

НЕЙРОННАЯ ПОРОСОМА В МОЗГЕ КРЫСЫ И КОШКИ

© В. Г. Окунева, Н. Д. Джанпаридзе, Н. Т. Котария, М. Г. Жвания¹

Институт по изучению жизни, Тбилиси, Грузия;

¹ *электронный адрес: mzia_zhvania@iliauni.edu.ge*

Известно, что во время секреции внутриклеточные секреторные везикулы стыкуются и частично сливаются с основанием супрамолекулярной чашевидной структуры поросомы, находящейся на плазматической мембране, выделяя при этом наружу содержимое везикулы. В нейронах поросома описана как чашеобразная липопротеиновая структура (12—17 нм в диаметре) с центральным затвором, расположенная в пресинаптической мембране; с этой структурой, выделяя нейротрансмиттер, соприкасаются и сливаются синаптические везикулы диаметром 50 нм. В последнее десятилетие нейронные поросомы изолировали и определили их химический состав. Далее поросома была структурно и функционально реконструирована в искусственную липидную мембрану и ее роль как секреторного портала нейрона была окончательно установлена. С применением атомно-силовой и электронной микроскопии, а также исследованием картирования электронной плотности и трехмерного контура поросомы были выявлены белки нейронной поросомы и описаны особенности их распределения. В настоящей работе, исследуя электронную микроскопию высокого разрешения, мы впервые показали наличие нейронной поросомы в пресинаптической мембране мозга кошки и вновь подтвердили ее присутствие в пресинаптической мембране мозга крысы. Наши результаты еще раз указывают на чашеобразное строение поросомы мозга крысы и свидетельствуют о том, что в нервной терминали кошки поросома имеет аналогичное строение и размеры. Таким образом, в работе впервые продемонстрировано наличие универсальных поросом у разных видов млекопитающих.

Ключевые слова: нейронная поросома, электронная микроскопия, кошка, крыса.

Принятые сокращения: ГП — глубина поросомы, ДП — диаметр поросомы.

В настоящее время хорошо известно, что поросома — это супрамолекулярные липопротеиновые структуры клеточных мембран нейронов, экзокринных, эндокринных и нейроэндокринных клеток. Они представляют собой особое место, где окруженные мембраной секреторные везикулы стыкуются и сливаются, выделяя при этом содержимое наружу (Schneider et al., 1997; Jeremic et al., 2003; Siksou et al., 2007). Было признано, что поросома является универсальной машиной клетки (Allison, Doktyez, 2006; Anderson, 2006; Jena, 2007; Paknikar, Jeremic, 2007). В нейронах, нейроэндокринных клетках и клетках поджелудочной железы описаны общая морфология и состав поросомы (Jena et al., 2003; Jeremic et al., 2003; Cho et al., 2007); выявлен также трехмерный набор белков нейронной поросомы мозга крысы (Cho et al., 2008). Оказалось, что поросомы состоят из холестерина (Cho et al., 2007; Paknikar, 2007) и белков (Jena et al., 2003; Jeremic et al., 2003; Cho et al., 2004), таких как SNAP-23/25, синтаксин, синаптогамин, АТРаза NSF; в состав поросом входят также белки цитоскелета — актин, α -фодрин и виментин, Ca^{2+} -каналы $\beta 3$ и $\alpha 1c$, Cl^- -каналы $\text{ClC}2$, $\text{ClC}3$ и их изоформы. Установлено, что холестерин, неотъемлемый компонент поросомального комплекса, необходим для сохранения его биомолекулярной стабильности и целостности, а также для межмолекулярных взаимодействий, входящих в состав комплекса белков (Cho

et al., 2007; Wheatley, 2007). В основании комплекса поросомы описаны также t-SNAREs и каналы кальция (Jena et al., 2003; Cho et al., 2005) и показано, что в процессе секреции открытие и закрытие поросомы регулируется актином (Schneider et al., 1997; Jena et al., 2003; Cho et al., 2010). Электронно-микроскопические исследования также свидетельствуют о наличии в пресинаптической мембране уплотненной структуры диаметром 12—17 нм, с которой сливаются синаптические везикулы размером 45—50 нм (Siksou et al., 2007). Разрешение электронного микроскопа не позволяет детально проанализировать структуру поросомы (Siksou et al., 2007), однако трехмерный анализ пресинаптической мембраны ясно показывает морфологические очертания поросомального комплекса на данной мембране.

