівнем холестеролу

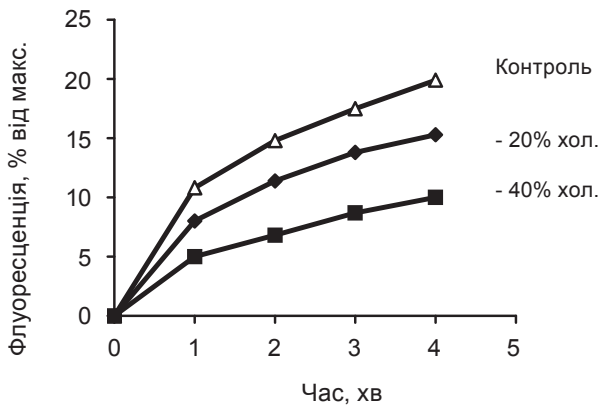


Рис. 6.  $Ca^{2+}$ -залежне злиття СВ з різним вмістом холестеролу в мембранах

еритроцитів [45]. Після інкубації клітин НерG2 з 5 мМ МЦД протягом 2 год відбувалось незначне вивільнення розчинного протеїну цитозолу лактатдегідрогенази, яке свідчило про збереженість цілісності мембрани клітин [46]. При цьому, така сама концентрація МЦД (5 мМ) видала з нейронів гіпокампа за 15 хв при 37 °С близько 70% холестеролу [47], а 3 мМ МЦД вилучав із плазматичних мембран альвеолярних клітин 2-го типу близько 50% холестеролу [48]. Використання МЦД в концентраціях від 2,5 до 40 мМ дозволили нам встановити рівні вилучення холестеролу із фракції плазматичних мембран синапсом (таблиця). Як видно, рівень зменшення холестеролу не має прямої залежності від концентрації МЦД. Рис. 1 демонструє прогнозоване нами зростання вилучення холестеролу з мембран у часі та з підвищенням температури середовища.

Важливо мати на увазі, що МЦД може не тільки вилучати холестерол із клітинної мембрани, але й деякі інші її складові. У разі застосування високих концентрацій (10 мМ або вище) МЦД може індукувати перенесення та перерозподіл фосfolіпідів у мембранних доменах, що заважає дослідженню ролі холестеролу у клітинних процесах [49–51]. Разом з цим показано, що МЦД, порівняно з іншими ліпідами бішару, має найвищу спорідненість до холестеролу [27, 28, 52].

На сьогодні проведено багато досліджень, які допомогли з'ясувати молекулярні механізми екзоцитозу в нейронах, проте роль холестеролу на етапі докінгу СВ розкрита недостатньо. Надлишок холестеролу у плазматичних та везикулярних мембранах секреторних клітин стабілізує структуру ліпідних мікродомів, в яких зібрані протеїни, зокрема SNARE, що

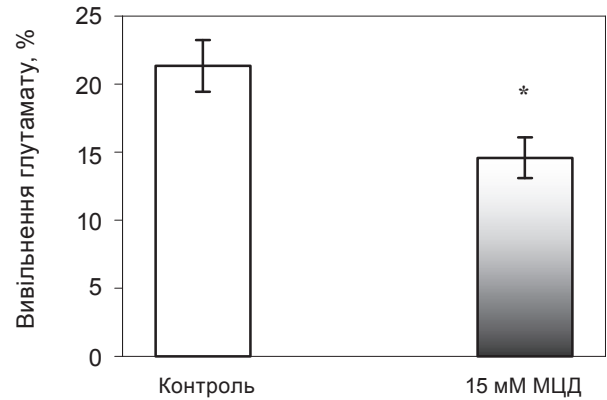


Рис. 7. Вплив зміни вмісту холестеролу в синапсах на екзоцитоз нейромедіатора глутамату. Вивільнення  $L$ - $[^{14}C]$ глутамату із синапсом з контрольним рівнем холестеролу (1) та передінкубованих з 15 мМ МЦД протягом 30 хв при 37 °С (2). Вивільнення медіатора ініціювали додаванням 5 мкМ іонофору А 23187. За 100% приймається загальний рівень радіоактивності міченого глутамату, акумульованого синапсами. \*  $P < 0,05$

