

О.В. Починюк, О.Л. Заїка, О.В. Садовий, О.М. Яворська,
П.Г. Костюк, О.О. Лук'янець

Участь синаптоагмінів у вивільненні катехоламінів хромафінними клітинами надниркової залози щура

Відомо, що екзоцитоз забезпечує такі життєвоважливі процеси, як вивільнення нейромедіаторів при синаптичній передачі або гормонів під час секреції. Головний механізм здійснення екзоцитозу відбувається за допомогою спеціалізованого білкового комплексу, який називається SNARE-комплекс. Саме завдяки його активності зливаються везикулярна та плазматична мембрани та формується фузійна пора, через яку вміст везикул вивільняється назовні. Вважається, що саме синаптоагміні, які є кальційзалежними білками, відповідальні за ініціацію кальційзалежного екзоцитозу. Синаптоагміні розташовані на мембрані везикул і здатні зв'язувати два або три іони кальцію. Вивчалася роль однієї з найбільш розповсюджених їх ізоформ – синаптоагміну-1 у процесі екзоцитозу. Щоб пригнітити функцію цього протеїну, використовували ін'єкцію антитіл до синаптоагміну-1 в ізольовані хромафінні клітини надниркової залози щура. Секрецію катехоламінів вимірювали за допомогою амперометричного методу. Наші результати показали, що пригнічення функції синаптоагміну-1 у досліджуваних клітин призводило до значного зменшення секреції. Отримані результати дають змогу зробити висновок, що синаптоагмін-1 є одним із ключових протеїнів, необхідних для забезпечення кальційзалежного екзоцитозу у хромафінних клітин.

Ключові слова: хромафінні клітини, кальцій, синаптоагмін, SNARE-комплекс, екзоцитоз, секреція, катехоламіни.

ВСТУП

Відомо, що передача інформації в нервовій системі здійснюється завдяки синаптичному процесу, при якому за допомогою спеціалізованих синаптичних везикул вивільнюється секретована сполука з клітини назовні. Такий самий механізм задіяний у нейроендокринних клітинах, в тому числі хромафінних клітинах надниркової залози. Відомо що вивільнення, або екзоцитоз, має дуже складний механізм, в якому залучені численні синаптичні протеїни [4, 12, 13]. Найголовніший сигнал, що запускає екзоцитоз – збільшення концентрації вільного кальцію в цитозолі ($[Ca^{2+}]_i$) [1, 5, 17, 19], а універсальною ланкою, що здійснює злиття везикули із плазматичною мембраною є білковий SNARE-комплекс

(від англ. soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor). SNARE-комплекс був вперше ізольований із екстрактів нервових клітин [20], він також може бути реконструйованим із рекомбінантно експресованих та очищених білків *in vitro* [7, 8]. Це велика група білків, що здійснює злиття внутрішньоклітинних транспортних везикул з клітинною мембраною (екзоцитоз) або органелами-мішенями. Нині виявлено близько 60 білків SNARE, котрі розділяють на дві функціональні групи: везикулярні білки (v-SNARE) і білки органел-мішеней або плазматичної мембрани (t-SNARE). До v-SNARE відносяться гомологи синаптобrevіну, до t-SNARE – синтаксину-1 та SNAP-25. Згідно з новою структурною класифікацією, яка базується на внеску у нульовий іонний шар в зібраному SNARE-

© О.В. Починюк, О.Л. Заїка, О.В. Садовий, О.М. Яворська, **П.Г. Костюк**, О.О. Лук'янець

комплексі, ці групи підрозділяються на R-SNARE і Q-SNARE. R-SNARE забезпечує аргініном (R) цей іонний шар, тоді як Q-SNARE забезпечує його комплементарними глутамінами (Q) [9].

Зібрання білків SNARE в “транс”-комплекс, імовірно, зникає протилежні ліпідні бішари мембран, що належать до мембрани клітини та секреторних гранул, внаслідок чого їх наближення зумовлює злиття, а також формування фузійної пори. Надходження кальцію в клітину завершує реакцію збирання в комплекс, яка відбувається за посередництва взаємодії сенсора кальцію, синаптоагміну з мембранними ліпідами і/або частково зібраним SNARE-комплексом. Згідно з однією із теорій – «змійки» (застібки, від англ. *zipping*), SNARE-комплекс формується послідовно, починаючи із дистального від мембрани регіону.

