

## ВЛИЯНИЕ ЛЕВЕТИРАЦЕТАМА НА АГРЕГАЦИЮ И СЛИЯНИЕ МЕМБРАН СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЭКЗОЦИТОЗА

Поступила 20.07.13

Изучали влияние антиэпилептического препарата леветирацетама на процессы агрегации синаптических везикул (СВ) и их кальцийиндуцированного слияния с мембранами-мишенями в бесклеточной модели нейросекреции. Размер СВ и их агрегатов в суспензии измеряли с применением лазерно-корреляционной спектроскопии. Слияние мембранных структур количественно определяли по изменению величины самогашения флуоресценции зонда октадецил-родамин Б хлорида (R18). Воздействие леветирацетама приводило к увеличению кластеризации СВ и уменьшению уровня стимулированного кальцием слияния таких везикул как с плазматическими мембранами, так и друг с другом. Таким образом, получены новые данные о влиянии леветирацетама на регуляцию процесса экзоцитоза на этапах кластеризации СВ и их кальцийстимулированного слияния с мембранами-мишенями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бесклеточная модель, синаптические везикулы (СВ), слияние мембран, леветирацетам, экзоцитоз.

### ВВЕДЕНИЕ

Экзоцитоз синаптических везикул (СВ) включает в себя несколько последовательных этапов – загрузку везикул нейротрансммитером, их докинг в активной зоне, активацию (прайминг) и кальций-стимулированное слияние с плазматической мембраной. В реализацию этих процессов задействованы специфические интегральные мембранные белки, известные как t-SNARE (синтаксин 1А и SNAP25) и v-SNARE (синаптобrevин/VAMP2) [1], а также белки цитозоля нервных окончаний, в том числе MUNC18-1 [2].

В разработанных нами бесклеточных системах были моделированы два этапа экзоцитоза – агрегация СВ, которая проходит без слияния их мембран и имитирует *in vitro* этап докинга, и кальций-инициируемое слияние либо СВ с плазматическими мембранами синапсом (взаимодействие гетеротипных мембран), либо СВ друг с другом (взаимодействие гомотипных мембран) [3, 4]. На этих модельных системах были изучены не только особенности отдельных этапов экзоцитоза [5], но и эффекты антиэпилептических препаратов, влияющих

на нейросекрецию [6, 7].

Известно, что местом специфического связывания антиэпилептического препарата леветирацетама является белок синаптических везикул гликопротеин SV2A, функция которого связана с регуляцией процесса нейросекреции в синапсе. Для мышей, нокаутных по гену белка SV2A, характерны повышенная возбудимость ЦНС (с постепенным развитием тяжелых эпилептических припадков) и преждевременная смертность [8, 9]. Показано, что SV2A взаимодействует с цитоплазматическим доменом белка синаптоагмина и вместе с белками SNARE-комплекса регулирует процесс экзоцитоза [9]. Известно, что леветирацетам связывается с протеином SV2A и модулирует его активность. В целом же механизм действия леветирацетама пока остается мало исследованным.

Мы изучали влияние леветирацетама на процессы агрегации СВ и их кальцийиндуцированного слияния с мембранами-мишенями в бесклеточной модели нейросекреции.

### МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: флуоресцентный зонд R18 (октадецил-родамин Б хлорид; «Molecular Probes», США),

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев (Украина).  
Эл. почта: vitakli@mail.ru (В. П. Гуменюк);  
trikash@biochem.kiev.ua (И. О. Трикаш).

сефадекс G75 («Pharmacia», Швеция),  $C_{12}E_8$  (додециловый эфир октаэтиленгликоля; «Calbiochem-Behring», США), ЭГТА (этиленгликоль-бис- $\beta$ -аминоэтиловый эфир N,N'-тетрауксусной кислоты), сахараза («Reaxim», Украина), фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипин („Мінмедпром”, Украина), стекловолоконные фильтры Whatman GF/C («Whatman», Великобритания), леветирацетам и АТФ – аденозин-5'-трифосфат («Sigma», США).

