

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

© О. Г. Щербакова

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Ленинградская область, г. Гатчина, Россия  
E-mail: scherbakova\_og@pnpi.nrcki.ru

Нейроны и эндокринные клетки могут высвобождать более одного трансммиттера, причем обладают пластичностью, которая позволяет дифференцированное высвобождение различных трансммиттеров в зависимости от стимуляции. Настоящий обзор представляет накопленную к данному моменту информацию о молекулярных детерминантах, которые регулируют дифференцированное высвобождение нейротрансммиттеров. В последние годы открыто, что синаптические везикулы, несущие трансммиттеры и нейропептиды, гетерогенны по своему молекулярному составу. Недавно были описаны белки синаптических везикул, которые селективно регулируют способность этих везикул высвобождаться синхронно или асинхронно в ответ на стимуляцию, или спонтанно независимо от стимуляции. Изоформы синаптотагмина, ключевого белка, вовлеченного в высвобождение синаптических везикул, различаются по своим биохимическим свойствам и, будучи локализованы в различных синаптических везикулах, могут участвовать в высвобождении разных трансммиттеров в ответ на разные стимулы. Было показано также, что трансммиттеры могут высвобождаться дифференцированно в зависимости от способа экзоцитоза — частичного (называемого kiss-and-run) или полного слияния синаптических везикул с мембраной.

*Ключевые слова:* нейротрансммиттер, синаптические везикулы, синаптотагмин, экзоцитоз.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 5. С. 536—544. 2018

*O. G. Shcherbakova.* MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING DIFFERENTIAL NEUROTRANSMITTERS RELEASE. Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia, e-mail: scherbakova\_og@pnpi.nrcki.ru.

Neurons and endocrine cells can release more than one transmitter, and they possess plasticity, which allows differential release transmitters depending on stimulation. This review describes the information accumulated to date about the molecular determinants that regulate the differential neurotransmitters release. It has been discovered recently that synaptic vesicles are heterogeneous in their molecular composition. Recently, synaptic vesicle proteins have been described that selectively regulate the ability of these particles to be fused synchronously or asynchronously in response to stimulation or spontaneously independent of stimulation. The isoforms of synaptotagmin, a key protein involved in the release of synaptic particles, differ in their biochemical properties and, being localized to various synaptic particles, can participate in the release of different

transmitters in response to a different stimulus. It has also been shown that the transmitters can be released differentially depending on the mode of exocytosis—partial — kiss-and-run, or the complete fusion of synaptic particles with the membrane.

*Key words:* neurotransmitter, synaptic vesicles, synaptotagmin, exocytosis.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 5. P. 536—544. 2018

На начальных этапах изучения нейротрансмиссии один из классиков нейробиологии Генри Дейл предположил, что каждый нейрон выделяет один главный транмиттер из всех аксонов и, таким образом, может быть идентифицирован по этому признаку [16]. В дальнейшем это предположение было названо принципом Дейла. С развитием методов иммуноцитохимии, однако, было открыто много синапсов, в которых в зависимости от стимула наряду с доминантным транмиттером выделялись и нейропептиды [27]. Одним из важных открытий стало открытие высвобождения допамина и глутамата нейронами среднего мозга [53].

К настоящему времени уже известно много примеров того, что нейроны и эндокринные клетки могут высвобождать более одного транмиттера [9, 24, 25, 33, 38, 48, 55, 63]. Симпатические эфферентные нейроны обладают свойством высвобождать множество нейротранмиттеров: ацетилхолин, нейропептид Y, моноамины — эпинефрин и нор-эпинефрин, допамин, серотонин, а также пурины (АТФ, УТФ) [22, 36, 41]. Этим же свойством обладают и хромафинные клетки, а также клетки, выделенные из феохромоцитомы PC12 [58]. Интересно, что симпатические нейроны в культуре клеток могут быстро менять тип нейротрансмиссии: в течение 5 мин после стимуляции нейротропным фактором мозга (BDNF) или цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF) преимущественное высвобождение ацетилхолина сменяется на высвобождение катехоламинов [31].