Як уже вказувалося вище, ключовою ланкою для запуску екзоцитозу є кальцій-залежний процес, для якого критичними є участь синаптоагміну-1 та комплексинів. Синаптоагмін-1 – синаптичний везикулярний білок з двома C2-доменами (C2A та C2B), які приймають подібні β -сендвіч-структури та зв’язують три та два іони кальцію відповідно за допомогою петель у верхній частині сендвіча [26, 30]. Синаптоагмін є кальцієвим сенсором, який бере участь в останніх стадіях викиду нейромедіатора в синаптичну щілину. Він зв’язується з нейрексином і SNAP-25, утримуючи секреторну везикулу біля пресинаптичної мембрани, і бере участь у викиді нейромедіатора внаслідок регуляції SNARE-комплексу при підвищенні вмісту кальцію в цитозолі. Синаптоагмін-1 зв’язується одночасно до мембрани і дію SNARE-комплексів, якщо вони закріплюються на плазматичній мембрані, в результаті чого формується четвертинний SNARE-синаптоагмін-1- Ca^{2+} -фосфоліпідний комплекс (SSCAP) [2, 6].

Мета нашої роботи – дослідження участі синаптоагміну-1 у процесі вивільнення катехоламінів із хромафінних клітин надниркових залоз при стимуляції секреції деполяризацією мембрани або активацією ацетилхолінових рецепторів плазматичної мембрани цих клітин.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на свіжоізолюваних хромафінних клітинах надниркових залоз дорослих (5–6 міс) самиць білих щурів лінії Вістар масою 18–230 г (як було описано раніше [14, 16, 22, 24, 31–34]). Клітини медули надниркової залози отримували за стандартною процедурою ферментативної ізоляції. Щура анестезували за допомогою ефіру, декапітували, виділяли надниркові залози, які промивали у розчині DPBS (фосфатний буфер Дульбекко). Далі через устя вени залозу промивали стандартним розчином DPBS, що містив колагеназу типу IA («Sigma-Aldrich», США) в концентрації 0,5 мг/мл. Під біноклюаром виділяли медулярну частину залози, розділяли на тонкі смужки товщиною 300–500 мкм. Отримані зрізи інкубували в розчині DPBS, що містив колагеназу в концентрації 0,3 мг/мл протягом 50–60 хв при 37 °С. Окремі хромафінні клітини отримували за допомогою повільного піпетування. Отриману суспензію клітин ізолювали на покривне скло, розташоване в робочій камері, в яку після прикріплення клітин до поверхні покривного скла додавали зовнішньоклітинний розчин.

Для реєстрації вивільнення катехоламінів використовували електрохімічний метод, який базується на окисненні-відновленні специфічних хімічних сполук. Коли молекули, що легко окиснюються (або відновлюються) дифундують до поверхні електрода, виникає хімічна реакція, в результаті якої утворені електрони реагують із поверхнею електрода, викликаючи

електричний струм. В наших експериментах використані електроди з карбоновими волокнами, оскільки вони мають більш стабільні електрохімічні властивості. Ми виготовляли вугільні електроди, в яких окреме карбонове волокно діаметром 10 мкм і довжиною 6–8 см розміщували всередині поліетиленової трубки. Для реєстрації квантового процесу вивільнення використовували такі розчини (ммоль/л): контрольний – NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,3; деполяризуючий розчин – NaCl – 85, KCl – 50, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,3. Чашку Петрі з клітинами розташовували в полі зору інвертованого мікроскопа «Olympus IX70» (Японія) з короткофокусним об'єктивом зі збільшенням у 40 крат. Електрод з карбоновим волокном за допомогою мікроманіпулятора підводили якнайближче до досліджуваної клітини. Для реєстрації індукованих електричних струмів (I_e) використовували підсилювач ЕРС-9 («НЕКА», Німеччина). Окремі секреторні піки реєстрували в конфігурації «амперометрія», коли на електрод прикладався постійний потенціал +600 мВ. Карбонові електроди характеризували за наявності в робочій камері катехоламінів («Sigma-Aldrich», США) в концентрації 1 ммоль/л. Вихідний сигнал підсилювача фільтрували при частоті пропускання 3 кГц за допомогою трипольного фільтра Бесселя та цифрового фільтра (10 мГц).

