

## НАРУШЕНИЕ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ЦИКЛА В СИНАПСАХ РЕТИКУЛОСПИНАЛЬНЫХ АКСОНОВ МИНОГИ ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИИ ГТФγS

© Н. В. Томилин, Е. В. Васильева, А. В. Гиляров, Т. Ф. Черняк

*Институт токсикологии ФМБА, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: Nikolay\_Tomilin@rambler.ru*

Везикулярный цикл поддерживает устойчивую работу синапсов, сохраняя динамическое равновесие между экзоцитозом и компенсаторным эндоцитозом. Важную роль в регуляции этого цикла принимают ГТФ-связывающие белки. ГТФаза динамин является ключевым белком, обеспечивающим отделение формирующихся клатриновых пузырьков от плазматической мембраны. Целью работы было изучение действия негидролизуемого аналога ГТФ (ГТФγS) на динаминовый комплекс в условиях *in situ*. Обнаружено, что микроинъекция ГТФγS в ретикулоспинальные аксоны вызывает комплекс изменений ультраструктуры: изменение количества синаптических пузырьков в кластере и прикрепленных к активной зоне, а также увеличение количества клатриновых структур, что свидетельствует об ингибировании эндоцитоза. Кроме того, появляются необычные клатриновые структуры. При низких концентрациях ГТФγS они представлены длинными тубулами, покрытыми упорядоченной динаминовой спиралью и оканчивающимися клатриновыми пузырьками. С увеличением концентрации ГТФγS на них появляются многочисленные разветвления, также оканчивающиеся клатриновыми пузырьками, при этом длина тубул значительно уменьшается. Шаг спирали и диаметр тубул достоверно уменьшаются при увеличении концентрации ГТФγS ( $23.1 \pm 0.4$  и  $26.6 \pm 0.4$  нм соответственно при низкой концентрации;  $19.0 \pm 0.5$  и  $23.3 \pm 0.4$  нм при высокой;  $P < 0.001$ ). На основании полученных результатов предлагается модель молекулярного механизма освобождения клатриновых пузырьков, вызываемого динамином. Суть модели: гидролиз ГТФ динамином приводит к быстрому увеличению длины спирали за счет выпрямления ее структурной единицы — димера динамина. Это вызывает увеличение диаметра спирали и соответственно разрыв гидрофобных связей между внутренним и наружным слоями липидов в местах контакта внутреннего слоя с динаминовой спиралью, а также практически одновременное растяжение шейки клатринового пузырька в продольном направлении, что способствует нарушению целостности мембраны шейки и освобождению клатринового пузырька.

Ключевые слова: синапс, компенсаторный эндоцитоз, динамин, ГТФγS, электронная микроскопия, иммуноцитохимия.

Принятые сокращения: ГДФ — гуанозиндифосфат, ГТФ — гуанозинтрифосфат, ГТФγS — гуанозин 5-О-(3-тиотрифосфат), ФС — фосфатидилсерин, GST — глутатион-S-трансфераза.

В химических синапсах передача сигнала осуществляется с помощью медиатора, который высвобождается при слиянии синаптических пузырьков с мембраной после ее деполяризации. При этом образуется избыток мембраны, и для поддержания устойчивой работы синапсов необходимо, чтобы избыточная часть мембраны в виде синаптических пузырьков возвращалась в кластер. Таким образом сохраняется постоянство поверхности аксональной мембраны и восстанавливается количество синаптических пузырьков. Один из основных процессов, обеспечивающих динамическое равновесие в цикле синаптических мембран, — клатринопосредованный компенсаторный эндоцитоз (Heuser, Reese, 1973). В результате многочисленных исследований установлено, что существенную роль в регуляции процессов экзоцитоза и эндоцитоза играют ГТФ-связывающие белки, а именно малые ГТФазы и динамин (ГТФаза большой молекулярной массы) — ключевой белок клатринопосредованного эндоцитоза. Так, в результате микро-

инъекции негидролизуемого аналога ГТФ — ГТФγS высокой концентрации — в гигантский синапс кальмара с последующей интенсивной электрической стимуляцией выделение нейромедиатора снижается, количество синаптических пузырьков в кластере уменьшается, но количество прикрепленных к активной зоне (docked) пузырьков, напротив, увеличивается. Потеря синаптических пузырьков в кластере связана с нарушением эндоцитоза, возможно вследствие действия ГТФγS на динамин (Hess et al., 1993; Augustine et al., 1999).

Клатринопосредованный эндоцитоз инициируется встраиванием в мембрану комплекса белков клатриновой оболочки, что сопровождается инвагинацией этого участка мембраны. Затем происходит ряд последовательных превращений, в результате формируется клатриновый пузырек с сокращенной шейкой, на которой иногда видны одно-два кольца короткой спирали. Эндоцитоз завершается отделением от мембраны клатринового пузырька, быстро теряющего клатриновую оболочку (Brodin et al., 2000).

В этом процессе участвуют кроме клатрина многие дополнительные белки, основные из них — AP-2, AP-180, эпсин, амфифизин, эндофилин, динамин и синаптоджанин (Brodin et al., 2000; Takei, Haucke, 2001). По существующим представлениям, динамин выполняет важную функцию в отделении клатринового пузырька от пресинаптической мембраны. Это белок с мол. массой около 100 кДа, ему свойственна ГТФазная активность, существенно возрастающая при олигомеризации динамина, в результате которой образуется спиральная структура на шейке клатринового пузырька. Известны три основные модели участия динамина в отделении клатринового пузырька от аксональной мембраны. Согласно первой модели, гидролиз ГТФ вызывает сокращение короткой динаминовой спирали (Hinshaw, Schmid, 1995; Sweitzer, Hinshaw, 1998). Авторы второй модели (Stowell et al., 1999) предполагают, что при гидролизе ГТФ динаминовая спираль работает как предварительно сжатая молекулярная пружина, при распрямлении разрывающая липидную мембрану. В третьей модели динамин рассматривается как выключатель, функционирующий подобно многочисленным малым ГТФамам (Sever et al., 1999). В двух первых моделях динамин представлен как механохимическая белковая молекула, в последней — как регуляторная, которая в ГТФ-связанном состоянии активирует некую неизвестную пока молекулу-эффектор. Для выяснения молекулярных механизмов действия динамина перспективно изучение нарушений эндоцитоза под действием ГТФγS. Если гидролиз ГТФ необходим для отделения клатринового пузырька от синаптической мембраны, должно отмечаться ингибирование эндоцитоза на стадии освобождения клатриновых везикул. В многочисленных экспериментах, выполненных *in vitro*, показано, что действие ГТФγS сопряжено с появлением длинных мембранных тубул, покрытых спиральной структурой, которая состоит в основном из динамина (Takei et al., 1995). Практически все исследования эндоцитоза с помощью ГТФγS выполнены в условиях *in vitro*, но для понимания молекулярного механизма освобождения клатриновых пузырьков и роли динамина в этом процессе необходимо изучить действие ГТФγS в различных концентрациях *in vivo*. В данной работе исследуется влияние активации ГТФ-связывающих белков, вызванной микроинъекцией ГТФγS в ретикулоспинальные аксоны миноги, на цикл синаптических пузырьков. Особое внимание направлено на изучение механизма освобождения клатриновых пузырьков при участии динамина.