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар с массой тела 200–250 г, которых содержали в обычных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Для получения образцов головного мозга крыс подвергали эвтаназии с учетом общепринятых международных нормативов гуманного отношения к животным.

СВ, плазматические мембраны и фракцию белков цитозоля выделяли из синапсом головного мозга по методу де Лоренцо в модификации Колчинской и соавт. [4].

Размер СВ и их агрегатов в суспензии измеряли с помощью лазерно-корреляционной спектроскопии с использованием системы Malvern Zetasizer-3 (Великобритания). Для определения размера частиц в среде применяли программное обеспечение S 4700, PCS V.1.61, Rev.1 («Malvern Instruments LTD 2002», Великобритания). Данные анализировали с помощью алгоритма CONTIN, что позволяло рассчитать средний размер частиц и индекс полидисперсности.

50 мкл суспензии СВ (50 мкг белка) помещали в кювету с 950 мкл буферного раствора (1 мМ ЭГТА и 10 мМ Трис-НСI; pH 8.1) или цитозольной фракции синапсом (1 мг/мл белка, 1 мМ ЭГТА и 10 мМ Трис-НСI; pH 8.1).

Степень слияния мембранных структур количественно определяли по изменению величины самогашения флуоресценции зонда R18 при длине волны возбуждения 560 нм и эмиссии 580 нм, используя флуоресцентный спектрофотометр «Hitachi 650 10S» (Япония) [10].

К 1.0 мл цитозольной фракции синапсом (1 мг белка/мл) в среде, содержащей в себе 1 мМ ЭГТА и 10 мМ Трис-НСI (pH 7.5), добавляли 3–10 мкл суспензии СВ, меченных зондом R18 (0.8 мг белка/мл), и 20–60 мкл суспензии СВ, не подвергнутых мечению (2 мг белка/мл), или же 10 мкл суспензии плазматических мембран синапсом (3 мг белка/мл). Слияние мембранных структур инициировали путем добавления  $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$ . Концентрацию свободного кальция в среде вычис-

ляли с учетом присутствия ЭГТА в растворе. Полученные результаты представлены ниже в виде типичных кривых [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

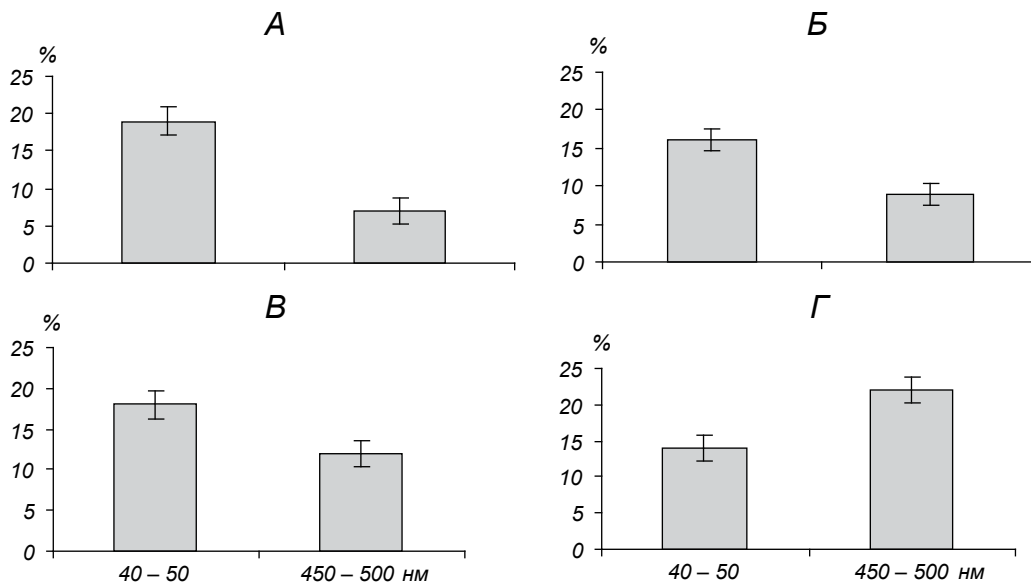
Как уже упоминалось, размер частиц в полученной фракции СВ исследовали с применением метода лазерно-корреляционной спектроскопии. На рис. 1, А показано распределение СВ по размеру в среде, содержащей в себе буферный раствор. Следует отметить, что выделенная нами фракция СВ не пропустилась через фильтр Whatman GF/C. Как видно, диаметр частиц варьировал от 30 до 55 нм, что соответствует размеру единичных СВ. Крупные частицы (450–500 нм), очевидно, являлись результатом взаимодействия СВ в интактных синапсом перед их лизированием. Добавление леветирацетама к суспензии СВ в буферной среде не изменяло распределения размеров частиц (Б).

