

О. М. ПОЧИНЮК^{1,2}, О. Л. ЗАЙКА^{1,2}, О. В. САДОВИЙ¹,
О. М. ЯВОРСЬКА¹, О. О. ЛУК'ЯНЕЦЬ^{1,2}

УЧАСТЬ СИНАПТИЧНОГО БІЛКА Munc18 У ПРОЦЕСІ ВИВІЛЬНЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ ХРОМАФІННИМИ КЛІТИНАМИ НАДНИРКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРА

Надійшла 24.04.10

Вивчали роль одного із синаптичних білків родини SM-білків – Munc18 – у процесі екзоцитозу. Для цього використовували мікроін'єкції антитіл до протеїну Munc18 (анти-Munc18) в ізольовані хромафінні клітини надниркової залози щура з метою пригнітити функцію цього протеїну. Секреція катехоламінів вимірювалася за амперометричним методом з використанням карбонового мікроелектроду. Виключення функції Munc18 у досліджуваних клітинах призводило до значного пригнічення процесу секреції. При цьому знижувалася частота секреторних подій та змінювалися кінетичні параметри секреторних піків – зменшувалась їх амплітуда та збільшувалася тривалість спаду. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що Munc18 є одним із синаптичних протеїнів, необхідних для забезпечення кальційзалежного екзоцитозу у хромафінних клітинах, і що він може специфічно впливати на розміри фузійних пор.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хромафінні клітини, кальцій, Munc18, синаптичні білки, екзоцитоз, секреція, катехоламіни.

ВСТУП

Процес вивільнення нейротрансмітерів, або екзоцитоз цих сполук, що відбувається під час синаптичної передачі, базується на досить складному механізмі, в який залучені багаточисельні синаптичні протеїни [1–3]. Сигналом, який запускає екзоцитоз, є збільшення концентрації вільного кальцію в цитозолі ($[Ca^{2+}]_i$) [4–8], а головною та універсальною ланкою, що забезпечує злиття везикули із плазматичною мембраною, є білковий конгломерат, так званий SNARE-комплекс (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) [9–11]. SNARE-комплекс – це спеціалізовані протеїни, які в певній своїй конформації стимулюють злиття внутрішньоклітинних секреторних везикул з плазматичною мембраною клітини. На даний час ідентифіковано близько 60 білків SNARE. Білки зазначеного комплексу діляться на дві функціональні категорії. Це везикулярні

білки (v-SNARE) та білки плазматичної мембрани (t-SNARE). Відомо, що до білків v-SNARE відносяться гомологи синаптобrevіну, а до t-SNARE – синтаксин-1 та SNAP-25. Згідно з новою структурною класифікацією, вони ще називаються R-SNARE і Q-SNARE [12]. Створення SNARE-комплексу в його транс-формі забезпечує змикання протилежних ліпідних бішарів мембран – плазматичної мембрани клітини та мембран секреторних везикул. У результаті цього відбуваються злиття мембран, а також формування фузійних пор, через які нейротрансмітер виходить назовні (зокрема, в синаптичну щілину). Збільшення концентрації іонів кальцію в клітині зумовлює завершення реакції збирання згаданих білків у комплекс (за посередництвом кальційзалежного протеїну синаптотагміну). Згідно з однією із гіпотез, SNARE-комплекс формується послідовно, починаючи із дистального щодо мембрани регіону; механізм такого формування називають механізмом застібки “змійка” (zippering) [13].

Крім основних секреторних протеїнів, що формують SNARE-комплекс, у процес екзоцитозу та транспортування секреторних везикул також залучена велика кількість допоміжних та регуляторних

¹ Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

білків, роль яких вивчена недостатньо. Серед таких протеїнів відомі білки Munc18, які ще називають Sec1/Munc18-білками (SM-білками). У тому ж році, коли була запропонована гіпотеза про SNARE-комплекс, із везикулярного фузійного комплексу ссавців був виділений новий синтаксинзв'язуючий протеїн, кДНК якого була гомологічною ДНК білка unc18 гена нематої *Caenorabditis elegans* [14]; тому цей протеїн був названий Munc18 (mammalian unc18). Сама аббревіатура unc пішла від терміну “некоординовані” (uncoordinated); відповідні мутації у нематод пов'язані із важкими порушеннями координації рухів цих тварин [14]. У 1980 р. у дріжджах був знайдений гомолог Unc-18 – протеїн Sec1; тому виникла альтернативна номенклатура білків Munc18 – n-Sec1, або rbSec1 (“neuronal” та “rat brain” Sec1 відповідно) [15]. Пізніше був виявлений гомолог Munc18 у дрозофіли, який назвали ROP [16], а всю родину цих білків назвали Sec1/Munc18, або SM-білки.