Антитіла вводили під тиском за допомогою системи мікроін'єкції Picospritzer III («Parker Instruments», США) та мікроманіпулятора з мікроелектродом, що містив суміш антитіл та флуоресцентного декстрану, кон'югованого із FITC (флуоросцеїн ізотіоціанат), («Sigma-Aldrich», США). Інтенсивність флуоресценції вимірювали за допомогою мікроскопа «Olympus IX70» (Японія).

Вимірювання та запис результатів контролювали за допомогою комп'ютерних

програм «Pulse» та «xChart» («НЕКА», Німеччина). Для зміни зовнішньоклітинних розчинів навколо досліджуваної клітини була застосована система локальної аплікації. Швидкість зміни розчину становила 0,3 мл/хв.

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програми «Microcal™Origin™», версія 5.0 («Microcal Software Inc.», США). Всі чисельні значення результатів дослідження обраховано у вигляді середнього значення ± стандартна похибка (SEM). Достовірність визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вірогідними вважали розбіжності при P<0,05. Досліди проводили при кімнатній температурі (23–25°C).

РЕЗУЛЬТАТИ

У хромафінних клітинах секреція катехоламінів – є кальційзалежною і тому може бути індукована процесами, що викликають підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію ([Ca²⁺]_i). Серед таких можливих шляхів використовується деполяризація мембрани клітини, під час якої відкриваються її потенціалзалежні кальцієві канали, та активація ацетилхолінових рецепторів, після якої підвищується концентрація [Ca²⁺]_i внаслідок надходження Ca²⁺ через іонотропні нікотинові рецептори, або вивільнення із внутрішньоклітинних кальцієвих депо, зумовлене функціонуванням метаболічних мускаринових рецепторів.

Для встановлення ролі кальцієвих каналів ми вивчали секрецію катехоламінів, викликану деполяризацією мембрани розчином, що містив 50 ммоль/л KCl. Як можна бачити на рис. 1, I аплікація 2,5 с деполяризуючим розчином викликала значну кількість секреторних подій, які реєстрували вимірювальним карбоновим електродом у вигляді секреторних транзентів.

При цьому можна було виділити 2 фази екзоцитозу: «швидку», що тривала близько 5 с після початку стимуляції, та «повільну»,

тривалість якої була вдвічі довшою. Перша фаза характеризувалась більш інтенсивною секрецією. Для визначення ролі синаптоагміну-1 у секреції ми використовували антитіла до синаптоагміну-1 у розведенні 1:100. Для цього робили ін'єкцію через мікроелектрод, що вводився у клітину, антитіл до синаптоагміну-1 разом із флуоресцентним декстраном (декстран-FITC), який мав подібну до антитіл молекулярну масу. Використання декстрану-FITC давало змогу контролювати за допомогою флуоресцентного мікроскопа потрапляння антитіл всередину клітини.

Як показали наші експерименти, ін'єкція антитіл до синаптоагміну-1 у клітину, майже повністю пригнічувала секреторні події, викликані деполяризацією клітини, у порівнянні з контролем. Так частота появи секреторних подій зменшилась на $84\% \pm 3\%$ ($n=11$; див. рис.1, II).

У наступних експериментах ми стимулювали секрецію за допомогою агоніста ацетилхолінових рецепторів – ацетилхоліну, який додавали у зовнішньоклітинний розчин у концентрації 1 ммоль/л. І також спосте-

рігали появу секреторних транзєнтів у відповідь на аплікацію агоніста (див. рис. 1, III). Слід відмітити, що у цьому разі такий самий двофазний характер секреції був і при стимуляції секреції КСІ. На відміну від секреторних піків індукованих КСІ, при аплікації ацетилхоліну амплітуда секреторних відповідей була в 2–3 рази більшою.

У наступних експериментах ми вивчали участь синаптоагміну-1 у виникненні секреторних відповідей в ізольованих хромафінних клітинах щура. Введення антитіл до синаптоагміну-1 у ту саму клітину, яку досліджували без антитіл, суттєво пригнічувало секреторну активність клітин (див. рис. 1, IV). Частота появи секреторних подій зменшувалася у порівнянні із контрольними вимірюваннями на $81,5\% \pm 5\%$ ($n=9$).