Как видно из рис. 1, В, при добавлении суспензии СВ в среду, содержащую в себе белки цитозольной фракции синапсом, относительное количество крупных частиц со средним диаметром около 450–500 нм увеличивалось до 12 %. С добавлением в такую систему 2 мг/мл леветирацетама размер частиц диаметром около 500 нм не изменялся, но их количество увеличивалось от 12 до 22 % (Г). Полученные результаты указывают на то, что леветирацетам стимулирует кластеризацию СВ только в среде цитозольной фракции синапсом.

На модели слияния гетеротипных мембран было показано, что под воздействием 2 мг/мл леветирацетама степень кальцийиницируемого слияния СВ с плазматическими мембранами синапсом уменьшалась. Как видно из рис. 2, после добавления в среду  $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$  степень слияния мембран в контроле на 4-й мин составляла 28 % (1), а с добавлением в среду инкубации 2 мг/мл леветирацетама этот уровень снижался до 23 % (2).

В ходе исследования влияния преинкубации СВ с леветирацетамом (10 мин при 22 °С) было обнаружено еще более значительное ингибирование процесса инициированного кальцием слияния мембран (рис. 2, 3). Следует отметить, что в системе без кальция слияния мембранных компонентов в условиях модели не происходило и добавление леветирацетама не изменяло величины сигнала флуоресценции (данные не иллюстрированы).

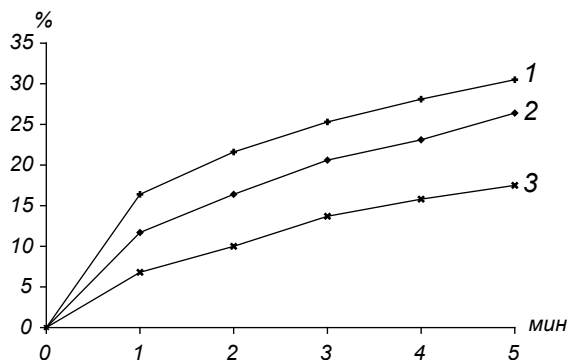
Эффекты, вызываемые леветирацетамом, иссле-



**Р и с. 1.** Распределение размеров частиц в суспензии синаптических везикул.

*A* – в буферном растворе (1 мМ ЭГТА; 10 мМ Трис-НСl; рН 8.1); *B* – в буферном растворе, содержащем в себе 2 мг/мл леветирацетама; *V* – в растворе с добавлением цитозольной фракции синапсом (1 мг белка) и 2 мг/мл леветирацетама. Показаны нормированные количества частиц различных размеров согласно результатам анализа по алгоритму CONTIN («Malvern Instruments», Великобритания), что позволяет рассчитать средний размер и полидисперсность. Для межгруппового сравнения использовали *t*-тест Стьюдента ( $P < 0.05$ ).