Протеїн Munc18 був ідентифікований за його здатністю зв'язуватись із синтаксином-1 [17, 18] (рис. 1). Було встановлено, що Munc18 конкурує із SNAP-25 і синаптобrevіном/VAMP за зв'язування із синтаксином, і було запропоновано гіпотезу про роль Munc18 в екзоцитозі синаптичних везикул [15, 17, 18]. Як було показано, в умовах нульової мутації (null mutation) щодо SM-білків, коли білковий продукт гена є цілком відсутнім, процес злиття мембран при екзоцитозі блокувався [19]. Цей факт є свідченням важливості функції SM-білків, у тому числі Munc18, як найважливіших факторів, задіяних у процес мембранного злиття.

Метою нашої роботи було виявлення участі синаптичного протеїну Munc18 у процесі вивільнення катехоламінів із хромафінних клітин надниркових залоз – об'єкта, котрий можна розглядати як модельний щодо процесу нейросекреції. Секрецію стимулювали за допомогою деполаризації плазматичної мембрани досліджуваних клітин або активації ацетилхолінових рецепторів цієї мембрани.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на свіжоізольованих хромафінних клітинах надниркових залоз статевозрілих щурів; основні моменти методики були описані раніше [8, 20–26]. Коротко, в експериментах використовувалися дорослі (п'ять-шість місяців) самиці білих щурів лінії Вістар масою

180–230 г. Для отримання ізольованих клітин медулярної речовини надниркової залози використовували стандартну процедуру ферментативної ізоляції. Щура анестезували за допомогою ефіру, швидко декапітували, і виділяли надниркові залози. Видалені надниркові залози промивали в розчині DPBS (фосфатний буфер Дульбекко). Потім через вену їх промивали стандартним розчином DPBS, що вміщував колагеназу типу IA (“Sigma-Aldrich”, США) у концентрації 0.5 мг/мл. Під біокуляром ізолювали медулярну частину надниркової залози, яку розділяли на тонкі шари (300–500 мкм завтовшки). Отримані зрізи інкубували протягом 50–60 хв при 37 °C у розчині DPBS, що вміщував колагеназу в концентрації 0.3 мг/мл. Окремі хромафінні клітини отримували за допомогою повільного пропускання обробленої тканини через піпетки різного діаметра протягом принаймні 15 хв. Отриману суспензію клітин переносили на покривне скло, розташоване в робочій камері. В останню після прикріплення клітин до поверхні покривного скла подавався зовнішньоклітинний розчин. Усі експерименти проводились у відповідності з вимогами НАН України щодо використання експериментальних тварин.

Для реєстрації вивільнення катехоламінів використовували електрохімічний метод реєстрації процесу секреції. Цей метод оснований на окисненні/відновленні специфічних хімічних сполук, які реагують з поверхнею електроду, викликаючи електричний струм. У наших експериментах ми використовували електроди з карбоновим (вуглецевим) волокном діаметром 10 мкм та довжиною 6–8 см, розташованим всередині поліетиленової трубки. Для реєстрації квантового процесу вивільнення використовували наступні розчини (у мілімолях на 1 л): NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.3) – контрольний розчин, NaCl – 85, KCl – 50, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.3) – деполаризуючий розчин. Чашку Петрі з клітинами розташовували в полі зору інвертованого мікроскопа з короткофокусним об'єктивом (×40). Електрод з карбоновим волокном за допомогою мікроманіпулятора підводили щонайближче до досліджуваної клітини. Для реєстрації індукованих електричних струмів (I_e) використовували підсилювач ЕРС-9 (“НЕКА”, ФРН). Реєстрацію окремих секреторних піків проводили в конфігурації “амперометрія”, коли на електрод подавався постійний потенціал +600 мВ. Визначення характеристик карбонових електродів прово-

дили в присутності в робочій камері катехоламінів (“Sigma-Aldrich”, США) у концентрації 1 мМ. Вихідний сигнал підсилювача фільтрували при частоті зрізу 3 кГц за допомогою триполюсного фільтра Бесселя та цифрового фільтра (10 кГц).

