

## LE PICCOLE VESCICOLE DELLE TERMINAZIONI NERVOSE SECRETIVE DELLA NEUROIPOFISI SONO BIOCHIMICAMENTE SIMILI ALLE PICCOLE VESCICOLE SINAPTICHE DEI TERMINALI NERVOSI \*

F. NAVONE e G. DI GIOIA

Consiglio Nazionale delle Ricerche - Centro Farmacologia Infrastrutture Cellulari, Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi, Milano

**Riassunto.** - Due proteine maggioritarie dei terminali nervosi, la sinapsina I e la proteina p38 (sinaptofisina) sono associate selettivamente alla membrana delle piccole vescicole sinaptiche (small synaptic vesicles, SSV), che contengono e liberano soltanto neurotrasmettitori classici. Né la sinapsina I, né la p38 sono presenti in quantità rilevanti sulla membrana delle vescicole grandi a contenuto centrale elettrondenso (large dense-core vesicles, LDCV), responsabili dell'immagazzinamento e della secrezione di peptidi. Per studiare se vescicole simili alle SSV sono presenti anche nei terminali di neuroni specializzati per la secrezione peptidergica, abbiamo analizzato la distribuzione della sinapsina I e della p38 nella neuroipofisi con esperimenti di immunocitochimica al microscopio elettronico e di frazionamento cellulare. La sinapsina I e la p38 sono presenti nei terminali nervosi della neuroipofisi e sono preferenzialmente associate alla membrana di piccole vescicole chiare. Questo suggerisce che: a) le piccole vescicole chiare dei terminali della neuroipofisi sono biochimicamente simili alle SSV dei terminali presinaptici; b) virtualmente tutti i terminali nervosi contengono due tipi di organelli coinvolti in due distinte vie secretive regolate.

**Summary** (Microvesicles of secretory nerve endings of the neurohypophysis are biochemically related to small synaptic vesicles of nerve terminals). - Two major polypeptides of presynaptic terminals synapsin I and protein p38 (synaptophysin) are selectively associated with the membrane of small synaptic vesicles (SSV). Neither of these proteins is present at relevant concentration on the membrane of large dense-core vesicles (LDCV). While SSV contain and secrete classical neurotransmitters only, LDCV are involved in the segregation and release of peptides. In order to investigate whether small vesicles related to SSV are also present in neurons specialized for peptidergic secretion, we studied the distribution of synapsin I and of p38 in the neurohypophysis using immunocytochemical and subcellular fractionation techniques. Both synapsin I and p38 are present at high concentration in nerve terminals of the

neurohypophysis and are selectively associated with the membrane of small clear vesicles. This finding suggests that: a) small clear vesicles in nerve terminals of the neurohypophysis are biochemically related to SSV of presynaptic nerve terminals; b) virtually all nerve terminals contain two types of organelles involved in two distinct regulated secretory pathways.

### Introduzione

Nei terminali nervosi esistono almeno due tipi di organelli secretivi: le piccole vescicole sinaptiche (small synaptic vesicles, SSV), che hanno un diametro di circa 40-60 nm e contengono e liberano soltanto neurotrasmettitori classici, e vescicole più grandi (diametro > 60 nm) a contenuto elettrondenso (large dense-core vesicles, LDCV) che sono responsabili dell'immagazzinamento e della secrezione dei neurotrasmettitori peptidici [1, 2]. Le LDCV possono contenere anche molecole non peptidiche, come le amine [2]. All'interno dei terminali nervosi le SSV vanno incontro ad un ciclo eso-endocitotico continuo, mentre le LDCV possono essere assemblate soltanto nel corpo cellulare dei neuroni [3, 4]. Recentemente abbiamo trovato che due proteine maggioritarie delle vescicole sinaptiche, la sinapsina I e la proteina p38 (sinaptofisina), sono associate selettivamente alla membrana delle SSV [5, 6]. Esse non sono invece presenti, o lo sono solo in piccolissima quantità [7], sulla membrana delle LDCV. La diversa composizione proteica della membrana delle SSV e delle LDCV, insieme con il loro diverso contenuto e le diverse caratteristiche del loro ciclo cellulare, hanno suggerito che questi due organelli appartengono a due distinte vie secretive regolate dei terminali nervosi [8].

La neuroipofisi è un tessuto costituito prevalentemente da terminazioni nervose di neuroni ipotalamici, la cui funzione è quella di secernere neuroormoni peptidici nel circolo sanguigno. Queste terminazioni contengono numerosi granuli neurosecretivi (diametro 100-300 nm), in cui sono immagazzinati i peptidi [4], ed anche un grande

\* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

numero di piccole avescicole (*microvesicles*, MVS) che hanno la stessa dimensione (diametro 40-60 nm) delle SSV dei terminali presinaptici. La funzione delle MVS nei terminali della neuroipofisi è ancora sconosciuta. È stato proposto che esse rappresentino vescicole endocitotiche [9] o che esse possano condividere alcune funzioni delle SSV, tra cui quella secretiva [10]. Per ottenere indicazioni sul ruolo fisiologico e delle MVS abbiamo deciso di determinare se sinapsina I e sinaptofisina sono presenti anche sulla membrana delle MVS e se con essa sono associate selettivamente.