Для того щоб оцінити можливі зміни кінетичних показників секреторних піків при пригніченні функції синаптоагміну-1, ми проаналізували амплітуду, час наростання та спаду, ширину секреторного піку (за спаданням амплітуди до 5% від максимального

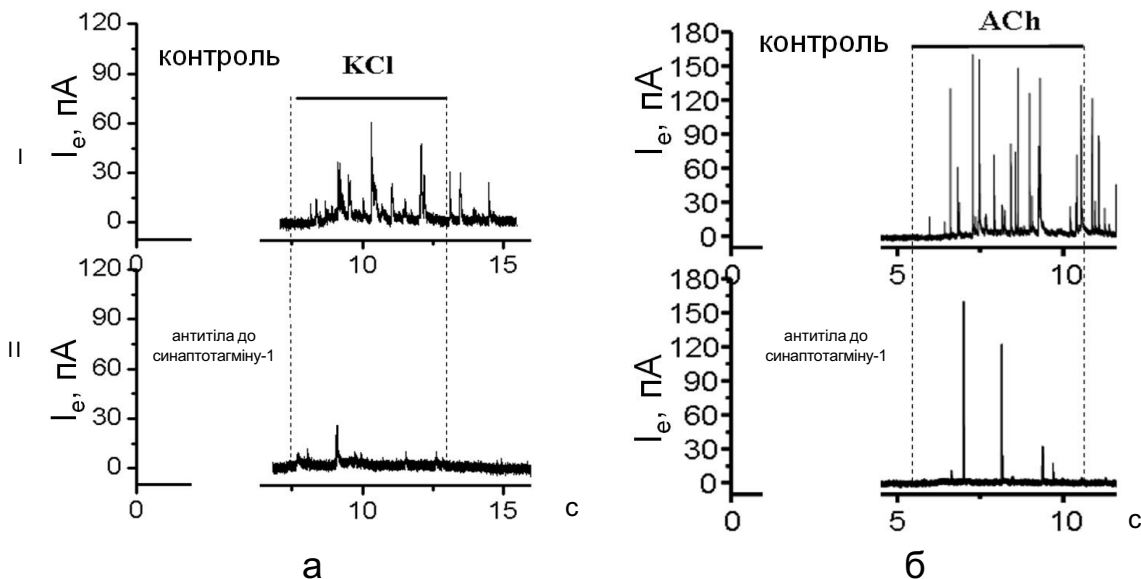


Рис. 1. Вивільнення катехоламінів від окремої хромафінної клітини при аплікації розчину, що містив 50 ммоль/л КСІ (а) та 1 ммоль/л ацетилхоліну (б) в контролі (I) та після ін'єкції в клітину антитіл до синаптоагміну-1 (II). Час аплікації однаковий для обох випадків, показано прямою лінією

значення, T_{95}), напівширину (за 50%-м спаданням, T_{50}), та його площа (рис. 2).

При обох вищеописаних типах стимуляції гістограми розподілу значень часових та амплітудних характеристик секреторних подій проявляли подібні до нормального розподілу ознаки. Значення досліджуваних параметрів при пригніченні функції синапто-тагміну-1 практично мало відрізнялися від отриманих у контрольних умовах (таблиця).

ОБГОВОРЕННЯ

Синаптотагміни це – кальційзв'язувальні білки синаптичних везикул, які беруть участь у швидкому кальційзалежному вивільненні нейротрансмітера під час синаптичної передачі. До родини синапто-тагмінів відносяться принаймні 13 білків, які залучені в мембранний транспорт [15,