Ін’єкцію антитіл у хромафінні клітини проводили під тиском із застосуванням системи мікроін’єкції Picospritzer III (“Parker Instruments”, США) та мікроманіпулятора з мікропіпеткою, що вмещувала суміш антитіл та флуоресцентного декстрану, кон’югованого із FITC (флуоросцеїном ізотіоціанатом) (“Sigma-Aldrich”, США). Кінчик мікропіпетки уводився всередину клітини під візуальним контролем. Флуоресценцію вимірювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Olympus IX70 (“Olympus”, Японія) при збудженні з довжиною хвилі 395 нм (F_{395}), використовуючи монохроматор Polychrome IV (“TILL Photonics”, ФРН).

Керування процесами вимірювання, а також записом даних здійснювалося за допомогою комп’ютерних програм “Pulse” та “xChart” (“НЕКА”, ФРН). Для зміни зовнішньоклітинних розчинів навколо обраної клітини було застосовано систему локальної аплікації. Швидкість зміни розчину складала 0.3 мл/хв. Поліклональні антитіла анти-Munc18 кроля (“Synaptic Systems GmbH”, ФРН) використовували в розведенні 1:100.

Експериментальні дані аналізували із застосуванням програми “Microcal™Origin™”, версія 5.0 (“Microcal Software Inc.”, США). Числові значення наведені у вигляді середніх значень \pm похибка середнього (s.e.m.). Вірогідність міжгрупових різниць визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), вважаючи пороговим значення $P < 0.05$. Досліди проводили при кімнатній температурі (23–25 °C).

РЕЗУЛЬТАТИ

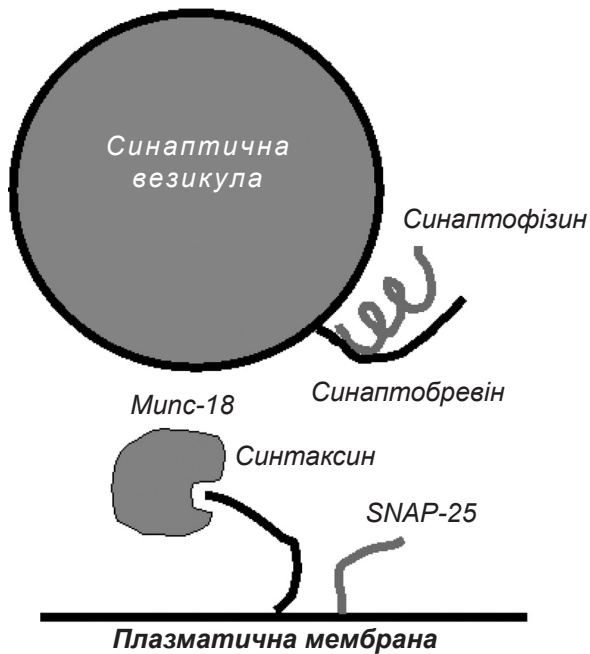
Секреція катехоламінів із хромафінних клітин є кальційзалежним процесом і тому може бути викликана впливами, що призводять до підвищення концентрації внутрішньоклітинного іонізованого кальцію ($[Ca^{2+}]_i$). Серед можливих шляхів збільшення $[Ca^{2+}]_i$ у хромафінних клітинах використовують активацію потенціалзалежних кальцієвих каналів або активацію ацетилхолінових рецепторів мембрани. В останньому випадку відбувається зростання рівня $[Ca^{2+}]_i$ за рахунок надходження іонів Ca^{2+} через канали іонотропних нікотинових рецепторів та/

або вивільнення цих іонів із внутрішньоклітинних кальцієвих депо після активації метаболічних мускаринових рецепторів [8, 27].

У перебігу досліджень ми перш за все вимірювали секрецію катехоламінів, викликану деполяризацією мембрани під дією розчину, що вмещував 50 мМ KCl. Як можна бачити з рис. 2, *Б*, аплікація деполяризуючого розчину тривалістю 2.5 с викликала значну кількість секреторних подій. Останні мали вигляд секреторних піків електродного струму (I_e), відведеного вимірювальним карбоновим електродом.

Як ми згадували раніше [28], у хромафінних клітинах процес екзоцитозу є двофазним. “Швидка” фаза триває близько 5 с після початку стимуляції, а “повільна” – приблизно 10 с. Ці фази відрізняються за інтенсивністю секреції. Для визначення ролі синаптического білка Munc18 у процесі секреції ми використовували специфічні антитіла щодо Munc18 у розведенні 1:100. З цією метою ми за допомогою мікропіпетки, введеної внутрішньоклітинно, та мікрошприца із системою електронного контролю ін’єкували в досліджувані клітини антитіла щодо Munc18 разом із флуоресцентним комплексом (декстран-FITC), який мав подібну до антитіл молекулярну масу. Використання комплексу декстран-FITC дозволяло контролювати потрапляння антитіл всередину клітини за допомогою флуоресцентного мікроскопа; результат мікроін’єкції виглядав як збільшення інтенсивності флуоресцентного сигналу (F_{395}) (рис. 1, *А*). Щоб виключити можливий внесок самої процедури ін’єкції як такої в прояви секреторних відповідей хромафінних клітин, ми також робили контрольні ізольовані ін’єкції декстрану-FITC (без додавання антитіл). При цьому статистично значущих секреторних відповідей клітини не спостерігалось.