**La sinapsina I e la sinaptofisina sono associate con le microvescicole della neuroipofisi: dimostrazione immunocitochimica al microscopio elettronico**

La sinapsina I è una fosfoproteina specifica dei neuroni, associata perifericamente alla superficie citoplasmatica delle vescicole sinaptiche, che si pensa svolgere un ruolo regolatorio nel controllo della liberazione dei neurotrasmettitori [8]. La sinaptofisina è una glicoproteina acida intrinseca della membrana delle vescicole sinaptiche, di peso molecolare 38.000 Da in gels di poliaccrilamide contenenti SDS e agenti riducenti [6]. Per studiare la localizzazione subcellulare della sinapsina I e della sinaptofisina nella neuroipofisi abbiamo immunomarcato le particelle subcellulari di un omogenato di tessuto incluso in una matrice di agarosio [11] con anticorpi specifici per queste proteine mediante la tecnica della proteina A-oro colloidale [6]. Tale preparato contiene un grande numero di terminali nervosi risigillati dopo l'omogeniz-

zazione e chiamati "neurosecretosomi". Virtualmente tutte le particelle di oro colloidale sono situate all'interno di questi ultimi dove decorano la superficie delle MVS. Questo tipo di immagine veniva ottenuto sia con anticorpi anti-sinapsina I (Fig. 1a) che con anticorpi anti-sinaptofisina (Fig. 1b). Soltanto raramente qualche particella di oro colloidale poteva essere osservata lungo il profilo dei granuli di neurosecrezione. Le nostre osservazioni indicano che nei terminali nervosi della neuroipofisi la sinapsina I e la sinaptofisina sono preferenzialmente e selettivamente associate con la superficie delle MVS, e suggeriscono che almeno due proteine maggioritarie della membrana delle SSV, una estrinseca la sinapsina I, ed una intrinseca la sinaptofisina, sono condivise dalla popolazione di vescicole piccole e chiare della neuroipofisi e non dai granuli di neurosecrezione.

**La sinapsina I e la sinaptofisina migrano con organelli più leggeri dei granuli di neurosecrezione durante frazionamento cellulare su gradiente**

Abbiamo verificato l'associazione selettiva della sinapsina I e della sinaptofisina con le MVS e non con i granuli di neurosecrezione della neuroipofisi anche con esperimenti biochimici di frazionamento cellulare su un omogenato di ipofisi posteriore: una frazione arricchita di granuli di neurosecrezione [12] è stata sottoposta a centrifugazione su un gradiente continuo di saccarosio e le diverse frazioni del gradiente sono state analizzate per il loro contenuto di sinapsina I, di sinaptofisina e di un peptide marcatore dei granuli di neurosecrezione mediante immu-