### Материал и методика

Работа выполнена на центральных синапсах ретикулоспинальных аксонов миноги. Эти аксоны диаметром 40—80 мкм представляют собой идеальный объект для введения различных экспериментальных веществ. Взрослых миног *Lampetra fluviatilis* длиной 30 см анестезировали погружением в 0.1%-ный водный раствор MS-222 (Sandoz). Выделенные кусочки спинного мозга миноги закрепляли в покрытой силгардом камере, которую заполняли физиологическим раствором, содержащим (в ммоль/л): NaCl — 109, KCl — 2.1, CaCl<sub>2</sub> — 2.6, MgCl<sub>2</sub> — 1.8, глюкоза — 4, глутамин — 0.5 и HEPEs — 2. Физиологический раствор насыщали 100%-ным кислородом, pH доводили до 7.4 раствором NaOH (1 моль/л).

ГТФγS (Sigma) инъецировали в ретикулоспинальные аксоны (с потенциалом покоя не менее 60 мВ) через микропипетку (сопротивление 50—70 МОм) кратковременными импульсами давления (5—15 пси) продолжительностью 200 мс каждый. Микропипетку заполняли раствором следующего состава (в ммоль/л): ГТФγS — 10, ацетат калия — 250, HEPEs — 100 (pH 7.4), Texas Red-декстран-3000 — 5 (для контроля за инъекцией). Контрольные инъекции выполняли с Су-5, связанным с глутатион-S-трансферазой (GST). Уровень флуоресценции в процессе инъекции определяли с помощью CCD-камеры, охлажденной до –60 °C (Princeton Instrument). Перед стимуляцией инъекционный электрод удаляли; стимуляцию частотой 5 Гц в течение 30 мин осуществляли через экстраклеточный электрод.

После микроинъекции кусочки спинного мозга фиксировали иммерсией охлажденным раствором 3%-ного глутаральдегида и 0.5%-ного параформальдегида с 4%-ной таниновой кислотой в натрий-какодилатном буферном растворе (0.1 моль/л, pH 7.4). Через 30 мин препарат разрезали на расстоянии 4—5 мм от места инъекции и дополнительно фиксировали в течение 3 ч в фиксаторе того же состава. После короткой промывки в натрий-какодилатном буферном растворе образцы постфиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в спиртовых растворах возрастающей концентрации и оксиде пропилене. Обезвоженные образцы заливали в Durcupan ACM (Fluka). Серийные ультратонкие срезы толщиной 60—70 нм получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Leica UCT и Ultratom-V, LKB. Полученные срезы монтировали на покрытые формваровой пленкой бленды и после контрастирования в 2%-ном водном растворе уранил-ацетата и цитрате свинца исследовали в электронных микроскопах JEM 100В и Теспаи 12, оборудованном CCD-камерой. Для определения количества синаптических пузырьков и клатриновых структур оцифрованные изображения получали при увеличении 13 000×. Расстояние между соседними кольцами спирали и диаметр тубул измеряли на изображениях, полученных при увеличениях 49 000× и 68 000×.

Инъецированные аксоны сравнивали с соседними неинъецированными аксонами или с аксонами, в которые инъецировали контрольные вещества (GST или ГТФ). Количество синаптических пузырьков и клатриновых структур на 1 мкм активной зоны определяли на трех срезах кластера (центральном, предыдущем и следующим за центральным) и рассчитывали средние величины указанных параметров для каждого кластера.

Электронно-микроскопические исследования выполняли на девяти уровнях начиная с 2.5 мм от инъекции, последний уровень находился в зоне инъекции. При количественной обработке результатов уровни были объединены в две группы на основе особенностей клатриновых структур: зона низких концентраций ГТФγS (I—IV уровни — клатриновые структуры представлены длинными, практически неразветвленными тубулами, покрытыми динаминовой спиралью и оканчивающимися клатриновыми пузырьками) и зона высоких концентраций ГТФγS (V—IX уровни — клатриновые структуры представлены разветвленными тубулами, покрытыми динаминовой спиралью; каждое ответвление заканчивалось клатриновым пузырьком). После визуальной оценки количества длинных неразветвленных и более коротких разветвленных структур в экспериментах *in vitro* (Takei

et al., 1995) можно предположить, что в наших опытах в зоне концентраций содержание ГТФγS было больше 200 мкмоль/л, а в зоне низких концентраций — существенно меньше этого значения. Всего были инъецированы три аксона, в одном аксоне проанализировано девять уровней, в двух аксонах — только по одному уровню для каждой из зон ГТФγS. Для каждого уровня подсчитывали среднюю величину параметров везикулярного кластера (по 3—5 синапсов) и определяли морфометрические характеристики тубул (10—20 структур). Для оценки достоверности различий между зонами низких и высоких концентраций полученные средние величины объединяли соответственно в две группы. Сравнение средних выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента. В тексте приведены результаты статистической обработки с указанием величины средней квадратичной ошибки. На графиках вертикальные отрезки соответствуют величине стандартного отклонения.

Для определения локализации динамина использовали антидинаминовые антитела (DG1), полученные против динамина крысы (1—750 aa) (Grabs et al., 1997). Кусочки спинного мозга предварительно фиксировали в растворах с низким содержанием глутаральдегида (3%-ного параформальдегида и 0.1%-ного глутаральдегида в фосфатном буферном растворе, 0.1 моль/л, pH 7.4, в течение 3 ч), затем разрежали продольно под небольшим углом на вибротоме. Данная методика позволяет открывать участки аксонов, обеспечивая хороший доступ антител к исследуемым внутриклеточным структурам (Evergren et al., 2004). После промывки продольно разрезанные кусочки спинного мозга обрабатывали 1%-ным раствором сывороточного альбумина в Трис-фосфатном буферном растворе (ТФБР) в течение 30 мин и помещали на ночь в первичные антитела (DG1, 2 мкг/мл). После промывки в ТФБР в течение 8 ч их инкубировали с вторичными антителами (козьи к IgG кролика, Amersham; разведение 1 : 50 в ТФБР), конъюгированными с частицами золота диаметром 5 нм. После отмытки в фосфатном буферном растворе (0.1 моль/л) кусочки фиксировали в 3%-ном глутаральдегиде в течение 1 ч, промывали и дофиксировали в 1%-ной четырехокиси осмия. Затем выполняли стандартную процедуру заливки в Durcupan ACM (Fluka).