визначають місця докінгу та злиття [2, 3, 48]. Протеїни синаптобrevін та синаптотагмін були охарактеризовані як докінг-фактори СВ [53–55]. Разом з тим встановлено, що цитозольні протеїни Sec1/Munc18-1 [56] зв'язуються з нейрональним SNARE-комплексом [57] і разом із синтаксином-1 забезпечують реалізацію процесу докінгу СВ [58, 59]. Значення холестеролу в регуляції етапів праймінгу та докінгу було досліджено на дріжджах [60, 61] та на клітинах PC12 [62]. Нами виявлено специфіку агрегації або докінгу СВ *in vitro*, яка вказує на те, що зменшення рівня холестеролу не впливає на холестеролоточені протеїни СВ, які задіяні в цьому процесі (рис. 3).

Саме тепер холестеролзбагачені мікродомени плазмалеми нейронів у комплексі із протеїнами синтаксином та SNAP 25 розглядають як динамічні модулі, які сприяють ефективній передачі сигналу в синапсі [8, 9, 63]. Показано, що зменшення вмісту холестеролу у плазмалемі клітин лінії PC12 за допомогою МЦД руйнує кластери синтаксину та інгібує KCl-індуковане вивільнення дофаміну і GFP-міченого нейропептиду Y [2, 3]. Після обробки 15 мМ МЦД острівців  $\beta$ -клітин спостерігалась латеральна дифузія протеїну SNAP 25 з мікродомів, при цьому вивільнення інсуліну зменшувалось на 20% [64].

Загальновідомий факт, що на здатність ліпідних бішарів до злиття впливає плинність

мембрани, яка, у свою чергу, визначається вмістом холестеролу і збільшується у разі зниження його рівня. Враховуючи це, ми проводили подальші експерименти із фракцією плазматичних мембран синапсом, відсоток вилучення холестеролу в яких був різним, але не перевищував 30%.

Під час вилучення 8% загального холестеролу із плазматичної мембрани синапсом рівень ініційованого кальцієм злиття мембран із СВ зменшується порівняно з контролем (рис. 4). Такі зміни на етапі злиття мембран, вірогідно, спричинюють інгібування процесу екзоцитозу в цілому, який, як показано, корелює з вилученням мембранного холестеролу. Так, в екзокринних клітинах, таких як натуральні кілери (NK), в клітинах PLB-985 (neutrophil promyelocytic cells) та RBL-2H3 (basophil leukemia cells) вилучення холестеролу пригнічувало гранулярний екзоцитоз [65–67]. В епітеліальних альвеолярних клітинах 2-го типу обробка їх МЦД інгібувала секрецію легеневого сурфактанту [48]. Подібно до цього в епітеліальних клітинах нирок (MDCK) апікальний екзоцитоз блокувався у разі зменшення холестеролу [68]. Тобто залежність процесу екзоцитозу від рівня холестеролу, згідно з нашими даними, може бути наслідком розладу етапу злиття мембран.

На відміну від викладеного вище, за значного видалення холестеролу із плазматичної мембрани синапсом (зменшенні на 25%) рівень  $Ca^{2+}$ -індукованого злиття їх із СВ не відрізняється від контролю (рис. 5). Відомо, що у разі вилучення великої кількості холестеролу порушуються загальні фізичні властивості ліпідних бішарів, такі як латеральний фазовий розподіл та тиск, фазовий перехід із гелю до рідинно-кристалічного стану. Одночасно змінюється плинність та кривизна мембрани, знижується енергетичний бар'єр та формуються інтермедіати злиття [69–71]. Інакше кажучи, вилучення значної кількості холестеролу з мембран змінює структуру ліпідних бішарів, яка підвищує їхню здатність до злиття. Зазначимо, що в мікродоменах мембрани зменшення холестеролу призводить до зміни конформації та функціонування протеїнів, зокрема SNARE і, як наслідок, до інгібування злиття мембран [2–5]. Тобто ми спостерігаємо два супутні процеси, дія яких взаємно компенсується: підвищення рівня злиття мембран за рахунок зміни фізичних властивостей бішару та зменшення рівня злиття через порушення функції мембранних протеїнів (рис. 5). Таким чином, одержані дані не дають однозначної

відповіді щодо впливу передінкубації плазматичних мембран з 15 мМ МЦД на перебіг їх кальційзалежного злиття з СВ. Подібні дані було одержано на  $\beta$ -клітинах: МЦД в концентрації 5 мМ і вище не змінював викид інсуліну, хоча при концентрації МЦД 0,1 мМ, спостерігалось інгібування екзоцитозу [72].