Таким образом, нейроны и эндокринные клетки обладают пластичностью, которая позволяет дифференцированное высвобождение различных транмиттеров в зависимости от стимуляции. Вопрос о том, как могло бы регулироваться дифференцированное высвобождение нейротранмиттеров, крайне интересен. В настоящем обзоре будет предпринята попытка систематизировать накопленную к данному моменту информацию о молекулярных детерминантах, которые регулируют этот процесс.

## РАЗЛИЧНЫЕ КЛАССЫ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

Нейроны содержат два главных класса синаптических везикул — маленькие прозрачные (small, clear synaptic vesicles (SSV)), которые в основном содержат низкомолекулярные транмиттеры, загружаемые специфическими молекулами-транспортерами из цитоплазмы, тогда как нейропептиды загружаются в более крупные везикулы, непрозрачные при электронно-микроскопическом анализе (larger, dense-core vesicles (DCVs)), формирующиеся в транс-Гольджи аппарате [68]. Такое разделение транмиттеров в разные классы везикул могло бы создавать возможность для того, чтобы они высвобождались независимо друг от друга. Было показано, что разные классы везикул, SSV и DSV, имеют различную чувствительность к стимуляции [6, 27, 56, 66]. Однако как в нейронах, так и в эндокринных клетках часто в одном типе везикул могут содержаться как низкомолекулярные транмиттеры, так и нейропептиды одновременно [27, 46]. Таким образом, само по себе нахождение транмиттеров в различных классах синаптических везикул не является определяющим фактором их дифференцированного высвобождения.

## ПОЛНОЕ ИЛИ ЧАСТИЧНОЕ (KISS-AND-RUN) СЛИЯНИЕ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ С ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОЙ

Экзоцитоз нейротрансмиттеров и гормонов может происходить двумя различными способами — kiss-and-run, при котором происходит только частичное слияние синаптических везикул с мембраной, и полное слияние (full fusion) [1, 11]. При частичном слиянии содержимое везикул высвобождается через небольшие поры слияния (fusion pores) и, таким образом, их размер ограничивает размер молекул, которые могут при таком способе экзоцитоза выйти наружу. При полном слиянии высвобождаются все содержащиеся в везикулах молекулы.

Хромаффинные клетки могут высвобождать катехоламины и нейропептиды из одной везикулы почти одновременно [62], однако в зависимости от формы стимуляции нор-эпинефрин высвобождается путем kiss-and-run, тогда как при полном слиянии везикул высвобождаются нор-эпинефрин и нейропептиды [21]. АТФ и инсулин, совместно находящиеся в панкреатических бета-клетках, также могут секретироваться дифференцированно или одновременно в зависимости от способа экзоцитоза [34]. Таким образом, тип экзоцитоза — kiss-and-run или полное слияние — определяет, какой из нейротрансмиттеров высвобождается.

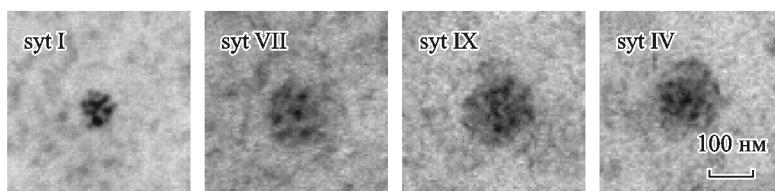
### МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

Дифференцированное высвобождение трансмиттеров очень трудно было объяснить из-за того, что данных о молекулярном составе синаптических везикул была недостаточна, и все везикулы априорно считались одинаковыми. Однако в течение последних 10 лет накопились данные о гетерогенности молекул, входящих в состав синаптических везикул.

Синаптотагмин (syt) — ключевой белок секреторных везикул, обеспечивающий экзоцитоз в ответ на повышение концентрации кальция [2, 12, 52]. Известно 17 его изоформ, которые различаются своими биохимическими свойствами [8, 30, 35, 51]. Четыре изоформы синаптотагмина (syt I, syt II, syt VII и syt IX) функционируют как сенсоры  $Ca^{2+}$  в процессе экзоцитоза синаптических и нейроэндокринных везикул [51, 52], тогда как syt IV не связывает  $Ca^{2+}$  и ингибирует экзоцитоз [7]. Интересно, что наиболее распространенный syt I может выполнять противоположные функции: он стимулирует индуцированный и ингибирует спонтанный экзоцитоз в зависимости от его конформации [4]. Кроме того, синаптотагмины имеют различное сродство к компонентам липидных мембран, например к фосфатидилсерину: syt VII связывается с фосфатидилсеринсодержащими липосомами эффективнее, чем syt I, при этом syt IX имеет к ним промежуточное сродство [64].