## Результаты

В контрольных неинъецированных аксонах, стимулированных электрическими импульсами частотой 5 Гц, в эндоцитозной зоне, расположенной на расстоянии 1 мкм вокруг активной зоны синапса, появляются инвагинации аксональной мембраны (карманы) и клатриновые (окаймленные) структуры, характерные для компенсаторного клатринопосредованного эндоцитоза. В карманах встречаются скопления фибриллярного актинового матрикса, который часто располагается в непосредственной близости к клатриновым структурам или сопровождает синаптические везикулы, возвращающиеся в кластер (рис. 1, *a*).

Известно, что сначала с цитоплазматической стороны мембраны появляется островок, покрытый клатрином, который начинает впячиваться, образуя неглубокую ямку (shallow coated pit). Затем она углубляется, наступает стадия, которую называют несокращенной клатриновой структурой (unconstricted coated pit). Следующая стадия — сокращенная клатриновая структура

(constricted coated pit) — отмечается при небольшом удлинении шейки и уменьшении ее диаметра. Иногда шейка сокращенной клатриновой структуры имеет одно-два кольца, образованных динамином. Стадию свободного клатринового пузырька в норме наблюдать не удастся, так как происходит быстрая разборка клатриновой оболочки (Brodin et al., 2000). В стимулированных контрольных препаратах эти структуры чаще встречаются в виде сокращенной клатриновой структуры, которая легко идентифицируется на электронно-микроскопических изображениях после альдегидной фиксации с таниновой кислотой (рис. 1, *a*).

В аксонах, инъецированных ГТФγS, на значительном расстоянии от места инъекции вокруг кластеров синаптических везикул обнаружены необычные, очень длинные тубулярные структуры, оканчивающиеся клатриновым пузырьком. Иногда на тубуле видны одно-два коротких ответвления с клатриновым пузырьком на конце (рис. 1, *b—e*). При больших увеличениях на тубулах хорошо различаются наклонно расположенные кольца, т. е. можно предположить, что они образуют высокоупорядоченную спиральную структуру (рис. 1, *z—e*). Иногда такие тубулы формируют небольшие группы (рис. 1, *в*). Как указывалось, описанные тубулы появляются в зоне, расположенной далеко (2.5 мм) от места микроинъекции, т. е. в зоне низких концентраций ГТФγS, и служат маркерами этой зоны. Совмещение изображений, полученных с двух соседних серийных срезов (рис. 1, *б*), позволяет проиллюстрировать, что подавляющее большинство длинных тубул, покрытых спиралью, оканчиваются пузырьками одинакового диаметра с клатриновой оболочкой.

Спираль, обнаруженная нами на длинных тубулярных структурах, очень похожа на покрытые динаминовой спиралью тубулы, обнаруженные в синапсосамах после инкубации в среде, содержащей ГТФγS. Содержание динамина в спирали было доказано с помощью антидинаминовых антител (Takei et al., 1995). Мы провели иммуноцитохимические исследования после микроинъекции ГТФγS с помощью антидинаминовых антител DG1, используя оригинальный метод, позволяющий антителам легко проникать к антигену (см. раздел «Материал и методика»). Метка обнаружена в непосредственной близости от удлинённой шейки клатриновой структуры, отдельные частицы располагались на кольцах спирали (рис. 1, *ж*).

Количество синаптических пузырьков в кластере на единицу длины активной зоны на срезах, проходящих через середину синаптического кластера (на центральных срезах), уменьшается (рис. 2, *a*), а число прикрепленных к активной зоне пузырьков (docked) достоверно увеличивается в инъецированных аксонах по сравнению с контрольными неинъецированными аксонами (рис. 2, *б*). Количество клатриновых структур на срезах возрастает, причем подавляющее большинство из них представлено покрытыми спиральной структурой длинными тубулами (рис. 2, *в*).

В контрольных аксонах, инъецированных GST и ГТФ, и в неинъецированных аксонах ультраструктура синапсов, количество синаптических пузырьков в кластере, число пузырьков, прикрепленных к активной зоне, и количество клатриновых структур не различались. Необычных длинных тубулярных структур с динаминовой спиралью в этих аксонах не было обнаружено.

Увеличение количества прикрепленных к активной зоне синаптических пузырьков свидетельствует о час-

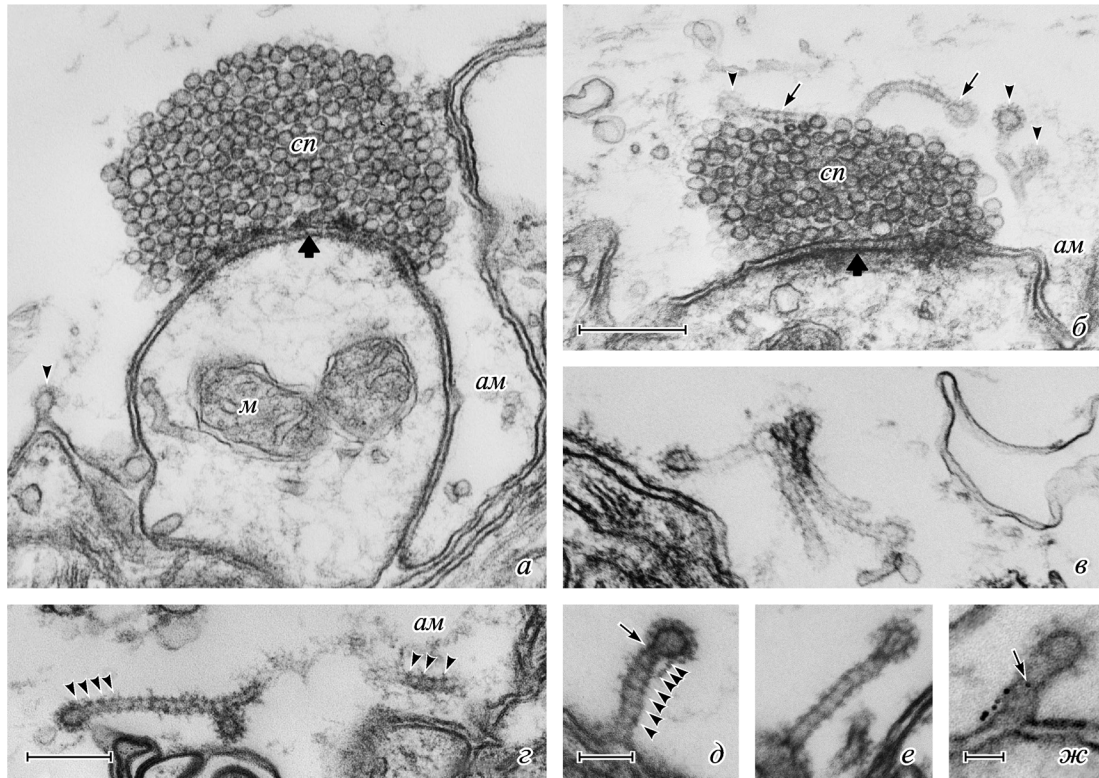


Рис. 1. Ультраструктура синапсов в ретикулоспинальных аксонах миноги: неинъецированных и после микроинъекции ГТФ $\gamma$ S (зона низких концентраций).