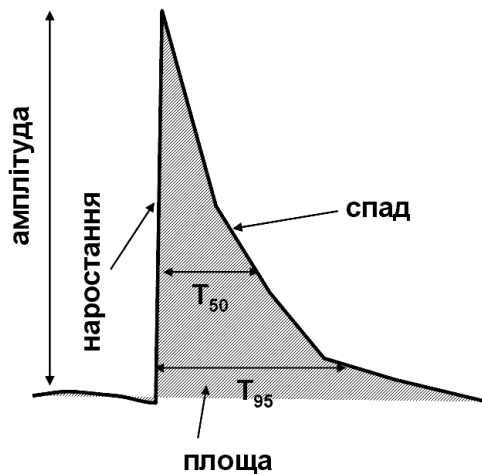


Рис. 2. Схематичне зображення секреторної події та показників, що визначалися

18, 25, 28]. Як було встановлено, всі синаптотагміни мають загальну доменну структуру, яка складається із трансмембранного N-закінчення, короткої зв'язувальної послідовності та з двох доменів C-терміналі (C_2A та C_2B). C_2 -домени більшості синаптотагмінів зв'язують два або три іони кальцію, тому їх відносять до кальцієвих сенсорів синаптотагміну [23]. Встановлено, що всі синаптотагміни головним чином експресуються в нервовій та ендокринній системах, саме там, де відбувається синаптична передача або секреція гормонів. Найбільш розповсюдженими є синаптотагміни-1 та 2, також розповсюдженим є синаптотагмін-7, тоді як інші ізоформи зустрічаються значно рідше. Синаптотагміни-1 та 2 є дуже спорідненими ізоформами і найбільш детально охарактеризовані. Було припущено, що вони розташовані на синаптичних везикулах як кальцієвої сенсори під час екзоцитозу [3, 21]. Цю ідею підтвердили експерименти із використанням мутантних мишей [11]. Крім того, дослідження на генетично модифікованих knock-in мишах показали, що мутації C_2A -домену синаптотагміну-1 зменшували кальцієву чутливість екзоцитозу [10]. Але існують також дослідження, які вказують, що не тільки синаптотагмін-1 та 2 відповідальні за кальційзалежний екзоцитоз у нейронах і нейроендокринних клітинах. Так, у PC12-клітинах [27] і нейронах гіпокампа [11] мутантних тварин, де було пригнічено функції цих синапто-тагмінів, кальційзалежний екзоцитоз спостерігався, хоча з дещо зміненими показ-

Порівняльні характеристики середніх значень показників секреторної події при різних стимуляціях секреції (M±m, n = 50)

Характеристика секреторної події	KCl, відн.од.	Ацетилхолін, відн.од.
Амплітуда	1,108±0,183	1,094±0,12
T_{50}	0,976±0,119	0,96±0,099
T_{95}	0,990,049	0,968±0,077
Площа	1,094±0,127	1,067±0,09
Час зростання	1,003±0,17	1,024±0,113
Час спаду	0,996±0,071	0,982±0,099

никами. Поясненням таких результатів досліджень є припущення, висловлене деякими авторами, що інші синаптоагміни (особливо синаптоагмін-7) можуть бути залученими до кальційзалежного екзоцитозу як основні сенсори, а синаптоагміни-1 та 2 є лише підсилювачами їх дії для забезпечення швидкісного синаптичного процесу в нервових синапсах [29].

У наших дослідженнях ми використали ін'єкцію специфічних антитіл до синаптоагміну-1 для блокування функції цього білка в процесі екзоцитозу. Такий підхід раніше не застосовувався, оскільки він є методично досить складним. Отримані нами порівняльні значення кінетичних показників секреторних піків за умов пригнічення функції синаптоагміну-1 мало відрізняються від контрольних. Цей факт вказує на те, що синаптоагмін-1 впливає не на кінетичні показники секреторних подій, а на частоту їх появи. Таким чином, результати досліджень показують, що блокування функції синаптоагміну-1 пригнічує секреторну функцію хромафінних клітин. А це свідчить про визначальну роль цього синаптичного білка в процесі кальційзалежного екзоцитозу в цих клітинах.

Робота була підтримана грантом INTAS 2001/2095. Ми дякуємо професору Р. Яхну (Макс-Планк, Інститут біофізичної хімії, Геттінген, Німеччина) за надані антитіла.

**О.В. Починюк, О.Л. Заика, О.В. Садовий,
Е.Н. Яворская, П.Г. Костюк, Е.А. Лукьянец**

УЧАСТИЕ СИНАПТОАГМИНА В ВЫСВОБОЖДЕНИИ КАТЕХОЛАМИНОВ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТКАМИ НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ

Как известно, экзоцитоз обеспечивает такие жизненно важные процессы, как высвобождение нейромедиаторов при синаптической передаче, или высвобождение гормонов во время секреции. Главный механизм осуществления процесса экзоцитоза происходит с помощью специализированного белкового комплекса, который называется SNARE-комплекс. Именно благодаря его активности происходит слияние везикулярной и плазматической