У дослідженнях низки авторів було показано, що за фізіологічних умов може існувати складна форма секреції, яка відбувається у два етапи. На першому етапі такого екзоцитозу, секреторні везикули можуть зливатися між собою, що призводить до утворення мультивезикулярних структур в районі плазматичної мембрани [32]. Це пояснюється тим, що в деяких клітинах протеїни плазматичної мембрани t-/Q-SNARE також є присутніми на мембрані везикули, що призводить до розпізнавання між t-/Q-SNARE та везикулярними v-/R-SNARE протеїнами [73, 74]. На другому етапі сформовані мультивезикулярні структури зливаються із плазматичною мембраною, наслідком чого є реалізація мультивезикулярного екзоцитозу. У безклітинній системі нами було відтворено перший етап мультивезикулярного екзоцитозу – стимульоване злиття ізольованих СВ [31].

Встановлено, що в СВ локалізовано щонайменше дев'ять класів протеїнів, які задіяні в процесах накопичення медіатора, його зберігання та вивільнення [75, 76]. Ліпідний склад мембрани СВ має певну схожість зі складом плазматичної мембрани синапсом, але є відмінності – СВ збагачені на кислі фосфоліпіди та містять більшу кількість холестеролу [77]. У плазматичній мембрані нейронів молярне співвідношення холестеролу до фосфоліпідів складає 0,44, а в СВ – 0,58. Молекули холестеролу, які мають конусоподібну форму, сприяють утворенню негативної (випнутої) кривизни мембрани СВ, яка не може бути сформована тільки молекулами фосфоліпідів. Взаємозв'язок між холестеролом, кривизною мембрани та функціонуванням протеїнів SNARE було продемонстровано в системі великих багаточарових ліпосом [78].

На ізольованих кортикальних везикулах, які виділяли з яєць морського їжака, було показано взаємозв'язок між рівнем холестеролу в комплексі кортикальна везикула-плазмалема та кінетикою їхнього  $Ca^{2+}$ -залежного злиття [19]. У культурі нейронів зменшення холестеролу в СВ під впливом інгібіторів синтезу холестеролу (мевастатину та зарагозної кислоти) призводить до інгібування їх екзоцитозу [38].



В нашій системі зміни в кінетиці злиття СВ між собою також корелюють зі зменшенням холестеролу в мембрані (рис. 6).

Зауважимо, що в дослідженнях процесу докінгу СВ, за умови видалення холестеролу з мембрани СВ, нами не було виявлено змін у процесі їхньої агрегації (рис. 3). Ці дані можуть свідчити про те, що зміни у мембранних протеїнах СВ, які локалізовані у збагачених холестеролом доменах, не є однаково важливими для реалізації різних етапів екзоцитозу *in vitro*.

Слід зазначити, що після інкубації СВ або плазматичних мембран з 15 мМ МЦД кількість вилучення холестеролу подібна і становить 30–40%, але рівень  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого злиття цих мембран із міченими зондом СВ різний (рис. 5, 6). Згідно з результатами, наведеними на рис. 6, та зважаючи на високий вміст холестеролу в мембрані СВ, можна припустити, що вилучення 40% холестеролу не призводить до таких структурних порушень везикулярної мембрани, які б могли підвищити їхню здатність до злиття.