*а* — синапс в неинъецированном аксоне; *жирной стрелкой* показана активная зона, *головка стрелки* указывает на клатриновую оболочку пузырька. *б* — синапс в неинъецированном ГТФ $\gamma$ S аксоне; *стрелки* указывают на длинные тубулы, покрытые динаминовой спиралью и оканчивающиеся клатриновым пузырьком, хорошо видна упорядоченность спиральной структуры; остальные обозначения те же, что и на *а*. *в* — группа мембранных тубул с динаминовой спиралью; *г* — длинная тубулярная структура, окруженная филаментозным актиновым матриксом; *головки стрелок* указывают на кольца спирали. *д, е* — примеры тубулярных структур; *стрелка (д)* указывает на ближайший к клатриновому пузырьку промежуток между кольцами спирали, который меньше остальных, диаметр тубулы в этом месте также выглядит сокращенным; *головки стрелок* указывают на кольца спирали. *ж* — иммуноцитохимическая реакция на динамин; *стрелка* указывает на одну из золотых частиц (диаметром 5 нм), расположенную на кольце спирали. *м* — митохондрия, *сп* — синаптические пузырьки, *ам* — актиновый матрикс. *Масштабные отрезки*: *а, б* — 300 нм; *в, г* — 200 нм; *д, е* — 100 нм; *ж* — 50 нм.

тичном подавлении освобождения нейромедиатора. Уменьшение количества синаптических пузырьков, установленное нами даже в зоне низких концентраций, объясняется ингибированием эндоцитоза на стадии освобождения клатриновых пузырьков и обусловлено нарушением ГТФазной активности динамина при связывании ГТФ $\gamma$ S.

В зоне низких концентраций ГТФ $\gamma$ S спиральная структура на тубулах упорядочена. Средний шаг спирали —  $23.1 \pm 0.4$  нм, наружный диаметр тубул —  $26.6 \pm 0.4$  нм. Часто вблизи клатринового пузырька шаг спирали и диаметр тубулы меньше, чем в центральной области или близкой к пресинаптической мембране (рис. 1, *д*).

По мере приближения к месту инъекции, т. е. в зоне высоких концентраций ГТФ $\gamma$ S, длина тубул уменьшается, но резко возрастает количество ответвлений, причем каждое из них оканчивается пузырьком с клатриновой оболочкой. Более короткие разветвленные тубулы служат маркером зоны высоких концентраций. Количество клатриновых структур продолжает увеличиваться, а содержание синаптических пузырьков в кластере снижаться (рис. 2, *а, в*; 3, *а*). В этой зоне вновь появляются сокращенные клатриновые структуры, на короткой шейке которых часто видны одно-два кольца динаминовой спирали (рис. 3, *г, д*). Упорядоченность спирали на разветвленных тубулах нарушается, часто видны лишь короткие

отрезки. Шаг спирали и диаметр тубул на шейках разветвлений обычно меньше, чем на части тубулы у пресинаптической мембраны (рис. 3, *б, в*). В среднем расстояние между кольцами спирали составляет  $19.0 \pm 0.5$  нм, что достоверно отличается от соответствующего значения в зоне низких концентраций (рис. 4, *а*). Диаметр также колеблется ( $23.3 \pm 0.4$  нм), средняя величина диаметра достоверно уменьшается по сравнению с таковой в зоне низких концентраций ГТФ $\gamma$ S (рис. 4, *б*). Вокруг клатриновых структур наблюдаются скопления филаментозного актинового матрикса (рис. 3, *а, б, г, д*). Количество синаптических пузырьков, контактирующих с пресинаптической мембраной в области активной зоны, остается достоверно более высоким по сравнению с контролем (рис. 2, *б*).

## Обсуждение

В результате проведенных исследований нами было показано, что микроинъекции ГТФ $\gamma$ S вызывают нарушения транспорта синаптических мембран на разных этапах везикулярного цикла, что объясняется действием вещества на различные ГТФ-связывающие белки, ответственные за регуляцию транспорта везикул на стадии экзоцитоза и эндоцитоза (Hess et al., 1993; Augustine

et al., 2006). Основные структурные признаки, свидетельствующие о нарушениях нормальной работы центральных синапсов, следующие: увеличение количества прикрепленных к активной зоне синаптических пузырьков; уменьшение количества синаптических пузырьков в кластере; увеличение числа клатриновых структур, ультраструктура которых зависит от концентрации ГТФ $\gamma$ S; увеличение количества филаментозного актинового матрикса, окружающего клатриновые структуры.

Увеличение количества прикрепленных к активной зоне синаптических пузырьков свидетельствует о замедлении эндоцитоза и может быть связано с активацией малой ГТФазой Rab3a, которая выступает в качестве негативного регулятора скорости слияния синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной (Hess et al., 1993; Augustine et al., 1999; Sakane et al., 2006; Tsuboi, Fukuda, 2006). Следовательно, при стимуляции количество синаптических пузырьков в кластере должно быть больше в инъецированных ГТФ $\gamma$ S аксонах по сравнению с соседними неинъецированными аксонами. Полученное нами достоверное уменьшение количества синаптических пузырьков в кластерах инъецированных аксонов свидетельствует о существенном ингибировании эндоцитоза, что подтверждается значительным увеличением количества клатриновых структур, особенно в зоне высоких концентраций ГТФ $\gamma$ S. Для этих структур характерны длинные шейки, покрытые спиральной структурой, которая образована олигомеризованным динамином. Подобные клатриновые структуры были обнаружены при действии ГТФ $\gamma$ S в экспериментах *in vitro* на синапсоматах (Takei et al., 1995). Такая структура подтверждает вывод о блокаде эндоцитоза на стадии освобождения клатринового пузырька от пресинаптической мембраны и необходимости гидролиза ГТФ динамином для осуществления этого процесса. Механизм функционирования динамина в освобождении клатриновых пузырьков до сих пор неясен, так как неизвестно, какие конформационные изменения претерпевает динаминовая спираль в результате гидролиза ГТФ.

В экспериментах *in vitro* показано, что динамин способен тубулировать фосфатидилсериновые (ФС) липосомы с образованием на них спиральной структуры или динаминовая спираль может образовываться на предварительно сформированных липидных нанотубулах, состоящих из 40 % ФС, 40 % галактоцереброзида, 10 % холестерина и 10 % фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфата (Switzer, Hinshaw, 1998; Stowell et al., 1999; Danino et al., 2004). Олигомеризация динамина на липидных структурах может происходить в среде, содержащей ГТФ или его негидролизуемые аналоги, ГДФ, или в среде без нуклеотидов.