Як показали результати наших експериментів, ін’єкція анти-Munc18 у ту ж саму клітину, що перевірялася в контрольних умовах, істотно зменшувала частоту секреторних подій, викликаних деполяризацією клітини під дією 50 мМ KCl. Було виявлено дві групи хромафінних клітин, які демонстрували порівняно більшу та меншу чутливість до анти-Munc18. У цій роботі ми не будемо детально зупинятися на таких відмінностях; числові дані є усередненими для всієї вивченої популяції клітин. Частота зареєстрованих секреторних подій після ін’єкції антитіл зменшувалась у середньому на 40.2 ± 7.6 % ($n = 13$) порівняно з контролем (рис. 1, *В*).

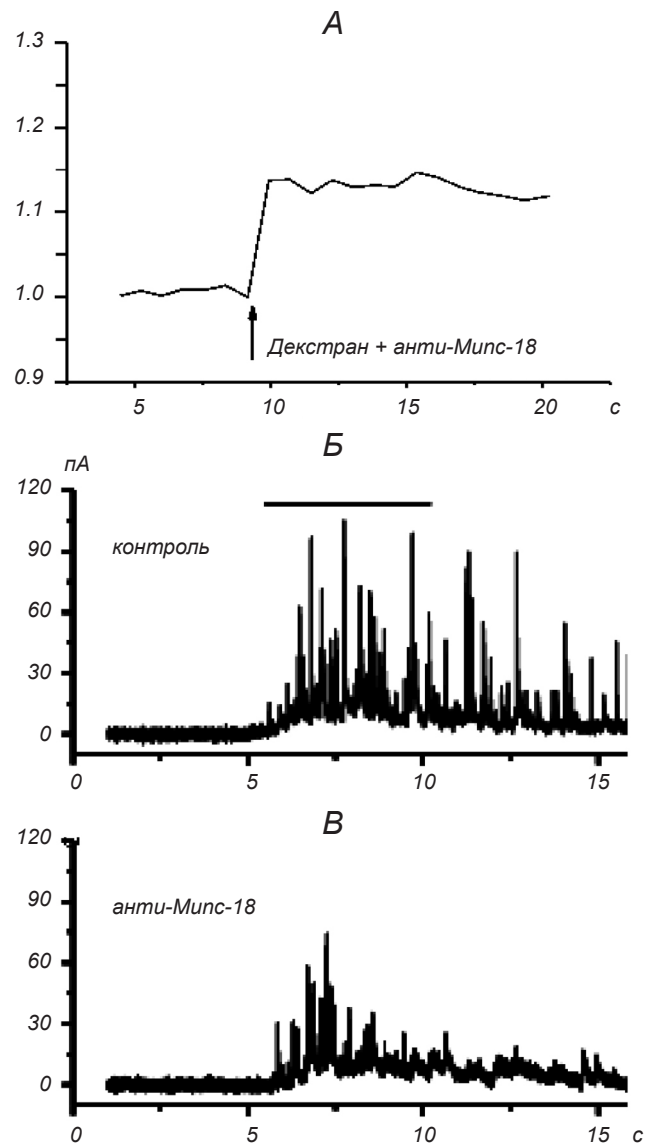


Р и с. 1. Схематичне зображення розташування молекул основних синаптичних білків, які беруть участь у процесах злиття мембран та екзоцитозу.

У наступних експериментах ми використовували стимулювання секреції за допомогою агоніста ацетилхолінових рецепторів ацетилхоліну (АХ), який додавали в зовнішньоклітинний розчин у концентрації 1 мМ. У таких експериментах ми також спостерігали появу секреторних піків після аплікації згаданого агоніста (рис. 3, А). Необхідно відмітити, що двофазний характер секреції катехоламінів спостерігався і у випадку стимуляції такої секреції під дією 1 мМ АХ. На відміну від секреторних піків, індукованих КСІ, в останніх умовах амплітуда секреторних відповідей була в півтора-два рази більшою.