**Р и с. 1.** Розподіл розмірів частинок у суспензії синаптичних везикул.

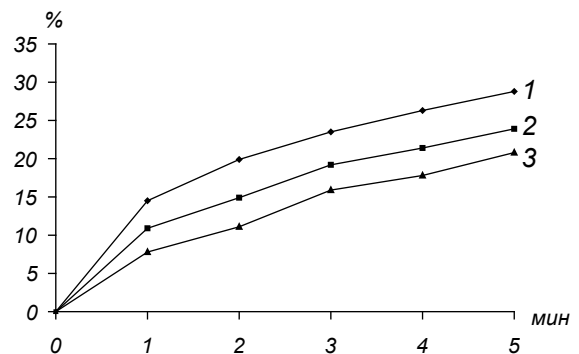


**Р и с. 2.** Уменьшение уровня инициированного кальцием слияния синаптических везикул (СВ) с плазматическими мембранами синапсом под действием леветирацетама.

Уровень стимулированного  $10^{-5}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  слияния СВ (4 мкг белка в пробе) с плазматическими мембранами синапсом (50 мкг белка) в среде, которая содержала в себе 1 мг белков цитозольной фракции синапсом. *1* – контроль, *2* – при добавлении 2 мг/мл леветирацетама, *3* – после преинкубации суспензии СВ с 2 мг/мл леветирацетама в течение 10 мин.

**Р и с. 2.** Зменшення рівня ініційованого кальцієм злиття синаптичних везикул із плазматичними мембранами синапсом під дією леветирацетама.

довали и на модели кальцийстимулированного слияния гомотипных мембран, т. е. слияния СВ друг с другом. На рис. 3 показано, что при добавлении



**Р и с. 3.** Влияние леветирацетама на процесс кальцийстимулированного слияния синаптических везикул (СВ) друг с другом. Уровень стимулированного  $10^{-5}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  слияния меченных зондом R18 СВ (4 мкг белка в пробе) с немечеными СВ (30 мкг белка) в среде, которая содержала в себе 1 мг белков цитозольной фракции синапсом. *1* – контроль, *2* – при добавлении 2 мг/мл леветирацетама, *3* – после преинкубации суспензии СВ с 2 мг/мл леветирацетама в течение 10 мин.

**Р и с. 3.** Вплив леветирацетама на процес кальційстимульованого злиття синаптичних везикул одна з одною.

кальция в суспензию СВ в среде, содержащей в себе белки цитозольной фракции синапсом, степень слияния мембран на 4-й мин составляла 26 % (*1*), а в присутствии 2 мг/мл леветирацетама в том

же временном интервале была заметно меньше – 21 % (2). После преинкубации СВ с леветирацетамом в течение 10 мин степень слияния мембран на 4-й мин составляла 18 % (3). Таким образом, преинкубация СВ с леветирацетамом в моделях стимулированного кальцием слияния и гетеротипных, и гомотипных мембран выявляла заметный ингибирующий эффект препарата.

Следует отметить, что процесс агрегации везикул в наших условиях базируется на тесном контакте мембран, не сопровождаемом слиянием бислоев и рассматриваемом как модель отдельного этапа экзоцитоза – докинга [5]. Было показано наличие корреляции между антиэпилептическими свойствами леветирацетама и его аффинностью к белку SV2A [11]. Из рис. 1 видно, что леветирацетам повышает агрегацию СВ в бесклеточной системе. Поэтому можно полагать, что белок SV2A задействован на этапе докинга СВ; возможно, указанный белок является негативным регулятором процесса агрегации СВ в нервных окончаниях.