В отсутствие нуклеотидов формировалась несокращенная спираль с шагом 13 нм и наружным диаметром 50 нм. При добавлении ГТФ или его негидролизуемого аналога  $\beta$ - $\gamma$ -метилгуанозин 5'-трифосфата на фосфатидилсериновых липосомах образуется сокращенная динаминовая спираль с одинаковыми значениями параметров (шаг спирали 9 нм, наружный диаметр 40 нм). Следовательно, при связывании этих нуклеотидов формируется сокращенная спираль, а гидролиз ГТФ не влияет на основные параметры динаминовой спирали. Единственное отличие, отмеченное авторами, заключалось в некотором скручивании тубул при длительной инкубации в среде с ГТФ (Danino et al., 2004).

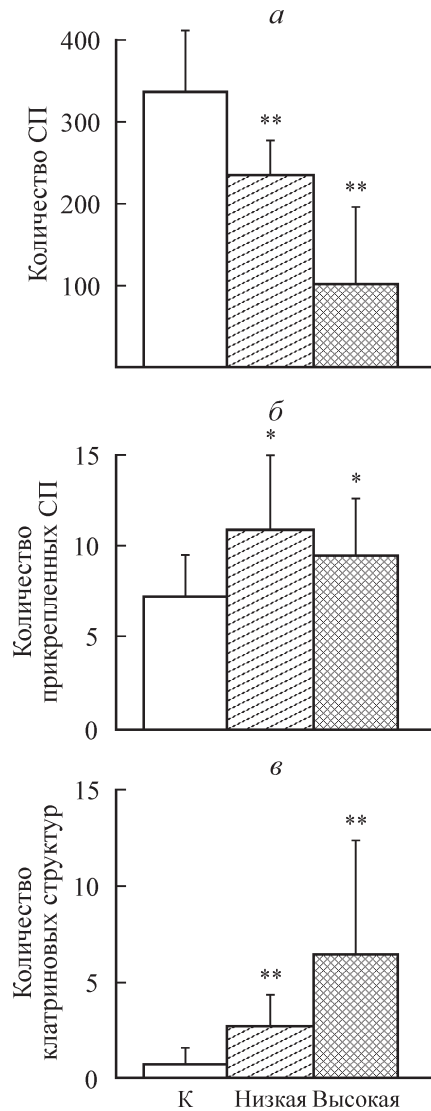


Рис. 2. Результаты количественного анализа действия ГТФ $\gamma$ S (в зонах низкой и высокой концентрации) на синапсы в ретикулоспинальных аксонах спинного мозга миноги.

а — количество синаптических пузырьков (СП) в кластере (в зоне низкой концентрации ГТФ $\gamma$ S количество СП снижается по отношению к соседним неинъецированным аксонам; в зонах высоких концентраций количество СП продолжает снижаться); б — количество прикрепленных к активной зоне пузырьков; в — количество клатриновых структур. Все величины отнесены к 1 мкм активной зоны. Вертикальные отрезки — стандартное отклонение. К — контроль. Различие с контролем достоверно при  $P < 0.01$  (одна звездочка) или при  $P < 0.001$  (две звездочки).

На липидных нанотубулах в среде с ГДФ (или без нуклеотидов) образовывалась несокращенная динаминовая спираль (шаг спирали 20 нм, диаметр тубул 32 нм), а в среде с ГТФ $\gamma$ S — сокращенная (шаг спирали 11 нм, диаметр тубул 32 нм), что совпадает с результатами, полученными на фосфатидилсериновых тубулах. При помещении нанотубул в среду с ГТФ формировалась сокращенная динаминовая спираль, состояние которой после длительной инкубации (при гидролизе ГТФ) переходило в несокращенное (Stowell et al., 1999). Диаметр нанотубул при этом не менялся, что можно объяснить повышенной жесткостью тубул вследствие высокого содержания галактоцереброзида.

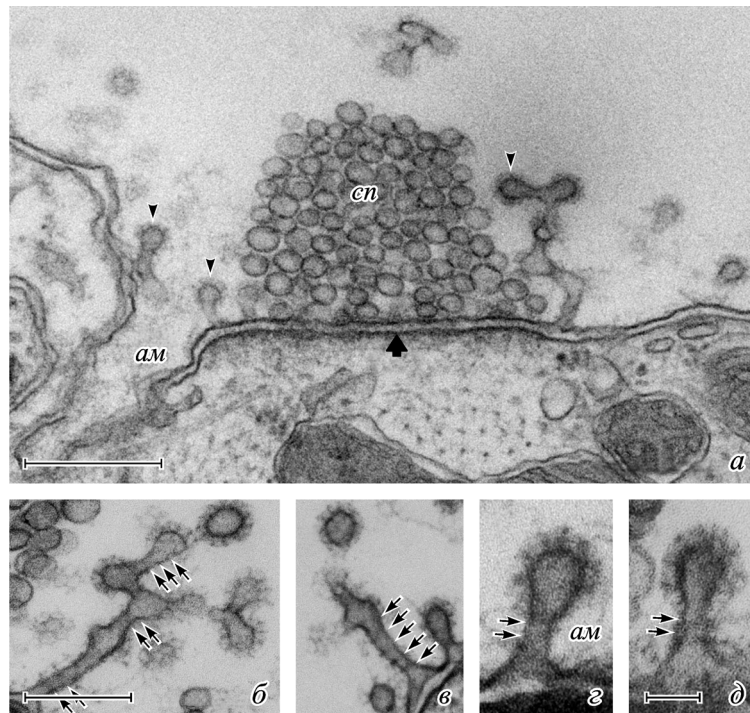
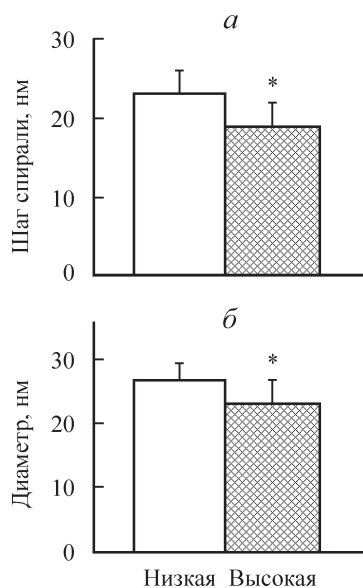


Рис. 3. Ультраструктура синапсов в ретикулоспинальных аксонах миноги после микроинъекции ГТФ $\gamma$ S (в зоне высокой концентрации).

*a* — синапс в инъецированном ГТФ $\gamma$ S аксоне (0.3 мм от места микроинъекции); жирной стрелкой указана активная зона, головками стрелок показаны клатриновые структуры. *б, в* — разветвленные тубулы при большем увеличении: хорошо заметны отсутствие упорядоченности и варибельность шага спирали. *г, д* — короткие сокращенные клатриновые структуры: часто видны 1–2 динаминовых кольца; стрелки (*б–д*) указывают на кольца спирали. *ам* — актиновый матрикс, *сп* — синаптические пузырьки. Масштабные отрезки: *a* — 300 нм; *б, в* — 200 нм; *г, д* — 50 нм.