Оскільки існує інтерес до холестеролзбагачених мікродоменів у структурній організації екзоцитозної машини, наявність їх у мембрані різних типів клітин досі залишається під питанням [79]. Не існує єдиної думки щодо формування протеїнів СВ у кластери в межах ліпідних мікродоменів везикулярної мембрани. Площа поверхні СВ (близько 8000 нм<sup>2</sup>) та розмір ліпідних доменів (від 10 до 200 нм) вказують про можливість утворення холестеролзбагачених мікродоменів у мембрані СВ. Наразі пропонується таке уявлення, що мембрана СВ нагадує бруківку, де протеїни організовані у групи і оточені щільним кільцем ліпідів, яке не нагадує «протеїни-айсберги, які плавають в морі ліпідів» [6]. Згідно з нашими результатами, одержаними в безклітинній системі, та з дослідженнями екзоцитозу в нервових клітинах можна стверджувати, що холестерол обумовлює функціональну придатність СВ до злиття.

Порушення процесу вивільнення нейромедіаторів із синапсом, які було одержано з нейронально диференційованої клітинної лінії PC12 та з головного мозку щурів, зареєстровано після зменшення рівня холестеролу агентом МЦД [2–5, 19–21]. Застосування МЦД блокувало синаптичну передачу в нервовом'язовому з'єднанні рака [80]. Як видно з рис. 7, в умовах передінкубації синапсом з 15 мМ МЦД стимульоване вивільнення глутамату інгібується на 32% порівняно з контро-

лем, що вказує на високу чутливість процесу екзоцитозу до рівня холестеролу у плазмалемі синапсом та узгоджується з даними авторів, які продемонстрували інгібування викиду медіаторів після передінкубації синапсом з 50 мМ МЦД [21]. Слід зазначити, що за таких умов інкубації синапсом (50 мМ) зміна рівня холестеролу призводить до солюбілізації протеїнів Munc-18, SNAP 25, синаптотагміну 1, 2 та синаптофізину з ліпідних мікродоменів. У наших експериментах за дії 15 мМ МЦД не було кореляції між злиттям мембран (рис. 4) та викидом медіатору із синапсом (рис. 7). На нашу думку, ця розбіжність зумовлена тим, що за однакової концентрації МЦД в інкубаційному середовищі кількість вилученого холестеролу із фракції плазматичних мембран та із плазмалемі суцільних синапсом різняться.

Дослідження механізмів  $\text{Ca}^{2+}$ -ініційованого злиття мембран у безклітинній системі дозволяють нам розглядати холестерол як важливий молекулярний компонент «машини злиття» в синапсі. Одержані дані щодо впливу рівня мембранного холестеролу на перебіг окремих етапів екзоцитозу в нейронах вказують на можливий зв'язок між порушенням гомеостазу холестеролу в мозку та розвитком патологічних процесів в ЦНС.

#### **ЭТАПЫ ЭКЗОЦИТОЗА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ УДАЛЕНИИ ХОЛЕСТЕРОЛА ИЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ И СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ**

*В. П. Гуменюк, И. О. Трикаш*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: trikash@biochem.kiev.ua

В бесклеточной системе исследовали влияние холестерола на процесс экзоцитоза. Для изменения содержания мембранного холестерола применяли метил- $\beta$ -циклодекстрин. Показано, что извлечение холестерола из мембран метил- $\beta$ -циклодекстрином зависит от температуры среды, времени инкубации и концентрации агента. Роль холестерола изучали на этапах докинга синаптических везикул и их  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулированного слияния, которые являются составляющими процесса мультивезикулярного (сложного) экзоцитоза. Методом лазерно-корреляционной спектроскопии показано, что извлечение холестерола

из синаптических везикул не влияет на процесс их агрегации или докинга. Вместе с тем, кинетика  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого слияния гомотипных мембран синаптических везикул зависит от уровня мембранного холестерина. Показано, что снижение концентрации холестерина в плазматических мембранах синапсом на 8% приводит к ингибированию их стимулированного слияния с синаптическими везикулами. Однако при удалении 25% холестерина из плазматических мембран, уровень их слияния с синаптическими везикулами не отличается от контроля. Вероятно, в этом случае мы наблюдаем два процесса, действие которых взаимно компенсируется: повышение слияния мембран за счет изменения физических свойств липидного бислоя и уменьшение интенсивности этого процесса из-за нарушения функции мембраносвязанных протеинов.