Недавние работы с применением атомно-силового микроскопа высокого разрешения (Cho et al., 2010) указывают на присутствие в пресинаптических мембранах изолированных нейронных поросом мозга крысы в открытом, частично открытом и закрытом состояниях. Эти работы также показали, что когда центральный стержень ретрактирован в поросому, она находится в открытом состоянии, если же стержень отведен наружу, открытая поросома «запечатывается», переходя в закрытое состояние. Таким образом, результаты подтверждают гипотезу о том, что центральный стержень оперирует как выходной

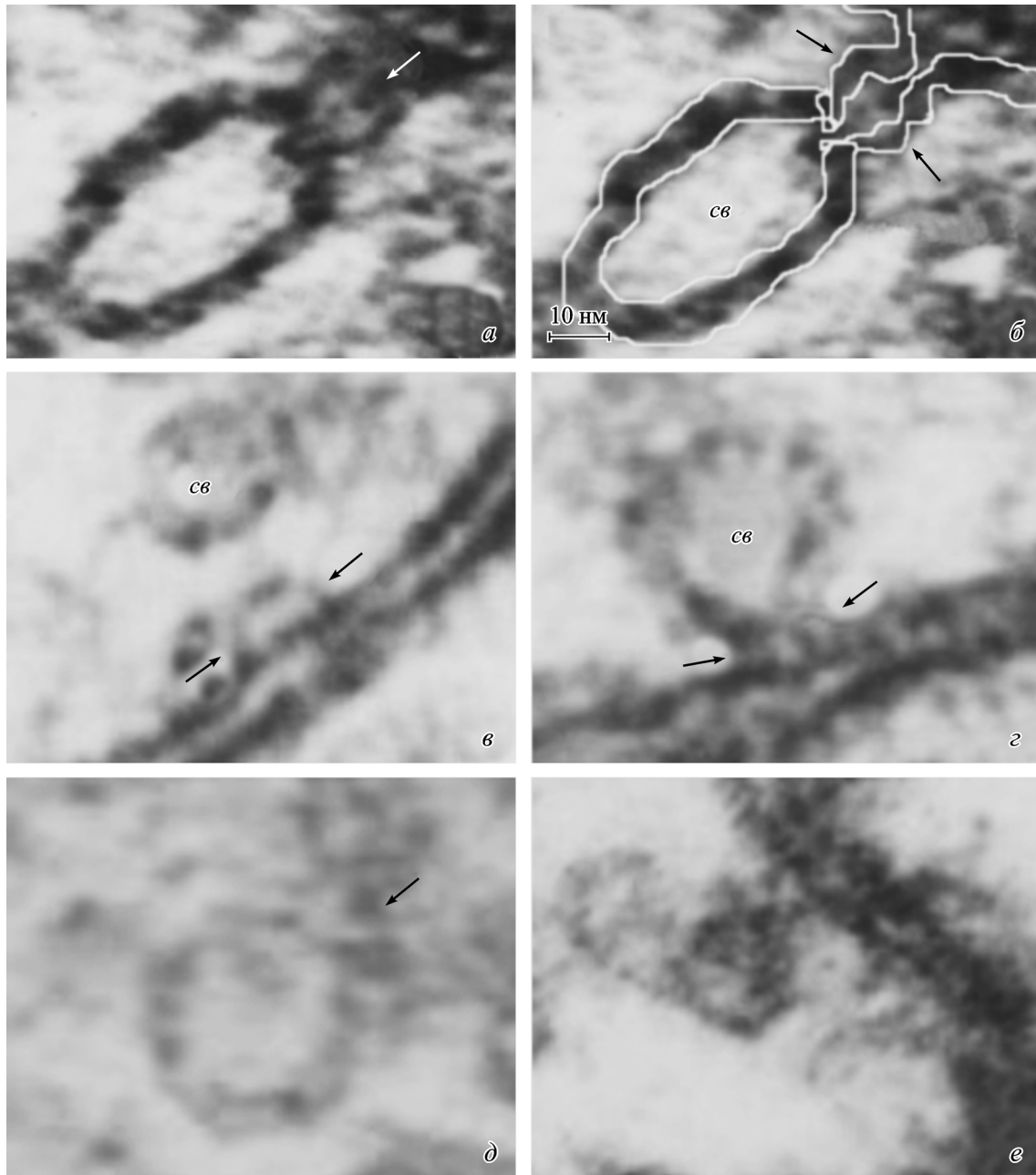


Рис. 1. Электронные микрофотографии нейропоросомального комплекса в мозге крысы. Чашеобразные поросомы размером 10—17 нм на пресинаптических мембранах и частично слившиеся с поросомой синаптические везикулы (св) диаметром 50 нм.

a — центральный затвор открытой поросомы (белая стрелка); *б* — поросома (черные стрелки) и синаптические везикулы обозначены белым контуром; *в* — на пресинаптической мембране черными стрелками обозначена поросомальная структура на расстоянии от синаптических везикул; рисунок показывает, что поросомы являются постоянными структурами пресинаптической мембраны, а не образуются слиянием с ней синаптических везикул; *г* — синаптические везикулы, сливающиеся с чашевидной поросомой (черные стрелки); *д* — хорошо выраженный центральный затвор поросомы; *е* — небольшие (25—30 нм) светлые синаптические везикулы, сливающиеся с поросомальным комплексом на пресинаптической мембране. Небольшой размер синаптических везикул свидетельствует о том, что везикула уже частично выделила свое содержимое.