Следует отметить, что различные специфические изоформы синаптотагмина экспрессируются в разной степени в разных типах нейронов и нейроэндокринных клеток [10, 52]. Так, в PC12 присутствуют syt I, syt IV, syt VII и syt IX [19, 20, 57, 60]. В работе Z. Zhang и соавт. [65] с помощью иммуноэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что различные изоформы синаптотагминов локализируются в PC12 клетках к DSV разного размера: syt I — преимущественно к самым маленьким везикулам, syt IV и VII — к везикулам среднего размера и syt IX — к самым крупным везикулам (рис. 1, по: [65]). В этой и предыдущих работах этой же лаборатории было показано, что эти синаптотагмины различаются по чувствительности к различным двухвалентным ионам, к ингибированию syt IV и по предпочтению к kiss-and-run или полному слиянию [64, 65]. DSV наименьшего размера несут syt I и имеют предпочтение к kiss-and-run форме экзоцитоза, наибольшие несут больше syt VII и предпочитают полное слияние, а средние несут syt IX и также показывают промежуточное предпочтение к kiss-and-run экзоцитозу. Поскольку при kiss-and-run экзоцитозе преимущественно высвобождаются молеку-

A



B

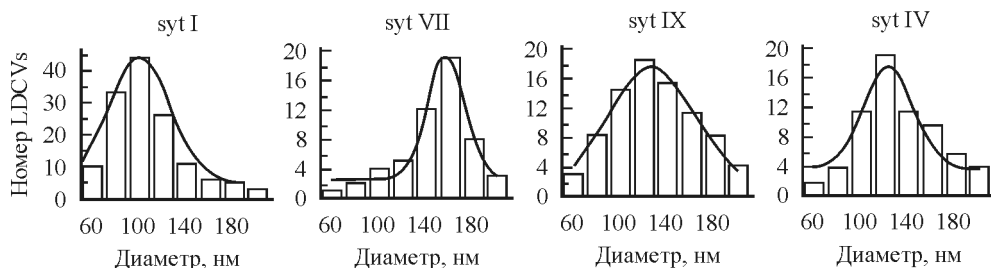


Рис. 1. Различные изоформы синаптотагминов локализуются в синаптических везикулах разного размера (по: [65]).

A — локализация различных изоформ синаптотагминов к DCV разного размера, визуализированная с помощью электронной микроскопии; B — распределение DCV, содержащих syt I, syt VII, syt IX и syt IV по размерам.

лы меньшего размера, участие определенных изоформ синаптотагминов, предпочтительно вовлеченных в kiss-and-run, будет определять высвобождение молекул меньшего размера. Таким образом, разнообразие изоформ синаптотагмина обеспечивает регуляцию высвобождения различных молекул из одних и тех же клеток.

В работе лаборатории Эми Харкинз (Amy Harkins) было показано, что нокаут syt I в PC12 клетках по-разному влияет на высвобождение разных трансмисмиттеров: при стабильной экспрессии плазмиды, кодирующей shRNA для syt I, высвобождение АТФ и NPY было подавлено полностью, тогда как высвобождение нор-эпинефрина было только уменьшено на 50 % [45]. Продолжая это направление, исследователи показали, что титруя уровень экспрессии syt I в PC12 они могут по-разному влиять на высвобождение различных трансмисмиттеров, т. е. каждый трансмисмиттер имеет определенный пороговый уровень экспрессии syt I [39].