В наших исследованиях (в условиях *in situ*) было установлено достоверное уменьшение шага спирали и диаметра тубул при увеличении концентрации ГТФ $\gamma$ S (имитирующее ГТФ-связанное состояние), что совпадает с данными, полученными *in vitro*. Впервые показано увеличение значений того и другого параметров при низких концентрациях (по-видимому, соответствующее состоянию динаминовой спирали после завершения гидролиза ГТФ). Блокада эндоцитоза при низких концентрациях ГТФ $\gamma$ S, вероятно, возникает в результате



связывания молекул ГТФ $\gamma$ S при инициации олигомеризации динамина, что подтверждается сокращением тубулы и уменьшением шага спирали только в области, прилегающей к клатриновому пузырьку. При этом большая часть динамина спирали на длинной шейке тубулы, по-видимому, находится в ГДФ-связанном или свободном состоянии. Преимущественное существование динамина в ГТФ-связанном состоянии до его олигомеризации было показано ранее при расчете констант скорости гидролиза в исследованиях олигомеризации динамина без липидных мембран. Была отмечена неустойчивость динаминовой спирали после гидролиза ГТФ, но при сборке спирали на мембранах, обогащенных фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфатом, целостность спиральной структуры сохраняется (Stowell et al., 1999; Sever et al., 2000). Объясняется это тем, что с фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфатом динамин образует слабые, но в случае спирали многочисленные нековалентные связи посредством РН-гомолог-домена. Необходимость существования динамина в ГТФ-связанном состоянии перед образованием спиральной структуры отмечается в недавнем исследовании при изучении мутантной формы динамина дрозофилы *sh<sup>i</sup>s<sup>2</sup>*, которая вызывала ингибирование эндоцитоза вследствие потери динами-

Рис. 4. Изменение величины шага динаминовой спирали и диаметра тубул в эндоцитозной зоне ретикулоспинальных синапсов при увеличении концентрации ГТФ $\gamma$ S.

*a* — изменение величины шага спирали в зонах с разной (низкой или высокой) концентрацией ГТФ $\gamma$ S; *б* — изменение диаметра тубул, покрытых динаминовой спиралью. Вертикальные отрезки — стандартное отклонение. Достоверность различий  $P < 0.001$  указана звездочкой.

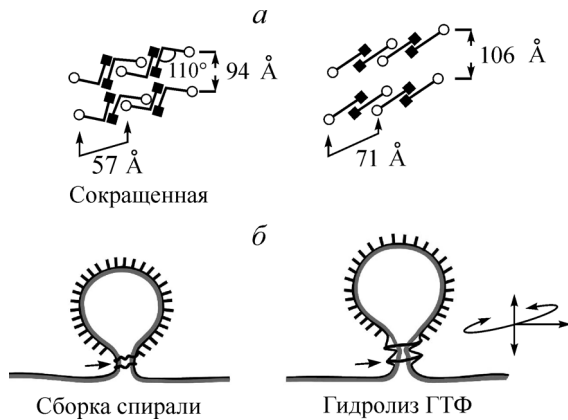


Рис. 5. Предполагаемый механизм освобождения клатринового пузырька при гидролизе ГТФ динамином.

*а* — геометрические характеристики динаминовой спирали в сокращенном (при связывании негидролиземого аналога ГТФ  $\beta$ - $\gamma$ -метиленгуанозин 5'-трифосфатом) и несокращенном (без нуклеотидов) состояниях (по: Chen et al., 2004, с изменениями). *б* — предполагаемый механизм освобождения клатринового пузырька после гидролиза ГТФ динамином: ключевые изменения конформации динамина при гидролизе ГТФ — выпрямление структурной единицы — димера динамина, в результате увеличивается длина динаминовой спирали, что приводит к увеличению шага спирали и диаметра тубулы: поперечные кольца динаминовой спирали на шейке клатриновой структуры (*зигзагообразная спираль* обозначает участки, где динамин связан с ГТФ $\gamma$ S) указаны стрелками; *серая линия* — наружный липидный слой мембраны, *черная линия* — внутренний слой мембраны.

ном способности связывать ГТФ. Эти нарушения восстанавливались в случае дополнительных трех супрессорных мутаций *Sushi*, которые снижали базальную ГТФазную активность динамина, стабилизируя его в ГТФ-связанном состоянии (Narayanan et al., 2005). Таким образом, из полученных нами результатов следует, что при гидролизе ГТФ увеличивается шаг спирали и диаметр шейки клатриновых структур.

С помощью трехмерной реконструкции динаминовой спирали на тубулированных фосфатидилсериновых липосомах в сокращенном (после обработки негидролиземым аналогом  $\beta$ - $\gamma$ -метиленгуанозин 5'-трифосфатом) и несокращенном (без нуклеотидов) состояниях, осуществленной методом электронной криомикроскопии на замороженных гидратированных препаратах (Zhang, Hinshaw, 2001; Chen et al., 2004), показана зигзагообразная структура спирали в сокращенном состоянии и прямая — в несокращенном (рис. 5, *а*). Шаг спирали в сокращенном состоянии составил 9.4 нм, а в несокращенном — 10.6 нм. Разница в длине, занимаемой структурной единицей динаминовой спирали (димером динамина), между двумя крайними состояниями (7.1 и 5.7 нм) составила 1.4 нм. Исходя из этих данных и наших результатов, доказывающих, что сокращенное состояние соответствует ГТФ-связанному динамину, а несокращенное — состоянию динаминовой спирали после гидролиза ГТФ, можно предположить, что основное конформационное изменение динамина выражается в выпрямлении структурной единицы и приводит к увеличению длины динаминовой спирали.

Это положение доказывается существованием в зоне высокой концентрации разветвленных тубул с клатриновыми пузырьками, что сопровождается нарушением упорядоченности динаминовой спирали и появлением участков без спиральной структуры. Очевидно, что при

повышении концентрации ГТФ $\gamma$ S увеличивается вероятность возникновения участков спирали, в которых динамин связан с ГТФ $\gamma$ S. Эти участки стабильны и не могут подвергаться конформационным изменениям, обусловленным гидролизом ГТФ. На других участках, где динамин связан с ГТФ, по-видимому, при гидролизе происходит удлинение динаминовой спирали за счет изменения конформации структурной единицы. В этом случае появление многочисленных ответвлений, возможно, объясняется ломкой динаминовой спирали: «жесткие» участки, где динамин связан с ГТФ $\gamma$ S, препятствуют ее удлинению. На появившихся свободных участках мембраны, богатой фосфоинозидами, могут возникать новые клатриновые структуры (рис. 6). Высокая концентрация фосфоинозитидов может быть дополнительно опосредована активацией еще одной малой ГТФазы — ARF6. Известно, что при связывании ГТФ $\gamma$ S ARF6 активирует фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназу (PIP $4$ K), что приводит к увеличению содержания в липидной мембране фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфата (Krauss et al., 2003).