канал поросомы. На эту тему были написаны многочисленные работы, некоторые из которых цитируются в нашей статье (Jena et al., 2009).

Настоящее исследование проведено с целью дальнейшего изучения пресинаптической мембраны мозга крысы, а также определения возможного присутствия подобной структуры в мозге кошки.

Материал и методика

Выделение мозга кошки и крысы и электронная микроскопия. Транскардиальную перфузию крыс и кошек проводили под пентобарбиталовым наркозом (100 мг/кг), введением 0.9%-ного NaCl, 500 мл 4%-ного параформальдегида (Sigma Aldrich, США) и 2.5%-ного глутаральдегида (Sigma Aldrich, США) на 0.1 М фосфатном буфере (PB), pH 7.4, при давлении 120 мм Hg. Мозг был выделен из черепа и оставлен на

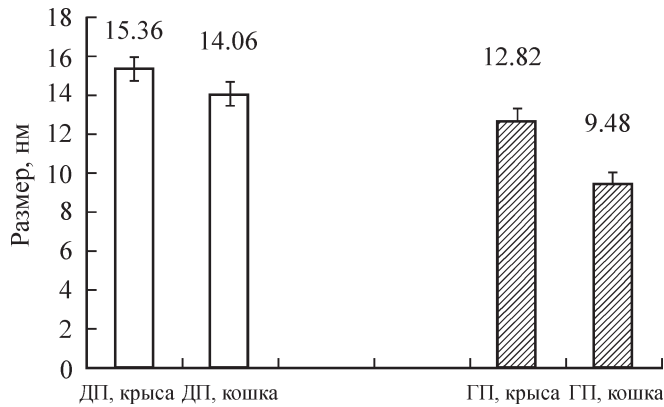


Рис. 2. Диаметр (ДП) и глубина (ГП) нейронной поросомы в мозге крысы и кошки.

Различия между значениями для крысы и кошки достоверны при $P \leq 0.05$ (ДП) или $P \leq 0.001$ (ГП).

ночь в том же фиксаторе. С кусочков мозга правого полушария, содержащих гиппокамп, получали 400-микронные срезы, промывали в 0.1 М РВ и помещали в раствор 2.5%-ного глутаральдегида до дальнейшей обработки. В процессе обработки срезы опять промывали в 0.1 М РВ, постфиксировали в течение 2 ч в 1%-ном растворе четырехоксида осмия и снова промывали в 0.1 М РВ. Гиппокамп идентифицировали в оптическом микроскопе Leica, отделяли, обезвоживали в восходящей серии спирта и ацетона и заливали в аралдит. Блоки триммеровали и на ультрамикротоме (Reichert, Австрия) получали тонкие срезы толщиной 70—75 нм. Срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и изучали в электронных микроскопах JEM 100 С (JEOL), HITACHI и TESLA. От каждого животного брали 115 срезов.