мембран и формирования фузионной поры через которую содержимое везикул высвобождается наружу. Считается, что именно синаптоагмины, которые являются кальцийзависимыми белками, ответственны за процесс инициации кальцийзависимого экзоцитоза. Синаптоагмины располагаются на мембране везикул и способны связывать 2 или 3 иона кальция. Мы изучали роль одной из самых распространенных их изоформ – синаптоагмина-1. Для этого мы использовали инъекцию антител к синаптоагмину-1 в изолированные хромаффинные клетки надпочечника крысы с целью подавить функцию этого протеина. Секрецию катехоламинов измеряли с помощью амперометрического метода. Наши результаты показали, что исключение функции синаптоагмина-1 в исследуемых клетках приводило к значительному угнетению секреции. Полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что синаптоагмин-1 является одним из ключевых протеинов, необходимых для обеспечения кальцийзависимого экзоцитоза в хромаффинных клетках.

Ключевые слова: хромаффинная клетка, кальций, синаптоагмин, SNARE-комплекс, экзоцитоз, секреция, катехоламины.

**O.V. Pochynuk, O.L. Zaika, O.V. Sadovyi,
O.M. Yavorskaya, P.G. Kostyuk, E.A. Lukyanetz**

PARTICIPATION OF SYNAPTOTAGMIN IN EXOCYTOSIS IN ADRENAL CHROMAFFIN CELLS OF RAT

Exocytosis is known to provide such a vital processes as the release of neurotransmitters in synaptic transmission or release of hormones during secretion. The main mechanism of exocytotic process occurs through the specialized protein complex called the SNARE-complex. Due to its activity the fusion of vesicular and plasma membrane occurs and fusion pore is formed through which a content of vesicles is released outside. It is believed that just synaptotagmins which are Ca^{2+} -dependent proteins, responsible for initiation of the process of Ca^{2+} -dependent exocytosis. Synaptotagmins are located at the membrane of the vesicles and can bind two or three Ca^{2+} ions. In our research, we studied the role of one of the most common isoform of synaptotagmins - synaptotagmin-1. For this we used an injection of antibodies arised to synaptotagmin-1 (anti-STg-1) into isolated rat adrenal chromaffin cells to depress the function of this protein. Catecholamine secretion was measured by amperometric method. Our results showed that an exclusion of synaptotagmin-1 function in tested cells resulted in significant suppression of secretion. These data allow us to conclude that synaptotagmin-1 is a key protein which is needed for Ca^{2+} -dependent exocytosis in chromaffin cells.