Согласно данным Баялех и соавт., белок SV2A модулирует размер легковывсвобождаемого пула СВ на этапе их прайминга; последний следует за процессом докинга и характеризуется состоянием готовности СВ к кальцийстимулированному слиянию [11]. Сюдхоф и соавт. показали, что белок SV2A действует в пределах ранее не идентифицированного этапа экзоцитоза, связывающего прайминг СВ с кальцийиндуцируемым слиянием; предполагалось, что белок SV2A повышает чувствительность к кальцию везикул, уже готовых к слиянию [12]. Действие белка SV2A было обнаружено на разных этапах экзоцитоза – докинга (наши данные), прайминга [9] и в интервале после прайминга [12]. Несмотря на то что мнения авторов совпадают не в полной мере, общей является точка зрения, согласно которой регуляция экзоцитоза белком SV2A происходит ранее этапа стимулированного слияния мембран.

Как видно из рис. 1, *B* и *Г*, реализация влияния леветирацетама на формирование кластеров СВ в существенной степени зависит от белков цитозольной фракции синаптосом. Известно, что тримерный белковый комплекс цитозоля, состоящий из протеинов Munc13, Rab3 и RIM, способствует взаимодействию СВ с пресинаптическими мембранами и вместе с синтаксином 1 формирует «докинг-машину» [13]. Механизм кластеризации СВ под влиянием леветирацетама пока остается неясным, поскольку непосредственно анализировать взаимодействие

белка SV2A с факторами докинга в цитозоле синаптосом не представляется возможным.

Известно, что в условиях связывания белка SV2A с белком СВ синаптотагмином слияния мембран не происходит. При стимуляции кальцием последний связывается с синаптотагмином, связь между упомянутыми белками нарушается, и формируется комплекс белков SNARE, который опосредует слияние липидных бислоев мембран [14].

Отсутствие SV2A-белка в возбуждающих и тормозных нейронах, а также в культуре хромаффинных клеток обуславливает снижение интенсивности стимулированной нейросекреции [15]. И наоборот, избыточная экспрессия белка SV2A вызывает нарушения в передаче нервных импульсов; этот процесс восстанавливается после обработки леветирацетамом [14]. Согласно кривым 1 на рис. 2 и 3, уровень кальцийзависимого слияния мембран в отсутствие леветирацетама в среде характеризуется наибольшим значением; соответственно, можно предположить, что в данном случае белок SV2A выступает в качестве положительного модулятора изучаемого этапа экзоцитоза. В присутствии леветирацетама интенсивность кальцийиницированного слияния СВ как с плазматическими мембранами, так и друг с другом уменьшается (рис. 2, 2; 3, 2). Время инкубации СВ с леветирацетамом оказывает влияние на этот процесс; при увеличении экспозиции степень ингибирования слияния мембран возрастает (рис. 2, 3; 3, 3).

Этосуксимид и вальпроат натрия, как и большинство других антиэпилептических препаратов, воздействуют на функционирование кальциевых и натриевых каналов, а также ГАМК-эргической системы. Ранее мы показали, что этосуксимид и вальпроат натрия усиливают процесс кальцийстимулированного слияния мембран [6, 7]. Ингибирующий эффект леветирацетама, обнаруженный в такой же бесклеточной модели слияния мембран, скорее всего, обусловлен уникальным свойством данного агента взаимодействовать с интегральным белком синаптических везикул SV2A.

Таким образом, при использовании леветирацетама в качестве инструмента для изучения функции белка SV2A были получены новые данные относительно возможного участия этого белка в регуляции процесса экзоцитоза на этапах кластеризации СВ и их кальцийстимулированного слияния с мембранами-мишенями.

Исследования проводили в соответствии с положениями Международной конвенции по защите животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также с положениями Комитета по биоэтике Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины.