Після індукування секреції за допомогою аплікації 1 мМ АХ уведення анти-Munc18 у ту ж саму клітину, яка досліджувалась у контрольних умовах, значно пригнічувало секреторну активність (рис. 3, Б). Частота секреторних подій зменшувалась порівняно з результатами контрольних вимірювань у середньому на $46.7 \pm 10.2\%$ ($n = 15$).

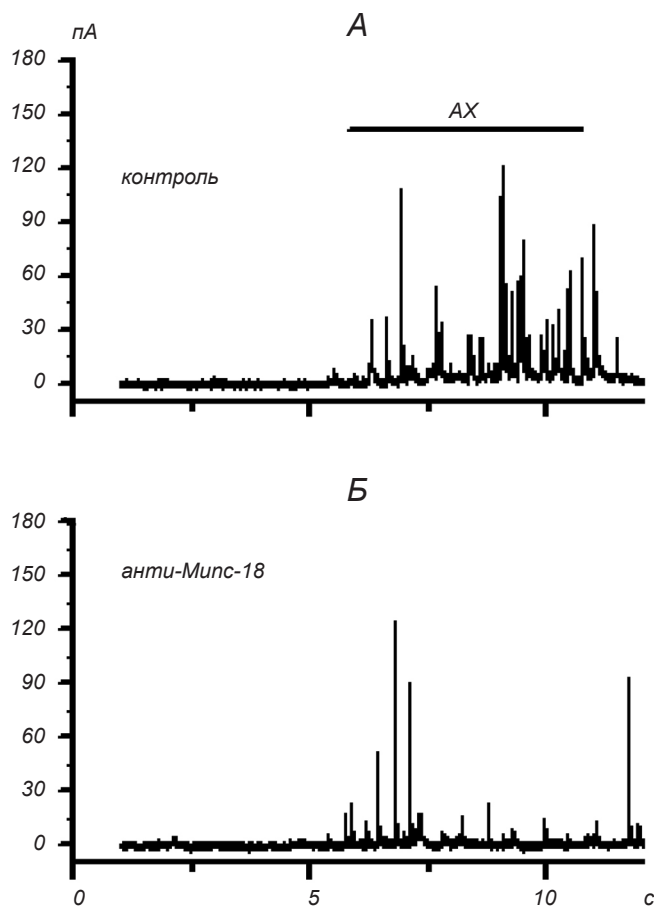
Для оцінки можливих змін кінетичних параметрів секреторних піків при виключенні функції синаптичного білка Munc18 ми аналізували наступні параметри: амплітуду таких піків, час їх наростання й спаду, тривалість до точки падіння амплітуди до



Р и с. 2. Реєстрація процесу вивільнення катехоламінів з окремої ізольованої хромафінної клітини щура.

А – верифікація потрапляння антитілу щодо Munc18 у клітину з використанням флуоресцентного комплексу дextrан-FITC, змішаного з розчином вказаних антитіл; стрілкою показано момент внутрішньоклітинної мікроін'єкції. По осі абсцис – час, с; по осі ординат – інтенсивність флуоресценції при довжині хвилі збудження 385 нм, ум. од. Б, В – секреторні відповіді, зареєстровані при аплікації розчину, що міщував 50 мМ КСІ, в умовах контролю (Б) та після ін'єкції в цю ж саму клітину антитілу Munc18 – анти-Munc18 (В). По осі абсцис – час, с; по осі ординат – струм, що відводився за допомогою карбонового мікроелектроду, пА. Час аплікації КСІ був однаковим для обох випадків (показано прямою лінією над записом В).

5 % щодо максимального значення (T_{95}), тривалість до 50 %-вого падіння амплітуди (T_{50}) та площу піків (рис. 3).



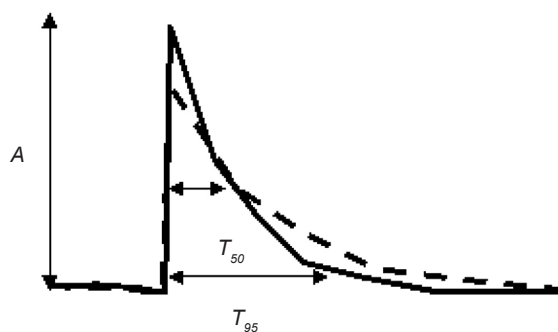
Р и с. 3. Реєстрація процесу вивільнення катехоламінів з окремої ізольованої хромафінної клітини при аплікації розчину, що вміщував 1 мМ ацетилхоліну (АХ) у контролі (А) та після ін'єкції в клітину антитіл щодо Munc18 – анти-Munc18 (Б). Час аплікації вказаний прямою лінією на А. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 2.