Key words: Chromaffin cells, calcium, synaptotagmin, SNARE-complex, exocytosis, secretion, catecholamines.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Augustine G.J., Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells // *J.Physiol.(Lond)*. – 1992. – **450**. – P. 247–271.
2. Bhalla A., Chicka M.C., Tucker W.C., Chapman E.R. Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion // *Nat.Struct.Mol.Biol.* – 2006. – **13**. – P. 323–330.
3. Brose N., Petrenko A.G., Sudhof T.C., Jahn R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface // *Science*. – 1992. – **256**. – P. 1021–1025.
4. Brunger A.T. Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis // *Curr.Opin.Neurobiol.* – 2000. – **10**. – P. 293–302.
5. Burgoyne R.D., Morgan A. Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics // *Trends Neurosci.* – 1995. – **18**. – P. 191–196.
6. Dai H., Shen N., Arac D., Rizo J. A quaternary SNARE-synaptotagmin-Ca²⁺-phospholipid complex in neurotransmitter release // *J.Mol.Biol.* – 2007. – **367**. – P. 848–863.
7. Fasshauer D., Bruns D., Shen B., Jahn R., Brunger A.T. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25 // *J.Biol.Chem.* – 1997. – **272**. – P. 4582–4590.
8. Fasshauer D., Otto H., Eliason W.K., Jahn R., Brunger A.T. Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation // *J.Biol.Chem.* – 1997. – **272**. – P. 28036–28041.
9. Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. – 1998. – **95**. – P. 15781–15786.
10. Fernandez-Chacon R., Konigstorfer A., Gerber S.H., Garcia J., Matos M.F., Stevens C.F., Brose N., Rizo J., Rosenmund C., Sudhof T.C. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability // *Nature*. – 2001. – **410**. – P. 41–49.
11. Geppert M., Goda Y., Hammer R.E., Li C., Rosahl T.W., Stevens C.F., Sudhof T.C. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse // *Cell*. – 1994. – **79**. – P. 717–727.
12. He B., Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis // *Curr.Opin.Cell Biol.* – 2009. – **21**. – P. 537–542.
13. Jena B.P. Secretory vesicles transiently dock and fuse at the porosome to discharge contents during cell secretion // *Cell Biol.Int.* – 2010. – **34**. – P. 3–12.
14. Kostyuk P.G., Pochynyuk O.M., Zaika O.L., Lukyanetz E.A. Roles of nicotinic and muscarinic receptors in calcium signaling and transmitter release // *Neurophysiology*. – 2003. – **35**. – P. 201–207.
15. Lukyanetz E.A. Role of synaptic proteins in neurotransmitter release-related vesicular trafficking // *Neurophysiology*. – 2008. – **40**. – P. 137–141.
16. Lukyanetz E.A. Calcium signaling in secretion of catecholamines in chromaffin cells // *Fiziol.Zh.* – 2009. – **55**. – P. 110–111.
17. Lukyanetz E.A., Neher E. Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells // *Eur.J.Neurosci.* – 1999. – **11**. – P. 2865–2873.
18. Marqueze B., Berton F., Seagar M. Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? // *Biochimie*. – 2000. – **82**. – P. 409–420.
19. Neher E., Sakaba T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release // *Neuron*. – 2008. – **59**. – P. 861–872.
20. Otto H., Hanson P.I., Jahn R. Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP.25 in the membrane of synaptic vesicles // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. – 1997. – **94**. – P. 6197–6201.
21. Perin M.S., Fried V.A., Mignery G.A., Jahn R., Sudhof T.C. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C // *Nature*. – 1990. – **345**. – P. 260–263.
22. Pochynyuk O.M., Zaika O.L., Lukyanetz E.A. Role of the mitochondria in generation of acetylcholine-induced calcium transients in rat chromaffin cells // *Neurofiziolohiya/Neurophysiology*. – 2002. – **34**. – P. 217–219.
23. Rizo J., Sudhof T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain // *J.Biol.Chem.* – 1998. – **273**. – P. 15879–15882.
24. Sadovyy A.V., Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Voltammetric detection of quantal release of catecholamines from chromaffin cells // *Fiziol.Zh.* – 2009. – **55**. – P. 140.
25. Schiavo G., Osborne S.L., Sgouros J.G. Synaptotagmins: more isoforms than functions? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **248**. – P. 1–8.
26. Shao X., Fernandez I., Sudhof T.C., Rizo J. Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? // *Biochemistry*. – 1998. – **37**. – P. 16106–16115.
27. Shoji-Kasai Y., Yoshida A., Sato K., Hoshino T., Ogura A., Kondo S., Fujimoto Y., Kuwahara R., Kato R., Takahashi M. Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells // *Science*. – 1992. – **256**. – P. 1821–1823.
28. Sudhof T.C., Rizo J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic // *Neuron*. – 1996. – **17**. – P. 379–388.
29. Sugita S., Han W., Butz S., Liu X., Fernandez-Chacon R., Lao Y., Sudhof T.C. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis // *Neuron*. – 2001. – **30**. – P. 459–473.
30. Sutton R.B., Davletov B.A., Berghuis A.M., Sudhof T.C., Sprang S.R. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid binding fold // *Cell*. – 1995. – **80**. – P. 929–938.
31. Zaika O.L., Pochiniuk O.M., Luk'ianets E.A. Electrochemical studies of induced secretion of catecholamines

- from individual vesicles of rat chromaffin cells // Ukr.Biokhim.Zh. – 2001. – **73**. – P. 69–72.
32. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Lukyanetz E.A. Comparative characteristics of the secretory responses of chromaffin and pheochromocytoma PC-12 cells to acetylcholine stimulation // Neurophysiology. – 2000. – **32**. – P. 174–176.
33. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Lukyanetz E.A. Comparative studies of calcium transients induced by acetylcholine in rat chromaffin cells // Neurophysiology. – 2002. – **34**. – P. 261–263.
34. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Sadovyy A.V., Kostyk P.G., Lukyanetz E.A. Involvement of the Endoplasmic Reticulum of Chromaffin Cells of the Rat Adrenal Gland in Calcium Signaling // Neurofiziologiya/ Neurophysiology. – 2009. – **41**. – P. 460–466.

*Міжнарод. центр молекулярної фізіології НАН України;
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: elena@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 01.06.2010*