Авторы данной работы – В. П. Гуменюк и И. О. Трикаш – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов

В. П. Гуменюк<sup>1</sup>, И. О. Трикаш<sup>1</sup>

#### ВПЛИВ ЛЕВЕТИРАЦЕТАМУ НА АГРЕГАЦІЮ ТА ЗЛИТТЯ МЕМБРАН СИНАПТИЧНИХ ВЕЗИКУЛ У БЕЗКЛІТИННІЙ МОДЕЛІ ЕКЗОЦИТОЗУ

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Вивчали вплив антиепілептичного препарату леветирацетаму на процеси агрегації синаптичних везикул (СВ) та їх кальційіндукованого злиття з мембранами-мішенями в безклітинній моделі нейросекреції. Розмір СВ та їх агрегатів у суспензії вимірювали за допомогою лазерно-кореляційної спектроскопії. Злиття мембранних структур кількісно визначали за зміною величини самогасіння флуоресценції зонда октадецил родамін В хлориду (R18). Дія леветирацетаму призводила до збільшення кластеризації СВ і зменшення рівня стимульованого кальцієм як злиття таких везикул із плазматичними мембранами, так і їх взаємного злиття. Таким чином, отримані нові дані про вплив леветирацетаму на регуляцію процесу екзоцитозу на етапах кластеризації СВ та їх кальційстимульованого злиття з мембранами-мішенями.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. Sollner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, et al., “SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion,” *Nature*, **362**, No. 6418, 318-324 (1993).
2. I. Dulubova, M. Khvotchev, S. Liu, et al., “Munc18-1 binds

directly to the neuronal SNARE complex,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2697-2702 (2007).

3. I. O. Triakash, V. P. Gumenyuk, V. I. Chernishov, “Злиття ізольованих синаптичних везикул як модель останнього етапу регульованого екзоцитозу”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **36**, № 4, 272-281 (2004).
4. I. O. Triakash and L. I. Kolchinskaya, “Fusion of synaptic vesicles and plasma membrane in the presence of synaptosomal soluble proteins,” *Neurochem. Int.*, **49**, No. 3, 270-275 (2006).
5. I. O. Triakash, G. P. Volynets, O. V. Remenyak, et al., “Docking and fusion of synaptic vesicles in cell-free model system of exocytosis,” *Neurochem. Int.*, **53**, Nos. 6/8, 401-407 (2008).
6. В. П. Гуменюк, Г. П. Волинець, Т. М. Кучмеровська та ін., “Вплив антиепілептичних препаратів на процес гомотипного злиття синаптичних везикул”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **41**, № 6, 467-475 (2009).
7. I. O. Triakash, V. P. Gumenyuk, L. O. Gromov et al., “Модульовальний ефект протисудомних препаратів на Ca<sup>2+</sup>-залежне злиття мембран”, *Укр. біохім. журн.*, **75**, № 6, 81-86 (2003).
8. T. De Smedt, R. Raedt, K. Vonck, et al., “Levetiracetam: the profile of a novel anticonvulsant drug-part I: preclinical data,” *CNS Drug Rev.*, **13**, No. 1, 43-56 (2007).
9. A. Nowack, J. Yao, K. L. Custer, et al., “SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **299**, No. 5, 960-967 (2010).
10. I. Triakash, V. Gumenyuk, and V. Lishko, “The fusion of synaptic vesicle membranes studied by lipid mixing: the R18 fluorescence assay validity,” *Chem. Phys. Lipids*, **163**, No. 8, 778-786 (2010).
11. B. A. Lynch, N. Lambeng, K. Nocka, et al., “The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the anti-epileptic drug levetiracetam,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, No. 26, 9861-9866 (2004).
12. W. P. Chang and T. C. Südhof, “SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis,” *J. Neurosci.*, **29**, No. 4, 883-897 (2009).
13. H. De Wit, L. N. Cornelisse, R. F. Toonen, et al., “Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent,” *PLoS one*, **1**, e126 (2006).
14. A. Nowack, E. B. Malarkey, J. Yao, et al., “Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A,” *PLoS one*, **6**, No. 12, e29560 (2011).
15. R. M. Kaminski, M. Gillard, and K. Leclercq, “Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam,” *Epilepsia*, **50**, No. 7, 1729-1740 (2009).