Аналіз отриманих даних показав, що в умовах стимуляції секреції із застосуванням обох згаданих прийомів гістограми розподілу часових та амплітудних параметрів квантових подій

Викликані внутрішньоклітинним уведенням анти-Munc18 нормовані зміни (%) середніх значень параметрів секреторного піку при двох методиках стимуляції секреції (за допомогою деполяризації мембрани під впливом розчину, що вміщував 50 мМ КСl, та під дією 1 мМ ацетилхоліну)

Параметри секреторного піку	Агент, що ініціює секрецію	
	КСl	ацетилхолін
Амплітуда	↓ 17.5 ± 6.1**	↓ 13.6 ± 6.3*
T ₅₀	↑ 17.9 ± 4.7**	↑ 6.2 ± 6.4
T ₉₅	↑ 23.1 ± 6.1**	↑ 12.59 ± 4.8*
Площа	↑ 0.39 ± 4.4	↓ 1.9 ± 8.3
Час наростання	↑ 4.7 ± 8.7	↑ 13.6 ± 8.8
Час спаду	↑ 21.5 ± 7.6**	↑ 10.8 ± 7.3

Примітки. За 100 % прийняті контрольні значення. Стрілками вгору показано збільшення, вниз – зменшення параметра. Кількість вимірювань для всіх випадків n складала 50. *P < 0.05, **P < 0.01 щодо контролю.



Р и с. 4. Схематичне зображення усередненого секреторного піку та параметрів, що вимірювалися.

Суцільною лінією показано секреторний пік, отриманий у контрольних умовах, пунктирною – пік після ін'єкції анти-Munc18. А – амплітуда піку, T₅₀ та T₉₅ – час до моментів, коли амплітуда під час спаду піку зменшувалася до 50 та 95 % максимального значення відповідно.

вивільнення відповідали нормальному закону або були близькими до нього. Положення мод гістограм нормальних розподілів після пригнічення функції Munc18 статистично вірогідно відрізнялися від відповідних значень, котрі спостерігалися в контрольних умовах (за виключенням часу наростання піку та його площі) (див. таблицю). Впливи анти-Munc18 на кінетичні характеристики секреторних піків в умовах ініціації останніх під впливом КСl та АХ були подібними, але у випадку АХ ефект антитіл був менш вираженим. На рис. 4 представлений усереднений секреторний пік, отриманий в контрольних умовах (позначено суцільною лінією), та пік після внутрішньоклітинної ін'єкції анти-Munc18 (позначено пунктирною лінією). Як можна бачити, після блокування функції синаптичного білка Munc18 антитілами зменшується амплітуда секреторного піку та значно уповільнюється його спад (див. таблицю). Останній факт вказує на те, що Munc18 істотно впливає на частоту появи секреторних подій та на їх кінетичні параметри.

ОБГОВОРЕННЯ

Регульований екзоцитоз складається із декількох стадій; він починається з доставки секреторної везикули або гранули до плазматичної мембрани, де відбувається її “причалювання”; далі відбуваються “заправка” та очікування сигналу, що ініціює злиття мембран – везикулярної та клітинної [29]. Центральним компонентом цього процесу є наступне формування фузійної пори, через яку вміст везикули виливається назовні клітини. Незважаючи на те, що протягом останніх років іде інтенсивне дослідження синаптичних білків SNARE-комплексу, родини SM-білків та самого процесу екзоцитозу [30–34], відомості про властивості фузійної пори та взагалі про її природу (ліпідну чи протеїнову) залишаються дуже обмеженими. Мало відомо, що регулює потоки через пору, якою є її геометрія, відбувається повне або часткове вивільнення секретованої речовини, які принципи функціонування пори та регуляції даного процесу і т. ін. Крім того, процес екзоцитозу може реалізуватися за двома основними принципами – повного злиття з мембраною (“full fusion”) або за допомогою дуже короткотривалого з’єднання везикули з мембраною (“kiss-and-run”-процес). Механізми цих процесів досі залишаються маловивченими. Досліджувати вказані процеси можна за допомогою вимірювань індивідуальних секреторних подій, що ми й використовували в своїх дослідженнях.