Изменение длины динаминовой спирали при гидролизе ГТФ подтверждается результатами модельных экспериментов на липидных тубулах с динаминовой спиралью, образующихся после добавления биотинилированного динамина к искусственно созданным липидным мембранам. После добавления ГТФ покрытые стрептавидином микробусинки вращались вокруг тубул, имеющих свободный конец, что указывает на изменение длины динаминовой спирали при гидролизе ГТФ (Roux et al., 2006).

Сборка динаминовой спирали начинается, по-видимому, от клатриновой оболочки, о чем свидетельствуют данные об ингибировании эндоцитоза после микроинъекции рекомбинантной части амфифизина, содержащей только SH3-домен, на стадии сокращенных клатриновых структур без спирали, образованной динамином (Shupliakov et al., 1997). Эти данные свидетельствуют о том, что амфифизин может рекрутировать динамин при инициа-

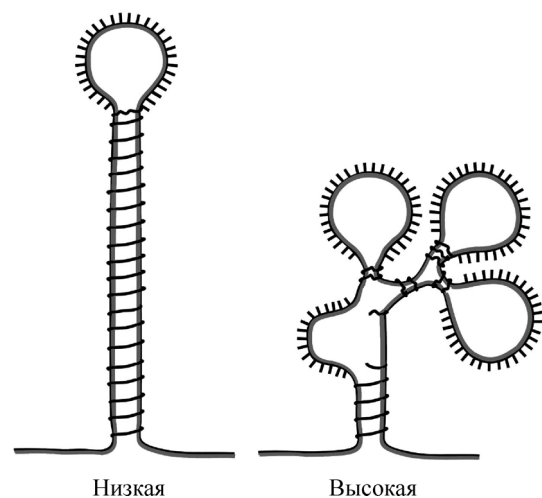


Рис. 6. Схема трансформации клатриновых структур при низкой и высокой концентрациях ГТФ $\gamma$ S.

Участки спирали с динамином, связанным с ГТФ $\gamma$ S (*зигзагообразная спираль*), препятствуют увеличению длины спирали за счет гидролиза ГТФ; это приводит к поломке спирали и появлению свободных участков мембраны, на которой возникают новые клатриновые структуры.

лизации сборки спирали, поскольку динамин не способен самостоятельно связываться с клатрином. Динамин в ГТФ-связанном состоянии образует короткую сокращенную спираль (1—2 кольца). При таком соотношении динамина и липида скорость гидролиза ГТФ максимальна (Stowell et al., 1990).

Клатриновая структура, состоящая из клатринового пузырька и короткой (30—40 нм) шейки, относительно стабильна, так как положительная кривизна пузырька стабилизируется высокой отрицательной кривизной шейки (McMahon, Gallop, 2005). При этом шейка находится в максимально нестабильном состоянии вследствие высокой отрицательной кривизны, что выражается в значительном радиальном напряжении между двумя слоями мембраны, поскольку внутренний слой короче наружного. Слои мембраны асимметричны, внутренний обогащен фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфатом, и именно с ним связывается динамин (Takei et al., 1998; Burger et al., 2000). Гидролиз ГТФ вызывает выпрямление структурных единиц динаминовой спирали (напомним, структурная единица — димер динамина).

Легко подсчитать: если спираль состоит из двух оборотов и длина каждой структурной единицы при выпрямлении увеличивается на 1.4 нм (см. выше), то спираль включает в себя 28 (2 кольца) структурных единиц и ее длина увеличивается примерно на 39 нм! Каждое кольцо наклонено под углом около 160°, поэтому удлинение спирали должно привести к увеличению как шага спирали, так и диаметра тубул. Это подтверждается значениями параметров несокращенной спирали, полученных в наших исследованиях и в других работах (Sweitzer, Hinshaw, 1998; Stowell et al., 1999; Zhang, Hinshaw, 2001; Chen et al., 2004).

Важная особенность предлагаемой модели — сочетание горизонтального и вертикального сдвигов (увеличение шага и диаметра динаминовой спирали), происходящих одновременно при высокой скорости гидролиза ГТФ. Известно, что при оптимальном соотношении динамина и липида ГТФазная активность олигомеризованного динамина увеличена по сравнению с базальной активностью в 1000 раз (Stowell et al., 1999). Это определяет высокую скорость сдвигов и в случае горизонтального сдвига (с учетом связи динамина посредством РН-гомолог-домена с фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфатом во внутренней части мембран) может приводить к нарушению внутримембранных гидрофобных связей, являющихся основой стабильности плазматических мембран (рис. 5, б). Сочетанное действие этих факторов приводит к отделению клатринового пузырька от мембраны.

Неравномерность гидролиза ГТФ могла бы привести к закручиванию шейки клатриновой структуры и соответственно к уменьшению возникающего напряжения. Во избежание этого клатриновый пузырек должен быть зафиксирован в определенном положении. Закрепление пузырька, по-видимому, осуществляется посредством актинового цитоматрикса. Ранее нами было показано, что микроинъекция в аксоны веществ, нарушающих полимеризацию актина, приводила к нарушению эндоцитоза, что свидетельствует о его зависимости от актинового цитоматрикса (Shupliakov et al., 2002). Микроинъекция ГТФγS вызывала значительную пролиферацию актинового матрикса (см. рис. 3), что объясняется увеличением синтеза мембранного фосфатидилинозитол-(4,5)-дифосфата, а также активацией малой ГТФазы CDC42, стимулирующей образование F-актина (Zigmond et al.,

1997; Jarousse, Kelly, 2001). Кроме того, нельзя исключить возможность участия актина в дополнительном увеличении напряжения на шейке сокращенных клатриновых структур, способствующем отделению клатриновых пузырьков от пресинаптической мембраны (Roux et al., 2006).

На основании полученных данных можно предложить следующий молекулярный механизм работы динамина при освобождении клатриновых везикул. Основным фактором выступает удлинение динаминовой спирали при гидролизе ГТФ. Одновременное быстрое увеличение шага и диаметра динаминовой спирали приводит к нарушению локальных (в местах контакта внутреннего слоя мембраны с динаминовой спиралью) гидрофобных связей липидного бислоя на шейке сокращенной клатриновой структуры и освобождению клатринового пузырька.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлена ведущая роль ингибирования эндоцитоза в нарушении цикла синаптических везикул, вызванном микроинъекцией ГТФγS в ретикулоспинальные аксоны спинного мозга миноги. Ингибирование эндоцитоза обусловлено блокадой функции динамина — освобождения клатриновых пузырьков от пресинаптической мембраны — вследствие его связывания с негидролизуемым аналогом ГТФ.

Мы благодарим О. Шуплякова за предоставленную возможность проведения микроинъекций и выполнения частичного электронно-микроскопического анализа материала на микроскопе Тесна 12, оборудованном ССД-камерой, а также за предоставленные антитела DG1, за обсуждение полученных данных и комментарии и А. Сундборгер за помощь в проведении иммуноцитохимической реакции с антидинаминовыми антителами DG1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48973-а) и гранта Шведской Королевской академии наук для сотрудничества с Российскими академическими учреждениями в области медицины.