Морфометрический анализ поросом в пресинаптических мембранах синаптических окончаний кошки и крысы проводили для определения их диаметра и глубины. Всего изучили 184 синаптических окончания гиппокампа: 91 из мозга крысы и 93 из мозга кошки. Идентифицировали 64 нейронные поросомы, глубина и диаметр которых были измерены с помощью компьютерной программы Image J (версия 1.41).

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с помощью однонаправленной (one-way) ANOVA для выявления различий между определенными параметрами нейрональной поросомы, в частности диаметра в открытом состоянии и глубины в мозге крысы и кошки. Достоверность межгруппового различия определяли с помощью двухвыборочного t -теста при $P \leq 0.05$.

Результаты

В связи с тем что размер нейронной поросомы составляет 10—18 нм, идентификация ее структуры с помощью электронного микроскопа трудна. Затруднения в визуализации нейронных поросом усугубляются высокой концентрацией белков в пресинаптической мембране. Поэтому препараты из ткани мозга для электронного микроскопа с высоким разрешением приготавливали как можно быстрее. На рис. 1 отчетливо видны чашевидная структура нейронной поросомы, а также слившиеся с ней синаптические везикулы. Однонаправленный анализ ANOVA выявил достоверное различие морфометрических параметров ней-

ронной поросомы: ($F(3,131) = 22.85, P < 0.001$) (величины 3 и 131 — оценка дисперсии между группами и внутри групп соответственно). Согласно полученным данным, диаметр поросомы (ДП) у крысы и кошки варьирует в пределах 9—19 и 10—18 нм соответственно; глубина поросомы (ГП) у крысы и кошки варьирует в пределах 7—21 и 5—18 нм соответственно. Среднее значение ДП у крысы (15.36 ± 0.49) превышает то же значение у кошки (14.06 ± 0.40) на 8.5 % ($t = 2.08, P < 0.05$), а средние величины ГП у крысы и кошки различаются на 26 % ($t = 4.11, P < 0.001$) в пользу крысы (рис. 2).

Итак, сравнение параметров чашеобразной поросомальной структуры пресинаптической мембраны (ДП и ГП) у кошки и крысы обнаружило, во-первых, их межвидовые различия, а во-вторых — их вариабельность в пределах одного вида.

Обсуждение

Поросомы представляют собой универсальный секреторный механизм клеток: их присутствие доказано в таких секреторных образованиях, как эндокринные клетки, астроциты, нейроны и ацинарные клетки экзокринной поджелудочной железы (Jena et al., 2009). Несмотря на многочисленные структурные и композиционные сходства поросом в различных секреторных клетках, их размеры могут различаться. Наряду с другими причинами этот факт может быть связан с разным размером секреторных везикул в «быстрых» и «медленных» секреторных образованиях, а также возможным наличием в одной и той же клетке поросом разного типа, предназначенных для везикул с различным грузом.

Так как характер слияния везикул разного размера различен (меньшие сливаются более эффективно, чем крупные) (Jena, 2007, 2008, 2009), предполагают, что эффективность слияния везикул с пресинаптической мембраной определяется кривизной как секреторных везикул, так и основанием поросомы (Jena, 2007, 2008, 2009). Характеристике поросом разного размера посвящен ряд работ (Jena, 2007, 2008, 2009). Ранее, используя атомно-силовую и электронную микроскопию, мы показали, что в мозге крысы синаптические везикулы диаметром 40—50 нм мимолетно соприкасаются с нейронной поросомой диаметром 8—10 нм (Cho et al., 2004). В противоположность этому, в медленных секреторных клетках, таких как ацинарные клетки экзокринной поджелудочной железы, крупные секреторные гранулы размером 1000 нм выделяют содержимое в результате кратковременного слияния с основанием поросомы, диаметр которой составляет 100—180 нм (Schneider et al., 1997; Cho et al., 2002). Исходя из таких данных мы полагаем, что должна существовать зависимость между размерами чашеобразной поросомы и стыкующейся с ней секреторной везикулы. Скорость выделения, так же как и объем везикулярного содержимого, должны зависеть от размера поросомы. В настоящем электронно-микроскопическом исследовании, изучив размеры нейронной поросомы гиппокампа крысы и кошки, мы показали ее вариабельность не только в пределах вида, но и между видами. Для получения наиболее полной информации, мы измерили не только ДП, но и ГП (Cho et al., 2004).