Одними з важливих молекулярних “діючих осіб” описаних вище процесів є SM-білки, до переліку яких і входить білок Munc18 [35]. Достовірно встановлено, що Munc18 тісно зв’язаний з мембранним білком SNARE-комплексу синтаксинам-1 [17]. Останній у неактивному стані знаходиться в інtermолекулярній “закритій конформації” – молекула “загорнута” в себе саму; з нею і взаємодіє Munc18. При екзоцитозі синтаксинам-1 “розкривається” і переходить у “відкриту” конформацію. Щодо функції Munc18 існують дуже різні і навіть суперечливі припущення. Деякі автори вважають, що Munc18 відіграє роль шаперону щодо білка синтаксинам-1, тоді як інші думають, що Munc18 залучений у процес “причалювання” або сам процес злиття везикули й мембрани.

У наших дослідженнях ми вивчали участь Munc18 у кальційзалежному екзоцитозі з ізольованих хромафінних клітин медулярної тканини надниркової залози щура, використовуючи ін’єкції специфічних антитіл щодо Munc18 (анти-Munc18) для блокування функції цього білка в процесі екзоцитозу. Такий

підхід в інших лабораторіях раніше не використовувався; методично він є досить складним. Як показали результати наших експериментів, пригнічення функції Munc18 істотно впливає на частоту секреторних піків, яка значно (майже вдвічі) зменшується. Це є очевидним доказом залучення Munc18-протеїнів у процеси екзоцитозу в хромафінних клітинах. Отримані нами значення кінетичних параметрів секреторних піків в умовах пригнічення функції Munc18 свідчать про те, що вони значно відрізняються від величин, отриманих у контрольних умовах. Амплітуда секреторних піків зменшувалась, а їх спад уповільнювався. У той же час інтегральна величина піку (площа) у середньому вірогідно не зменшувалася. Ця обставина вказує на те, що кількість вивільнених катехоламінів не змінювалася (або зміни були дуже обмеженими). Згідно з нашою математичною моделлю часової динаміки секреції [36], такий перебіг подій може бути пов’язаний зі зменшенням діаметра фузійної пори, що утворюється при злитті секреторної везикули з плазматичною мембраною в умовах пригнічення функції синаптичного білка Munc18. Згідно з оцінками, отриманими з використанням даної моделі, зменшення розмірів пори в присутності анти-Munc18 у наших експериментальних умовах повинно складати близько 10 %. Слід також зазначити, що в наших експериментах з уведенням антитіл щодо синаптичного протеїну синаптотагміну кінетичні параметри секреторних піків не зазнавали змін. Останнє вказує на досить високу специфічну участь Munc18 у формуванні фузійної пори [28]. Наше припущення збігається з даними Баркляя [29]. Цей автор, використовуючи аналіз параметрів секреторних піків у клітинах, котрі експресували білок Munc18-1 з різними точковими мутаціями, прийшов до висновку, що зазначений білок залучений у встановлення початкової швидкості дифузії. Останній параметр може істотно визначатися діаметром фузійної пори, розміри якої, згідно з результатами наших досліджень, змінюються під впливом Munc18.

Отже, отримані нами дані з очевидністю свідчать про те, що блокування функції синаптичного білка родини SM-білків Munc18 істотно пригнічує секреторну функцію хромафінних клітин. Це вказує на значну роль згаданого синаптичного білка в процесі кальційзалежного екзоцитозу із досліджуваних клітин; спостережувані зміни можуть бути пов’язані з впливом даного протеїну на діаметр фузійної пори.