Прединкубация синапсом с метил- $\beta$ -циклодекстрином уменьшает вызванное кальцием освобождение нейромедиатора глутамата на 32%. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация холестерина в плазмалемме и синаптических везикулах является важным фактором, который определяет эффективность синаптической передачи в нервных окончаниях.

Ключевые слова: экзоцитоз, слияние мембран, холестерол, синаптические везикулы, синапсомы.

#### EXOCYTOTIC STEPS IN CELL-FREE SYSTEM AFTER CHOLESTEROL DEPRIVATION IN SYNAPTOSOMAL PLASMA MEMBRANES AND SYNAPTIC VESICLES

V. P. Gumenyuk, I. O. Triakash

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: triakash@biochem.kiev.ua

#### Summary

Using a cell-free system we investigated a specific role of cholesterol in exocytotic processes. To modulate the cholesterol content in membrane methyl- $\beta$ -cyclodextrin was used as a cholesterol binding agent. The experimental conditions for cholesterol depletion from synaptosomal membrane structures were determined and depended on methyl- $\beta$ -cyclodextrin concentration, time and mediums temperature. The role of cholesterol was studied on the stages of synaptic vesicles docking and  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated fusion which are the com-

ponents of multivesicular compound exocytosis. Using dynamic light scattering technique we have found that after cholesterol depletion from synaptic vesicles the process of their aggregation (docking) remains unchanged.

It was found that the rate of calcium-triggered fusion of synaptic vesicles depends on the membrane level of cholesterol. The decreasing level of synaptosomal plasma membrane cholesterol by 8% leads to suppression of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane fusion with synaptic vesicles. But, under 25% reduction of plasma membrane cholesterol the level of membrane merging with synaptic vesicles did not differ from control; probably this is due to changes in physical properties of lipid bilayer and/or disturbances in function of membrane proteins driving this process.

In cholesterol depleted synaptosomes the exocytotic release of glutamate stimulated by calcium was decreased by 32%. Obtained data suggest that the cholesterol concentration in synaptosomal plasma membranes or synaptic vesicles is the crucial determinant for synaptic transmission efficiency in nerve terminals.

Key words: exocytosis, membrane fusion, cholesterol, synaptic vesicles, synaptosomes.

1. Lingwood D., Kaiser H. J., Levental I., Simons K. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – **37**, Pt 5. – P. 955–60.
2. Chamberlain L. H., Burgoyne R. D., Gould G. W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – **98**. – P. 5619–5624.
3. Lang T., Bruns D., Wenzel D. et al. // *EMBO J.* – 2001. – **20**, N 9. – P. 2202–2213.
4. Lafont F., Verkade P., Galli T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**, N 7. – P. 3734–3738.
5. Taverna E., Saba E., Rowe J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 7. – P. 5127–5134.
6. Takamori S., Holt M., Stenius K. // *Cell.* – 2006. – **127**, N 4. – P. 831–846.
7. Deutsch J. W., Kelly R. B. // *Biochemistry.* – 1981. – **20**, N 2. – P. 378–85.
8. Simons K., Toomre D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2000. – **1**, N 1. – P. 31–39.
9. Ikonen E. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2001. – **13**, N 4. – P. 470–477.
10. Huttner W. B., Zimmerberg J. // *Ibid.* – P. 478–484.
11. Martin T. F. // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – **2**, N 1. – E9–E11.
12. Brown D. A., London E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **240**, N 1. – P. 1–7.
13. Brown R. E. // *J. Cell Science.* – 1998. – **111**. – P. 1–9.