Мы впервые показываем наличие поросомы в мозге кошки. При этом ДП и ГП в мозге кошки и крысы отличаются друг от друга, особенно ГП. На данном этапе трудно

объяснить этот факт. Одной из причин, возможно, является разное молекулярное строение отдельных поросом. Подобная разница встречается как у поросом разных видов, так и в пределах одного вида. Другой причиной, которая может определять различные размеры нейронных поросом, возможно, является высокая динамичность ее структуры, которая не выявляется на электронных микрофотографиях даже высокого разрешения, однако выявляется с помощью атомно-силовой микроскопии и картирования трехмерного контура поросомы, которое отражает разное конформационное состояние (открытое, частично открытое или закрытое) центрального затвора и поросомы в целом (Cho et al., 2010).

Для объяснения изменчивости размера ГП необходимы дальнейшие исследования. Тем не менее наши данные представляют новое прямое свидетельство того, что в мозге крысы и кошки синаптические везикулы стыкуются с основанием поросомы; они также ясно указывают на то, что тонкое соответствие размера поросомы конкретному секреторному процессу существует не только в секреторных клетках разного типа, но и в нервных терминалах одного и того же отдела у разных животных. Согласно нашим измерениям, ГП у обоих экспериментальных животных колеблется от 5 до 21 нм.

Новейшими методологическими подходами (атомно-силовой микроскопией, электронной микроскопией, измерением электронной плотности и картированием 3-мерного изображения) (Cho et al., 2008, 2010) выявлены структура и ансамбль белков внутри поросомального комплекса, что дает новую возможность для понимания функционирования поросомы. Атомно-силовая микроскопия выявила на препаратах изолированных синапсов пресинаптических мембран наличие центрального затвора поросомы в различных конформационных состояниях (открытом, полуоткрытом и закрытом); это позволило авторам предположить вовлечение затвора в процесс нейротрансмиссии, в частности его участие в быстром открытии или закрытии поросомы посредством вертикального движения (Cho et al., 2010). Различные позиции затвора специфицируют нейропоросому как высокодинамичную структуру (Cho et al., 2010). С этим динамизмом, возможно, связан широкий диапазон ГП, наблюдаемый на электронных микрофотографиях. Чтобы установить размер ГП, соответствующий различным конформационным состояниям (открытому, полуоткрытому и закрытому), необходимо измерить значительно большее количество поросом независимо от методических особенностей. Однако точность исследования с применением электронной микроскопии (которая дает 2-мерное изображение объекта) значительно меньше, чем в случае использования атомно-силовой микроскопии, дающей 3-мерное изображение структуры. Тем не менее наши данные являются не только новым прямым доказательством стыковки синаптических везикул с основанием поросомы в синаптических терминалах мозга крысы и кошки, но еще прямым указанием на тонкую настройку размеров поросом под соот-

ветствующий секреторный процесс как в различных секреторных клетках, так и в нервных окончаниях одного и того же отдела разных видов животных.