По мере изучения молекулярного состава синаптических везикул были выявлены новые белки, которые определяют их гетерогенность. Слияние синаптических везикул с мембраной — сложный процесс, регулируемый белковыми комплексами. Ключевой белок, регулирующий слияние мембран в нейронах, был открыт в лаборатории Джеймса Ротмана в 1987 г. и идентифицирован по чувствительности к N-этил-малеимиду — NSF [5, 61]. Вслед за этим были открыты белки, взаимодействующие с NSF — так называемые «рецепторы» NSF — SNARE (soluble NSF attachment protein receptor v-SNARE) [13, 49]. SNARE-рецепторы, находящиеся на синаптических везикулах, были названы везикулярными (v-SNARE), а рецепторы, находящиеся на плазматических мембранах нейронов — t-SNARE (target-SNARE). Во время экзоцитоза v-SNARE и t-SNARE белки взаимодействуют подобно застежке-молнии, закрывающейся от N- к С- концу, и таким образом сближают участки мембран, содержащие их С-концы [33, 41, 54].

В общепризнанной модели v-SNARE белок синаптобrevин-2 (syb2), также называемый VAMP-2, связывается с t-SNARE белком синтаксином-1 и белком, ассоциированным с синаптической SNAP-25, чтобы сближить мембрану синаптической

ской везикулы с клеточной мембраной, причем этот процесс катализируется синаптотагмином 1 в ответ на повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [33].

Выделяют три формы высвобождения синаптических везикул в зависимости от стимула: спонтанное, индуцированное синхронное и асинхронное высвобождение [14, 18, 23]. В последние годы растет число исследований, в которых показано, что состав везикул, участвующих в высвобождении при разных способах стимуляции, различен. Так, оказалось, что ключевой v-SNARE белок синаптобревин-2 преимущественно содержится в везикулах, высвобождающихся при индуцированном синхронном высвобождении. В культивируемых нейронах гиппокампа мышей, в которых отсутствовал *sub2*, индуцированная трансмиссия полностью отсутствовала, тогда как спонтанная нейротрансмиссия сохранилась с уменьшенной частотой [17, 47]. Кроме того, с помощью микроскопной техники суперразрешения STED было прямо показано, что везикулы, содержащие *sub2*, преимущественно высвобождаются индуцированным образом [44]. Синаптобревин-1 также участвует преимущественно в индуцированном высвобождении синаптических везикул.

Другой v-SNARE белок VAMP4, напротив, вовлечен в асинхронное и спонтанное высвобождение, как было выявлено в экспериментах с использованием нокаута гена *VAMP4* в культивируемых нейронах гиппокампа [42, 44]. Эксперименты с использованием оптического репортера на основе pH-чувствительного флуоресцентного белка, сшитого с VAMP4, показали, что VAMP4-содержащие везикулы гораздо менее часто высвобождаются в ответ на стимуляцию, чем везикулы, содержащие *sub2* [42]. pH-чувствительный флуоресцентный белок (pHluorin) практически не имеет светимости при кислых значениях pH. Таким образом, будучи сшит с внутримембранными доменами белков синаптических везикул, он почти невидим. При экзоцитозе, когда содержимое везикул высвобождается и попадает в область более нейтральных pH, светимость этого белка резко возрастает и дает возможность определить дискретный флуоресцентный сигнал, соответствующий высвобождению одной везикулы [37]. Эксперименты, в которых используются исследуемые белки, сшитые с pH-чувствительными флуоресцентными белками с различными спектральными характеристиками, дают возможность прямо изучить экзо- и эндоцитоз синаптических везикул, в которых содержатся эти белки.

Недавно было открыто, что v-SNARE белок *vtila* (*vps10p tail interactor 1a*) участвует в спонтанном экзоцитозе синаптических везикул. Нокаут гена *vtila* в культивируемых нейронах гиппокампа уменьшал частоту спонтанного экзоцитоза, и везикулы, меченные флуоресцентным репортером этого белка в ответ на стимуляцию, не перемещались так же эффективно, как везикулы, содержащие *sub2* [28, 43, 44]. Кроме того, везикулы, содержащие *vtila*-флуоресцентный белок, при спонтанном высвобождении двигались независимо от везикул, содержащих *sub2*. Эти эксперименты подтверждают, что *sub2* и *vtila* маркируют различные популяции синаптических везикул [43]. Нокаут гена, кодирующего белок *vtila* в хромоаффинных клетках, уменьшает число DSV, участвующих в секреции гормонов [59].