#### Список литературы

- Augustine G. J., Burns M. E., DeBello W. M., Hilfiker S., Morgan J. R., Schweizer F. E., Tokumaru H., Umayahara K. 1999. Proteins involved in synaptic vesicle trafficking. *J. Physiol.* 520 : 33—41.
- Augustine G. J., Morgan J. R., Villalba-Galea C. A., Jin S., Prasad K., Lafer E. M. 2006. Clathrin and synaptic vesicle endocytosis: studies at the squid giant synapse. *Biochem. Soc. Trans.* 34 : 68—72.
- Brodin L., Low P., Shupliakov O. 2000. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 : 312—320.
- Burger K. N., Demel R. A., Schmid S. L., de Kruijff B. 2000. Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry.* 39 : 12 485—12 493.
- Chen Y. J., Zhang P., Egelman E. H., Hinshaw J. E. 2004. The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 : 574—575.
- Danino D., Moon K. H., Hinshaw J. E. 2004. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J. Struct. Biol.* 147 : 259—267.



- Evergren E., Tomilin N., Vasylijeva E., Sergeeva V., Bloom O., Gad H., Capani F., Shupliakov O. 2004. A pre-embedding immunogold approach for detection of synaptic endocytic proteins *in situ*. J. Neurosci. Methods. 135 : 169—174.
- Grabs D., Slepnev V. I., Songyang Z., David C., Lynch M., Cantley L. C., De Camilli P. 1997. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. J. Biol. Chem. 272 : 13 419—13 425.
- Hess S. D., Doroshenko P. A., Augustine G. J. 1993. A functional role for GTP-binding proteins in synaptic vesicle cycling. Science. 259 : 1169—1172.
- Heuser J. E., Reese T. S. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol. 57 : 315—344.
- Hinshaw J. E., Schmid S. L. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature. 374 : 190—192.
- Jarousse N., Kelly R. B. 2001. Endocytotic mechanisms in synapses. Curr. Opin. Cell Biol. 13 : 461—469.
- Krauss M., Kinuta M., Wenk M. R., De Camilli P., Takei K., Haucke V. 2003. ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. J. Cell Biol. 162 : 113—124.
- McMahon H. T., Gallop J. L. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. Nature. 438 : 590—596.
- Narayanan R., Leonard M., Doo Song B., Schmid S. L., Ramaswami M. 2005. An internal GAP domain negatively regulates presynaptic dynamin *in vivo*: a two-step model for dynamin function. J. Cell Biol. 169 : 117—126.
- Roux A., Uyhazi K., Frost A., De Camilli P. 2006. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. Nature. 441 : 528—531.
- Sakane A., Manabe S., Ishizaki H., Tanaka-Okamoto M., Kiyokage E., Toida K., Yoshida T., Miyoshi J., Kamiya H., Takai Y. 2006. Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 10 029—10 034.
- Sever S., Damke H., Schmid S. L. 2000. Dynamin: GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. J. Cell Biol. 150 : 1137—1148.
- Sever S., Muhlberg A. B., Schmid S. L. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. Nature. 398 : 481—486.
- Shupliakov O., Bloom O., Gustafsson J. S., Kjaerulff O., Low P., Tomilin N., Pieribone V. A., Greengard P., Brodin L. 2002. Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 14 476—14 481.
- Shupliakov O., Low P., Grabs D., Gad H., Chen H., David C., Takei K., De Camilli P., Brodin L. 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. Science. 276 : 259—263.
- Stowell M. H., Marks B., Wigge P., McMahon H. T. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. Nat. Cell Biol. 1 : 27—32.
- Sweitzer S. M., Hinshaw J. E. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. Cell. 93 : 1021—1029.
- Takei K., Haucke V. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. Trends Cell Biol. 11 : 385—391.
- Takei K., Haucke V., Slepnev V., Farsad K., Salazar M., Chen H., De Camilli P. 1998. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. Cell. 94 : 131—141.
- Takei K., McPherson P. S., Schmid S. L., De Camilli P. 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. Nature. 374 : 186—190.
- Tsuboi T., Fukuda M. 2006. Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. J. Cell Sci. 119 : 2196—2203.
- Zhang P., Hinshaw J. E. 2001. Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. Nat. Cell Biol. 3 : 922—926.
- Zigmond S. H., Joyce M., Borleis J., Bokoch G. M., Devreotes P. N. 1997. Regulation of actin polymerization in cell-free systems by GTPgammaS and Cdc42. J. Cell Biol. 138 : 363—374.

Поступила 13 IX 2006

PERTURBATIONS OF THE VESICLE CYCLE IN RETICULOSPINAL SYNAPSES  
IN LAMPREY AFTER PRESYNAPTIC MICROINJECTIONS OF GTPγS

N. V. Tomilin, E. V. Vasilyeva, A. V. Gilarov, T. F. Chernyak  
Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg;  
e-mail: Nikolay\_Tomilin@rambler.ru

The synaptic vesicle cycle sustains neurotransmission and keeps pace between exo- and endocytosis in synapses. GTP-binding proteins function as key regulators of this cycle. The large GTPase dynamin is implicated in fission of clathrin-coated vesicles from the presynaptic membrane during endocytosis. The present study addresses the effect of the non-hydrolyzable GTP analog, GTPγS, on the assembly of the dynamin fission complex *in situ*. Intraaxonal microinjections of GTPγS induced distinct ultrastructural changes in synapses: the number of synaptic vesicles at active zones was reduced, and the number of docked vesicles was increased; at the same time the number of clathrin-coated intermediates at the synaptic endocytic zone was increased, indicating that synaptic vesicle recycling was inhibited. Clathrin-coated intermediates with unusual shape were found. At low concentrations of GTPγS they were represented by long tubules decorated by spirals containing dynamin and clathrin-coated vesicles on the top. At high concentrations of GTPγS the tubular structures were shorted and branched. The pitch of the spiral and tubule's diameter were significantly reduced ( $23.1 \pm 0.4$  and  $19.0 \pm 0.5$  nm, respectively, as compared to those at low concentration of GTPγS,  $26.6 \pm 0.4$  and  $23.3 \pm 0.4$  nm;  $P < 0.001$ ). We suggest that these structural changes correspond to distinct steps in the fission reaction. A model is proposed. It implies that the fast GTP hydrolysis leads to an increase in length of the spiral due to the straightening of the dynamin dimers, composing the spiral. This leads to a fast increase both in the pitch and the diameter of the helix. The shift in diameter breaks the local hydrophobic interactions between the inner and the outer leaflets of the lipid membrane at the sites of dynamin binding. Stretching of the spiral leads to an expansion of the neck in the longitudinal direction and promotes severing of the membrane that subsequently results in the release of the clathrin-coated vesicle.