14. Ahmed S. N., Brown D. A., London E. // *Biochemistry*. – 1997. – **36**, N 36. – P. 10944–10953
15. Yeagle P. L. // *FASEB J.* – 1989. – **3**, N 7. – P. 1833–1842.
16. Barrantes F. J. // *Ibid.* – 1993. – **7**, N 15. – P. 1460–1467.
17. Bastiaanse E. M., Hold K. M., Van der L. A. // *Cardiovasc. Res.* – 1997. – **33**, N 2. – P. 272–283.
18. Burger K., Gimpl G., Fahrenholz F. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – **57**, N 11. – P. 1577–1592.
19. Churchward M. A., Rogasevskaia T., Hofgen J. et al. // *J. Cell Sci.* – 2005. – **118**, Pt. 20. – P. 4833–4848.
20. Xia F., Gao X., Kwan E. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 23. – P. 24685–24691.
21. Gil C., Soler-Jover A., Blasi J., Aguilera J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – **329**, N 1. – P. 117–124.
22. Smith A. J., Sugita S., Charlton M. P. // *J. Neuroscience.* – 2010. – **30**, N 17. – P. 6116–6121.
23. Yancey P. G., Rodriguez W. V., Kilsdonk E. P. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, N 27. – P. 16026–34.
24. Jouni Z. E., McGill B., Wells M. A. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – **132**, N 4 – P. 699–709.
25. Zhuang M., Oltean D. I., Gomez I. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 16. – P. 13863–13872.
26. Yeagle P. L. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – **822**, N 3–4. – P. 267–287.
27. Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., Rothblat G. H. // *J. Lipid Research.* – 1997. – **38**, N 11. – P. 2264–2272.
28. Atger V. M., de la Llera Moya M., Stoudt G. W. et al. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – **99**, N 4. – P. 773–780.
29. Terletska Ya., Triakash I. // *Neurophysiology.* – 1998. – **30**, N 4/5. – P. 291–293.
30. Трикаш І. О., Гуменюк В. П., Чернишов В. І. // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2004. – **36**, № 4. – P. 272–281.
31. Triakash I. O., Volynets G. P., Remenyak O. V., Gorchev V. F. // *Neurochem. International.* – 2008. – **53**. – P. 401–407.
32. Pickett J. A., Edwardson J. M. // *Traffic.* – 2006. – **7**, N 2. – P. 109–116.
33. De Lorenzo R. J., Freedman S. D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1978. – **80**, N 1. – P. 183–192.
34. Колчинская Л. И., Лишко В. К., Малышева М. К. // *Биохимия.* – 1976. – **41**, № 5. – P. 933–938.
35. Hoekstra D., De Boer T., Klappe K. et al. // *Biochemistry.* – 1984. – **23**, N 24. – P. 5675–5681.
36. Bligh E. G. and Dyer W. J. // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – **37**, N 8. – P. 911–917.
37. Zlatkis A., Zak B., Boyle A. J. // *J. Lab. Clin. Med.* – 1953. – **41**, N 3. – P. 486–92.
38. Linetti A., Fratangeli A., Taverna E. et al. // *J. Cell Science.* – 2010. – **123**, Pt. 4. – P. 595–605.
39. Wasser C. R., Ertunc M., Liu X., Kavalali E. T. // *J. Physiology.* – 2007. – **579**, Pt. 2. – P. 413–429.
40. Gaus K., Rodriguez M., Ruberu K. R. et al. // *J. Lipid Res.* – 2005. – **46**, N 7. – P. 1526–1538.
41. Kilsdonk E. P., Yancey P. G., Stoudt G. W. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**, N 29. – P. 17250–17256.
42. Levitan I., Christian A. E., Tulenko T. N., Rothblat G. H. // *J. General Physiology.* – 2000. – **115**, N 4. – P. 405–416.
43. Matthews V., Schuster B., Schutze S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 40. – P. 38829–38839.
44. Cabrera-Poch N., Sánchez-Ruiloba L., Rodríguez-Martínez M., Iglesias T. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 27. – P. 28592–28602.
45. Irie T., Otagiri M., Sunada M. et al. // *J. Pharmacobiodyn.* – 1982. – **5**, N 9. – P. 741–744.
46. Jadot M., Andrianaivo F., Dubois F., Wattiaux R. // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – **268**, N 5. – P. 1392–1399.
47. Simons M., Keller P., De Strooper B. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**. – P. 6460–6464.
48. Chintagari N. R., N. Jin, P. Wang et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2006. – **34**, N 6. – P. 677–687.
49. Zidovetzki R., Levitan I. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1768**, N 6. – P. 1311–1324.
50. Ottico E., Prinetti A., Prioni S. et al. // *J. Lipid Res.* – 2003. – **44**, N 11. – P. 2142–51.
51. Ahmed S. M., Casu B., Cedro A. // *Int. J. Pharm.* – 1994. – **109**, N 2. – P. 99–106.
52. Nakanishi K., Nadai T., Masada M., Miyajima K. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1992. – **40**, N 5. – P. 1252–6.
53. Chieregatti E., Witkin J. W., Baldini G. // *Traffic.* – 2002. – **3**, N 7 – P. 496–511.
54. Rickman C., Archer D. A., Meunier F. A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 13. – P. 12574–12579.
55. Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J. E., Sollner T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 997–1001.