Список литературы

- Allison D. P., Doktyez M. J. 2006. Cell secretion studies by force microscopy. *J. Cell Mol. Med.* 10 : 847—856.
- Anderson L. L. 2006. Cell secretion—finally sees the light. *J. Cell Mol. Med.* 10 : 270—272.
- Cho S.-J., Jeftinija K., Glavaski A., Jeftinija S., Jena B. P., Anderson L. L. 2002. Structure and dynamics of the fusion pores in live GH-secreting cells revealed using atomic force microscopy. *Endocrinology.* 143 : 1144—1148.
- Cho S.-J., Quinn A. S., Stromer M. H., Dash S., Cho J., Taatjes D. J., Jena B. P. 2002. Structure and dynamics of the fusion pore in live cells. *Cell Biol. Int.* 26 : 35—42.
- Cho W.-J., Jeremic A., Jena B. P. 2005. Direct interaction between SNAP-23 and L-type calcium channel. *J. Cell Mol. Med.* 9 : 380—386.
- Cho W.-J., Jeremic A., Jin H., Ren G., Jena B. P. 2007. Neuronal fusion pore assembly requires membrane cholesterol. *Cell Biol. Int.* 31 : 1301—1308.
- Cho W.-J., Jeremic A., Rognlien K. T., Zhvania M. G., Lazrshvili I., Tamar B., Jena B. P. 2004. Structure, isolation, composition and reconstitution of the neuronal fusion pore. *Cell Biol. Int.* 28 : 699—708.
- Cho W.-J., Lee J.-S., Jena B. P. 2010. Conformation states of the neuronal porosome complex. *Cell Biol. Int.* 34 : 1129—1132.
- Cho W.-J., Ren G., Jena B. P. 2008. EM 3D contour maps provide protein assembly at the nanoscale within the neuronal porosome complex. *J. Microscopy.* 232 : 106—111.
- Jena B. P. 2007. Secretion machinery at the cell plasma membrane. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 : 437—443.
- Jena B. P. 2008. Porosome: the universal molecular machinery for cell secretion. *Mol. Cells.* 26 : 517—529.
- Jena B. P. 2009. Porosome: the secretory portal in cells. *Biochemistry.* 49 : 4009—4018.
- Jena B. P., Cho S.-J., Jeremic A., Stromer M. H., Abu-Hamad R. 2003. Structure and composition of the fusion pore. *Biophys. J.* 84 : 1—7.
- Jeremic A., Kelly M., Cho S.-J., Stromer M. H., Jena B. P. 2003. Reconstituted fusion pore. *Biophys. J.* 85 : 2035—2043.
- Paknikar K. M. 2007. Landmark discoveries intracellular transport and secretion. *J. Cell Mol. Med.* 11 : 393—397.
- Paknikar K. M., Jeremic A. 2007. Discovery of the cell secretion machinery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 3 : 218—222.
- Schneider S., Sritharan K. C., Geibel J. P., Oberleithner H., Jena B. P. 1997. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 316—321.
- Siksou L., Rostaing P., Lechaire J. P., Boudier T., Ohtsuka T., Fejtova A., Kao H. T., Greengard P., Gundelfinger E. D., Triller A., Marty S. 2007. Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J. Neurosci.* 27 : 6868—6877.
- Wheatley D. N. 2007. Pores for thought: further landmarks in the elucidation of the mechanism of secretion. *Cell Biol. Int.* 31 : 1297—1300.

NEURONAL POROSOME IN THE RAT AND CAT BRAIN

V. G. Okuneva, N. J. Japaridze, N. T. Kotaria, M. G. Zhvania¹

Life Science Research Center, Tbilisi, Georgia;

¹ e-mail: mzia_zhvania@iliauni.edu.ge

It is well established that during cell secretion, membrane-bound secretory vesicles dock and fuse at the base of supramolecular cup-shaped structures at the cell plasma membrane called «porosomes», to expel intra-vesicular contents to the outside. In neurons, it has been demonstrated that 12—17 nm cup-shaped lipoprotein structure possessing a central plug are present at the presynaptic membrane, where 50 nm in diameter synaptic vesicles transiently dock and fuse to release neurotransmitter. In the past decade, the neuronal porosome has been isolated and its major chemical composition determined. Additionally, the porosome has been both structurally and functionally reconstituted into artificial lipid membrane, establishing its role as the secretory portal in neurons. Studies utilizing atomic force and electron microscopy, combined with electron density and 3D contour mapping, provide at the nanoscale, the structure and assembly of proteins within the neuronal porosome. In the current study, ultrahigh resolution imaging of the presynaptic membrane of isolated brains from both rats and cats, demonstrate for the first time, the presence of neuronal porosomes in cat brain, and further confirms the presence of porosomes at the presynaptic membrane in rat brain synaptosomes. Results from the present study further confirm the cup-shaped morphology of porosomes in the rat brain, and demonstrates their similar shape and size in the cat nerve terminal. The study also demonstrates for the first time, the universal presence of similar porosomes in different species of mammals.

Key words: neuronal porosome, electron microscopy, cat, rat.