Другой v-SNARE белок, VAMP7, также участвует преимущественно в спонтанном экзоцитозе синаптических везикул [4, 29, 43].

Таким образом, существовавшая ранее классическая модель, в которой синаптические везикулы различались только по принадлежности к разным функциональным популяциям — покоящиеся, готовые к немедленному высвобождению, и рециркулирующие, в настоящее время существенно дополнена (рис. 2, по: [15]).

Поскольку синаптические везикулы, активированные при различной стимуляции, различаются по своему белковому составу, возможно предположить, что они несут и различные нейротрансмиттеры. Таким образом, определение молекулярных маркеров различных синаптических везикул создало основу, опираясь

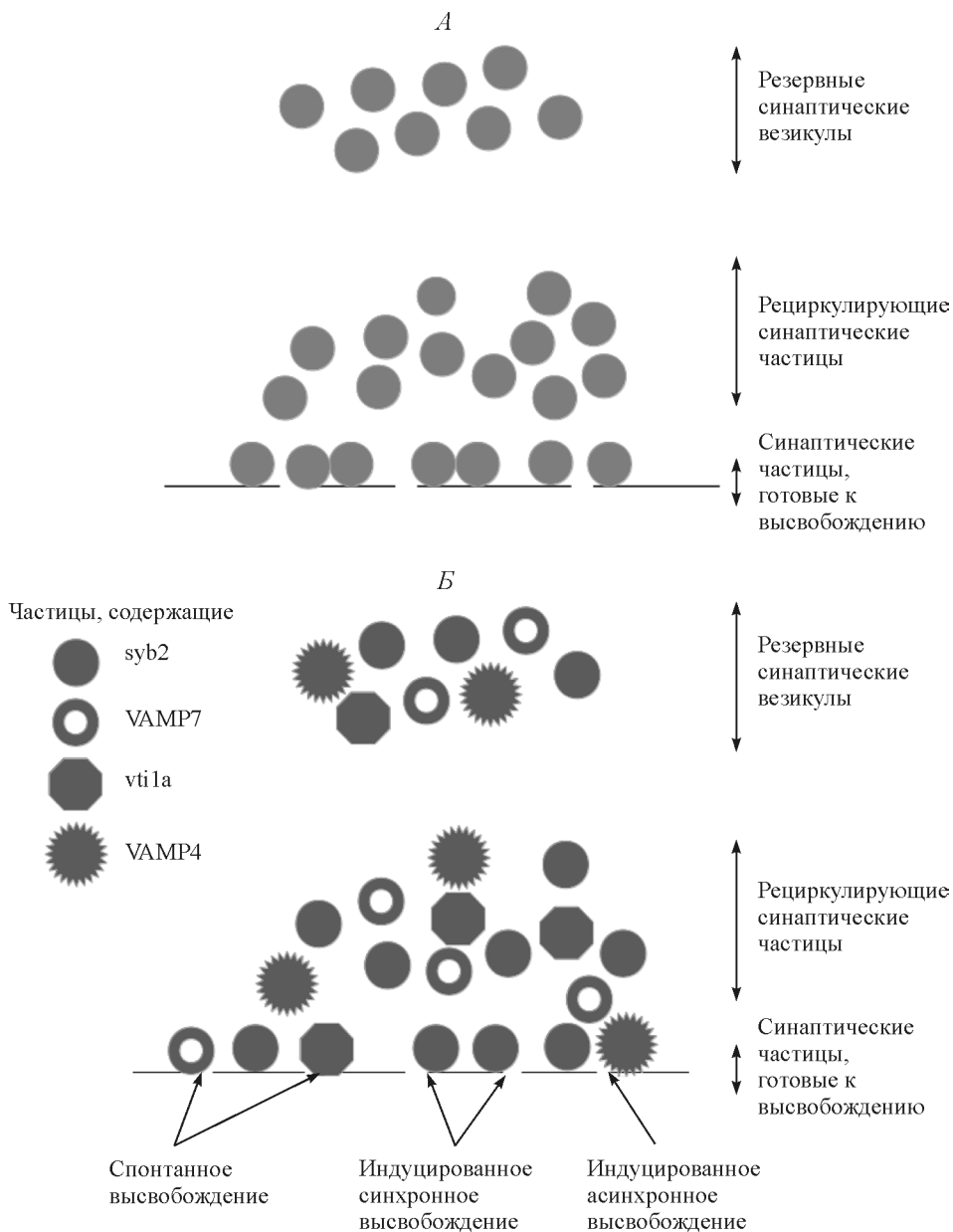


Рис. 2. Различные пулы синаптических везикул (*A*), классическая схема (*B*). Молекулярная гетерогенность пресинаптических частиц (по: [15]).