56. *Jahn R.* // *Neuron.* – 2000. – **27**, N 2. – P. 201–204.
57. *Dulubova I., Khvotchev M., Liu S. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P. 2697–2702.
58. *de Wit H., Cornelisse L. N., Toonen R. F., Verhage M.* // *PLoS ONE.* – 2006. – **1**. – e126.
59. *Verhage M., Sorensen J. B.* // *Traffic.* – 2008. – **9**, N 9. – P. 1414–1424.
60. *Kato M., Wickner W.* // *EMBO J.* – 2001. – **20**, N 15. – P. 4035–4040.
61. *Fratti R. A., Jun Y., Merz A. J. et al.* // *J. Cell Biol.* – 2004. – **167**, N 6. – P. 1087–1098.
62. *Zhang J., Xue R., Ong W., Chen P.* // *Biophys. J.* – 2009. – **97**, N 5. – P. 1371–1380.
63. *Simons K., Ikonen E.* // *Nature.* – 1997. – **387**, N 6633. – P. 569–572.
64. *Vikman J., Jimenez-Feltström J., Nyman P. et al.* // *The FASEB J.* – 2009. – **23**, N 1. – P. 58–67.
65. *Inoue H., Miyaji M., Kosugi A. et al.* // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – **32**, N 8. – P. 2188–2198.
66. *Kaldi K., Kalocsai A., Rada B. K. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **310**, N 4. – P. 1241–1246.
67. *Kato N., Nakanishi M., Hirashima N.* // *Biochemistry.* – 2003. – **42**, N 40. – P. 11808–11814.
68. *Keller P., Simons K.* // *J. Cell Biol.* – 1998. – **140**, N 6. – P. 1357–1367.
69. *Xu X., London E.* // *Biochemistry.* – 2000. – **39**, N 5. – P. 843–849.
70. *Feigenson G. W., Buboltz J. T.* // *Biophys. J.* – 2001. – **80**, N 6. – P. 2775–2788.
71. *Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T. et al.* // *PNAS.* – 2004. – **101**, N 12. – P. 4083–4088.
72. *Takahashi N., Hatakeyama H., Okado H. et al.* // *J.C.B.* – 2004. – **165**, N 2. – P. 255–262.
73. *Castle J., Guo Z., Liu L.* // *Mol. Immunol.* – 2002. – **38**, N 16–18. – P. 1337–1340.
74. *Kishimoto T., Kimura L., Liu T. T. et al.* // *EMBO J.* 2006. – **25**, N 4. – P. 673–682.
75. *Bonanomi D., Benfenati F., Valtorta F.* // *Prog. Neurobiol.* – 2006. – **80**, N 4. – P. 177–217.
76. *Sudhof T. C.* // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2004. – **27**. – P. 509–547.
77. *Pfriege F. W.* // *Biochim. Biophys. Acta* – 2003. – **1610**, N 2. – P. 271–280.
78. *Tong J., Borbat P. P., Freed J. H., Shin Y. K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – **106**, N 13. – P. 5141–5146.
79. *Jia J., Lamer S., Schümann M. et al.* // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2006. – **5**, N 11. – P. 2060–2071.
80. *Zamir O., Charlton M. P.* // *J. Physiol.* – 2006. – **571**, Pt. 1. – P. 83–99.

Отримано 05.11.2010