Дана робота була підтримана грантом INTAS 2001/2095.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. T. Brunger, "Structural insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent exocytosis," *Current Opin. Neurobiol.*, **10**, 293-302 (2000).
2. B. He and W. Guo, "The exocyst complex in polarized exocytosis," *Current Opin. Cell Biol.*, **21**, 537-542 (2009).
3. B. P. Jena, "Secretory vesicles transiently dock and fuse at the porosome to discharge contents during cell secretion," *Cell Biol. Int.*, **34**, 3-12 (2010).
4. G. J. Augustine and E. Neher, "Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells," *J. Physiol.*, **450**, 247-271 (1992).
5. R. D. Burgoyne and A. Morgan, "Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics," *Trends Neurosci.*, **18**, 191-196 (1995).
6. E. A. Lukanetz and E. Neher, "Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells," *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 2865-2873 (1999).
7. E. Neher and T. Sakaba, "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release," *Neuron*, **59**, 861-872 (2008).
8. O. L. Zaika, O. V. Pochinyuk, O. V. Sadovi, et al., "Involvement of the endoplasmic reticulum of chromaffin cells of the rat adrenal gland in calcium signaling," *Neurophysiology/Neurofiziologiya*, **41**, No. 6, 389-394 (2009).
9. H. Otto, P. I. Hanson, and R. Jahn, "Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6197-6201 (1997).
10. D. Fasshauer, D. Bruns, B. Shen, et al., "A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25," *J. Biol. Chem.*, **272**, 4582-4590 (1997).
11. D. Fasshauer, H. Otto, W. K. Eliason, et al., "Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation," *J. Biol. Chem.*, **272**, 28036-28041 (1997).
12. D. Fasshauer, R. B. Sutton, A. T. Brunger, et al., "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15781-15786 (1998).
13. K. M. Fiebig, L. M. Rice, E. Pollock, et al., "Folding intermediates of SNARE complex assembly," *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 117-123 (1999).
14. S. Brenner, "The genetics of *Caenorhabditis elegans*," *Genetics*, **77**, 71-94 (1974).
15. E. P. Garcia, E. Gatti, M. Butler, et al., "A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2003-2007 (1994).
16. K. L. Schulze, J. T. Littleton, A. Salzberg, et al., "rop, a *Drosophila* homolog of yeast Sec1 and vertebrate n-Sec1/Munc-18 proteins, is a negative regulator of neurotransmitter release *in vivo*," *Neuron*, **13**, 1099-1108 (1994).
17. Y. Hata and T. C. Sudhof, "A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic," *J. Biol. Chem.*, **270**, 13022-13028 (1995).
18. J. Pevsner, S. C. Hsu, and R. H. Scheller, "n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1445-1449 (1994).
19. M. Verhage, A. S. Maia, J. J. Plomp, et al., "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion," *Science*, **287**, 864-869 (2000).
20. O. L. Zaika, O. M. Pochinyuk, and E. A. Lukanetz, "Comparative characteristics of the secretory responses of chromaffin and pheochromocytoma PC-12 cells to acetylcholine stimulation," *Neurophysiology/Neurofiziologiya*, **32**, No. 3, 174-176 (2000).
21. О. Л. Заика, О. М. Починюк, Е. А. Лукьянец, "Электрохимические исследования индуцируемой секреции катехоламинов из одиночных везикул хромоаффинных клеток крысы," *Укр. біохім. журн.*, **73**, № 4, 69-72 (2001).
22. O. M. Pochynyuk, O. L. Zaika, and E. A. Lukanetz, "Role of the mitochondria in generation of acetylcholine-induced calcium transients in rat chromaffin cells," *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **34**, № 3, 217-219 (2002).
23. O. L. Zaika, O. M. Pochynyuk, and E. A. Lukanetz, "Comparative studies of calcium transients induced by acetylcholine in rat chromaffin cells," *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **34**, № 2/3, 270-272 (2002).
24. P. G. Kostyuk, O. M. Pochynyuk, O. L. Zaika, et al., "Roles of nicotinic and muscarinic receptors in calcium signaling and transmitter release," *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **35**, № 3/4, 229-235 (2003).
25. A. V. Sadovyj, E. N. Yavorskaya, and E. A. Lukanetz, "Voltammetric detection of quantal release of catecholamines from chromaffin cells," *Фізіол. журн.*, **55**, 140 (2009).
26. E. A. Lukanetz, "Calcium signaling in secretion of catecholamines in chromaffin cells," *Фізіол. журн.*, **55**, 110-111 (2009).
27. O. L. Zaika, O. M. Pochynyuk, P. G. Kostyuk, et al., "Acetylcholine-induced calcium signalling in adrenaline- and noradrenaline-containing adrenal chromaffin cells," *Arch. Biochem. Biophys.*, **424**, 23-32 (2004).
28. О. М. Починюк, В. М. Біденко, О. Л. Заїка, О. О. Лук'янець, "Динаміка процесу екзоцитозу в хромоафінних клітинах шура при різних типах стимуляції," *Біофіз. вісник*, **12**, 97-107 (2003).
29. J. W. Barclay, "Munc-18-1 regulates the initial release rate of exocytosis," *Biophys. J.*, **94**, 1084-1093 (2008).
30. R. Jahn, "Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage," *Neuron*, **27**, 201-204 (2000).
31. F. Deak, Y. Xu, W. P. Chang, et al., "Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming," *J. Cell Biol.*, **184**, 751-764 (2009).
32. T. Tsuboi, "Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells," *Neurosci. Res.*, **63**, 83-88 (2009).
33. R. F. Toonen and M. Verhage, "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control," *Trends Neurosci.*, **30**, 564-572 (2007).
34. D. Gallwitz and R. Jahn, "The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs," *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 113-116 (2003).
35. G. A. Han, N. T. Malintan, B. M. Collins, et al., "Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion," *J. Neurochem.*, **114** (2010).