*A* — общепринятая ранее модель организации синаптических частиц в пресинаптической зоне нейрона; *B* — синаптические частицы гетерогенны по своему молекулярному составу. Частицы, содержащие syb2, преимущественно сливаются с пресинаптической мембраной при индуцированном синхронном высвобождении; VAMP7 и vti1a — при спонтанном высвобождении; VAMP4 — при индуцированном асинхронном высвобождении.

на которую можно более детально исследовать механизмы дифференцированно-го высвобождения нейротрансмиттеров.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01122.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Alabi A. A., Tsien R. W.* Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev. Physiol.* 75: 393—422. 2013.
- [2] *Augustine G. J.* How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 320—326. 2001.
- [3] *Bai H., Xue R., Bao H., Zhang L., Yethiraj A., Cui Q., Chapman E. R.* Different states of synaptotagmin regulate evoked versus spontaneous release. *Nature Commun.* 22(7):10971. 2016.
- [4] *Bal M., Leitz J., Reese A. L., Ramirez D. M., Durakoglugil M., Herz J., Monteggia L. M., Kavalali E. T.* Reelin mobilizes a VAMP7-dependent synaptic vesicle pool and selectively augments spontaneous neurotransmission. *Neuron.* 80: 934—946. 2013.
- [5] *Balch W. E., Dunphy W. G., Braell W. A., Rothman J. E.* Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell.* 39: 405—416. 1984.
- [6] *Bean A. J., Zhang X., Hokfelt T.* Peptide secretion: what do we know? *FASEB J.* 8: 630—638. 1994.
- [7] *Bhalla A., Chicka M. C., Chapman E. R.* Analysis of the synaptotagmin family during reconstituted membrane fusion. Uncovering a class of inhibitory isoforms. *J. Biol. Chem.* 283: 21 799—21 807. 2008.
- [8] *Bhalla A., Tucker W. C., Chapman E. R.* Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , and  $Sr^{2+}$  concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Mol. Biol. Cell.* 16: 4755—4764. 2005.
- [9] *Burnstock G.* Cotransmission. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 47—52. 2004.
- [10] *Cao P., Yang X., Südhof T. C.* Complexin activates exocytosis of distinct secretory vesicles controlled by different synaptotagmins. *J. Neurosci.* 33(4): 1714—1727. 2013.
- [11] *Cárdenas A. M., Marengo F. D.* How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *J. Neurochem.* (6): 867—879. 2016.
- [12] *Chapman E. R.* How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem.* 77: 615—641. 2008.
- [13] *Clary D. O., Griff I. C., Rothman J. E.* SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell.* 61: 709—721. 1990.
- [14] *Colmeus C., Gomez S., Molgo J., Thesleff S.* Discrepancies between spontaneous and evoked synaptic potentials at normal, regenerating and botulinum toxin poisoned mammalian neuromuscular junctions. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 215: 63—74. 1982.
- [15] *Crawford D. C., Kavalali E. T.* Molecular underpinnings of synaptic vesicle pool heterogeneity. *Traffic.* (4): 338—364. 2015.
- [16] *Dale H.* Pharmacology and nerve-endings. *Proc. R. Soc. Med.* 28: 319—332. 1935.
- [17] *Deak F., Schoch S., Liu X., Südhof T. C., Kavalali E. T.* Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 6: 1102—1108. 2004.
- [18] *Fatt P., Katz B.* Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 117:109—128. 1952.
- [19] *Fukuda M., Kanno E., Satoh M., Saegusa C., Yamamoto A.* Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279: 52 677—52 684. 2004.
- [20] *Fukuda M., Kowalchuk J. A., Zhang X., Martin T. F., Mikoshiba K.* Synaptotagmin IX regulates  $Ca^{2+}$ -dependent secretion in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 4601—4604. 2002.
- [21] *Fulop T., Radabaugh S., Smith C.* Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 25: 7324—7332. 2005.
- [22] *Furshpan E. J., Landis S. G., Potter D. D.* Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J. Neurosci.* 6:1061—1079. 1986.

- [23] *Glitsch M. D.* Spontaneous neurotransmitter release and Ca<sup>2+</sup> — how spontaneous is spontaneous neurotransmitter release? *Cell Calcium*. 43:9—15. 2008.
- [24] *Jo Y. H., Schlichter R.* Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 2: 241—245. 1999.
- [25] *Jonas P., Bischofberger J., Sandkuhler J.* Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science*. 281: 419—424. 1998.
- [26] *Hanson P. I., Roth R., Morisaki H., Jahn R., Heuser J. E.* Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. 90(3):523—535. 1997.
- [27] *Hokfelt T., Johansson O., Goldstein M.* Chemical anatomy of the brain. *Science*. 225(4668):1326—1334. 1984.
- [28] *Hoopmann P., Punge A., Barysch S. V., Westphal V., Buckers J., Opazo F., Bethani I., Lauterbach M. A., Hell S. W., Rizzoli S. O.* Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:19 055—19 060. 2010.
- [29] *Hua Z., Leal-Ortiz S., Foss S. M., Waites C. L., Garner C. C., Voglmaier S. M., Edwards R. H.* v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*. 71:474—487. 2011.
- [30] *Hui E., Bai J., Wang P., Sugimori M., Llinas R. R., Chapman E. R.* Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 5210—5214. 2005.
- [31] *Landis S. K.* Quick-change artist: from excitatory to inhibitory synapse in minutes. *Nature Neurosci.* (6):503—504. 2002.
- [32] *Lee S., Kim K., Jimmy Zhou.* Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron*. 68: 1159—1172. 2010.
- [33] *Lin R. C., Scheller R. H.* Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron*. 19: 1087—1094. 1997.
- [34] *MacDonald P. E., Braun M., Galvanovskis J., Rorsman P.* Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells. *Cell Metab.* 4: 283—290. 2006.
- [35] *Marqueze B., Berton F., Seagar M.* Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie*. 82: 409—420. 2000.
- [36] *Matsumoto S. G., Sah D., Potter D. D., Furshpan E. J.* Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. IV. Nonadrenergic excitation of cardiac myocytes and the variety of multiple-transmitter states. *J. Neurosci.* 7 (2): 380—390. 1987.
- [37] *Miesenböck G., Dino A. De Angelis, James E. Rothman.* Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 394: 192—195. 1998.
- [38] *Nishimaru H., Restrepo C. E., Ryge J., Yanagawa Y., Kiehn O.* Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 5245—5249. 2005.
- [39] *Papke J. B., Moore-Dotson J. M., Watson D. J., Wedell C. D., French L. R., Rendell S. R., Harkins A. B.* Titration of synaptotagmin I expression differentially regulates release of norepinephrine and neuropeptide Y. *Neuroscience*. 218: 78—88. 2012.
- [40] *Poirier M. A., Xiao W., Macosko J. C., Chan C., Shin Y. K., Bennett M. K.* The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat. Struct. Biol.* 5: 765—769. 1998.
- [41] *Potter D. D., Landis S. C., Matsumoto S. G., Furshpan E. J.* Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. II. Adrenergic/cholinergic dual status and plasticity. *J. Neurosci.* 6: 1080—1098. 1986.
- [42] *Raingo J., Khvotchev M., Liu P., Darios F., Li Y. C., Ramirez D. M., Adachi M., Lemieux P., Toth K., Davletov B., Kavalali E. T.* VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat. Neurosci.* 15: 738—745. 2012.
- [43] *Ramirez D. M., Khvotchev M., Trauterman B., Kavalali E. T.* Vt1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. *Neuron*. 73: 121—134. 2012.
- [44] *Revelo N. H., Kamin D., Truckenbrodt S., Wong A. B., Reuter-Jessen K., Reisinger E., Moser T., Rizzoli S. O.* A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. *J. Cell Biol.* 205:591—606. 2014.
- [45] *Roden W. H., Papke J. B., Moore J. M., Cahill A. L., Macarthur H., Harkins A. B.* Stable RNA interference of synaptotagmin I in PC12 cells results in differential regulation of transmitter release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293(6): C1742—C1752. 2007.



- [46] *Salio C., Lossi L., Ferrini F., Merighi A.* Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res.* 326: 583—598. 2006.
- [47] *Schoch S., Deak F., Konigstorfer A., Mozhayeva M., Sara Y., Sudhof T. C., Kavalali E. T.* SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science.* 294:1117—1122. 2001.
- [48] *Seal R. P., Edwards R. H.* Functional implications of neurotransmitter co-release: Glutamate and GABA share the load. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 114—119. 2006.
- [49] *Söllner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J. E.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 362: 318—324. 1993.
- [50] *Söllner T., Bennett M. K., Whiteheart S. W., Scheller R. H., Rothman J. E.* A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 75: 409—418. 1993.
- [51] *Sudhof T. C.* Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277: 7629—7632. 2002.
- [52] *Südhof T. C.* The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53(47):12 696—12 717. 2014.
- [53] *Sulzer D., Rayport S.* Dale's principal and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids.* 19(1):45—52. 2000.
- [54] *Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A. T.* Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 395: 347—353. 1998.
- [55] *Tsen G., Williams B., Allaire P., Zhou Y. D., Ikonomov O., Kondova I., Jacob M. H.* Receptors with opposing functions are in postsynaptic microdomains under one presynaptic terminal. *Nat. Neurosci.* 3: 126—132. 2000.
- [56] *Verhage M., McMahon H. T., Ghijsen W. E., Boomsma F., Scholten G., Wiegant V. M., Nicholls D. G.* Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron.* 6: 517—524. 1991.
- [57] *Vician L., Lim I. K., Ferguson G., Tocco G., Baudry M., Herschman H. R.* Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2164—2168. 1995.
- [58] *Winkler H., Apps D. K., Fischer-Colbrie R.* The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience.* 18: 261—290. 1986.
- [59] *Walter A. M., Kurps J., de Wit H., Schoning S., Toft-Bertelsen T. L., Lauks J., Ziomkiewicz I., Weiss A. N., Schulz A., Fischer von Mollard G., Verhage M., Sorensen J. B.* The SNARE protein vti1a functions in dense-core vesicle biogenesis. *EMBO J.* 33:1681—1697. 2014.
- [60] *Wang P., Chicka M. C., Bhalla A., Richards D. A., Chapman E. R.* Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Mol. Cell. Biol.* 25: 8693—8702. 2005.
- [61] *Wilson D. W., Wilcox C. A., Flynn G. C., Chen E., Kuang W. J., Henzel W. J., Block M. R., Ullrich A., Rothman J. E.* A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature.* 339(6223):355—359. 1989.
- [62] *Whim M. D.* Near simultaneous release of classical and peptide cotransmitters from chromaffin cells. *J. Neurosci.* 26: 6637—6642. 2006.
- [63] *Wojcik S. M., Katsurabayashi S., Guillemin I., Friauf E., Rosenmund C., Brose N., Rhee J. S.* A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron.* 50: 575—587. 2006.
- [64] *Zhang Z., Hui E., Chapman E. R., Jackson M. B.* Regulation of exocytosis and fusion pores by synaptotagmin-effector interactions. *Mol. Biol. Cell.* 21: 2821—2831. 2010.
- [65] *Zhang Z., Wu Y., Wang Z., Dunning M., Rehfuss J., Ramanan D., Edwin R., Chapman E. R., Jackson M. B.* Release mode of large and small dense-core vesicles specified by different synaptotagmin isoforms in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell.* 22(13): 2324—2336. 2011.
- [66] *Zhou Z., Misler S.* Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 270: 3498—3505. 1995.
- [67] *Zhou Z., Misler S., Chow R. H.* Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys J.* 70: 1543—1552. 1996.
- [68] *Zupanc G. K.* Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron.* 27(1):35—91. 1996.