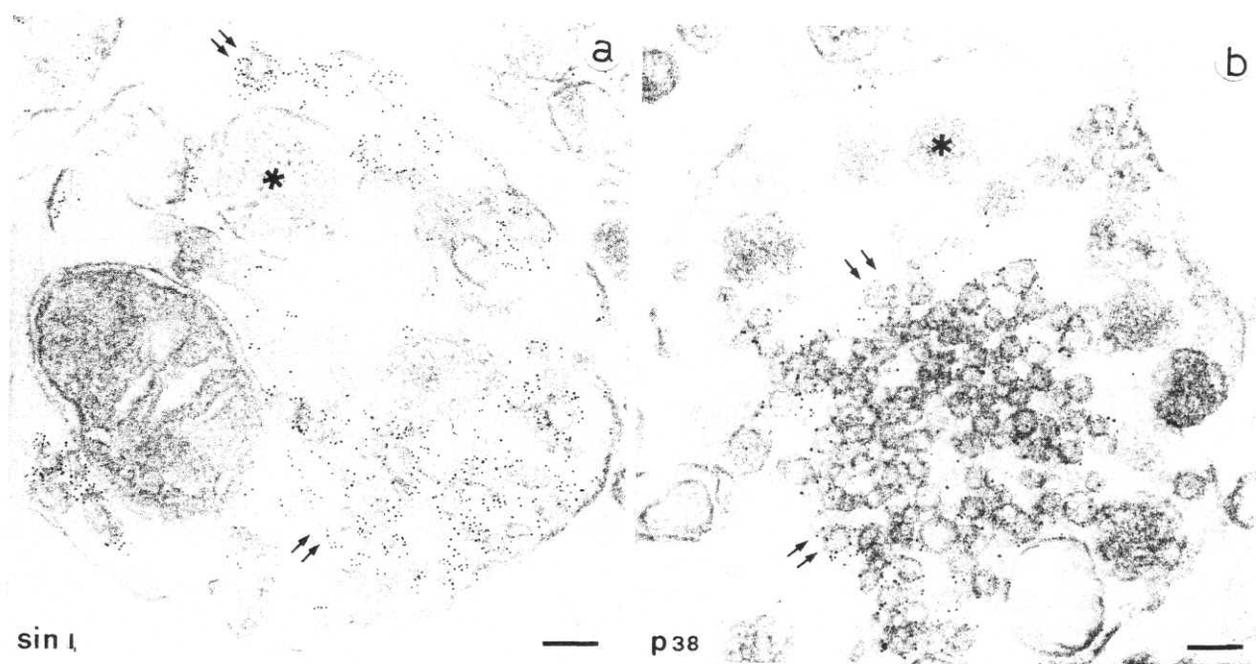


Fig. 1. - Associazione selettiva della sinapsina I (1a) e della sinaptofisina (1b) con le MVS di neurosecretosomi inclusi in agarosio [11] ed immunocolorati con la tecnica della proteina A-oro colloidale [6]. I granuli di neurosecrezione (asterischi) hanno perso la loro integrità a causa delle condizioni di fissazione impiegate. Le particelle di oro colloidale sono concentrate selettivamente sulla superficie citoplasmatica delle MVS (paia di piccole frecce), mentre il profilo dei granuli di neurosecrezione (asterischi) appare privo di marcatura. Da F. Navone e P. De Camilli. Barre = 100 nm.

nocolorazione con anticorpi specifici (*immunoblot*) dopo separazione elettroforetica delle proteine su gel di poliaccrilamide contenente SDS (SDS-PAGE) e loro trasferimento su nitrocellulosa. Quale peptide marcatore dei granuli di neurosecrezione abbiamo usato la secretogranina II, una proteina dalla funzione ancora ignota che viene immagazzinata insieme con gli ormoni peptidici nei granuli secretori di un grande numero di neuroni e di cellule endocrine [13]. Le diverse frazioni ottenute dal gradiente sono state anche analizzate al microscopio elettronico [14].

La Fig. 2a mostra due *immunoblots* delle varie frazioni del gradiente colorati per la secretogranina II e per la p38. La secretogranina II è arricchita nelle frazioni più pesanti del gradiente che, al microscopio elettronico, appaiono contenere quasi esclusivamente granuli di neurosecrezione (Fig. 2b). La p38 nel gradiente di saccarosio ha un picco in corrispondenza di frazioni a densità più leggera, ben segregato dal picco del peptide marcatore dei granuli di neurosecrezione. Il contenuto della sinapsina I nel gradiente (dati non mostrati) raggiunge un massimo in corrispondenza di frazioni a densità un po' più pesante rispetto al picco della p38 per poi declinare e raggiungere livelli molto bassi nelle frazioni arricchite di secretogranina II. Noi ipotizziamo che l'immunoreattività per la sinapsina I presente in frazioni del gradiente diverse da quelle contenenti la p38 possa essere interpretata come un fenomeno di ridistribuzione di questa proteina occorso durante l'omogenizzazione e la centrifugazione.

Questi dati biochimici confermano le nostre osservazioni morfologiche e indicano che la sinapsina I e la sinaptofisina sono presenti ad elevata concentrazione sulle membrane delle MVS della neuroipofisi, mentre non sono presenti in concentrazioni rilevanti sulla membrana dei granuli di neurosecrezione. Pertanto le MVS dell'ipofisi posteriore sono organelli biochimicamente correlati alle SSV di tutti gli altri terminali assonali ed è possibile che esse abbiano un'origine almeno parzialmente indipendente dai granuli di neurosecrezione. Una funzione secretoria per le MVS della neuroipofisi non può ancora essere affermata con certezza. Tuttavia la loro somiglianza morfologica e biochimica con le SSV, insieme con la dimostrazione che esse sono in grado di incorporare un tracciante extracellulare in seguito a stimolazione dei terminali della neuroipofisi [15] suggerisce fortemente che queste piccole vescicole siano organelli secretivi in grado di andare incontro ad un processo di esocitosi regolata. La presenza di piccole vescicole biochimicamente e funzionalmente correlate alle SSV nei terminali nervosi della neuroipofisi suggerisce infine che la via secretiva regolata che coinvolge le SSV sia presente anche in quei neuroni che sono sempre stati considerati esclusivamen-

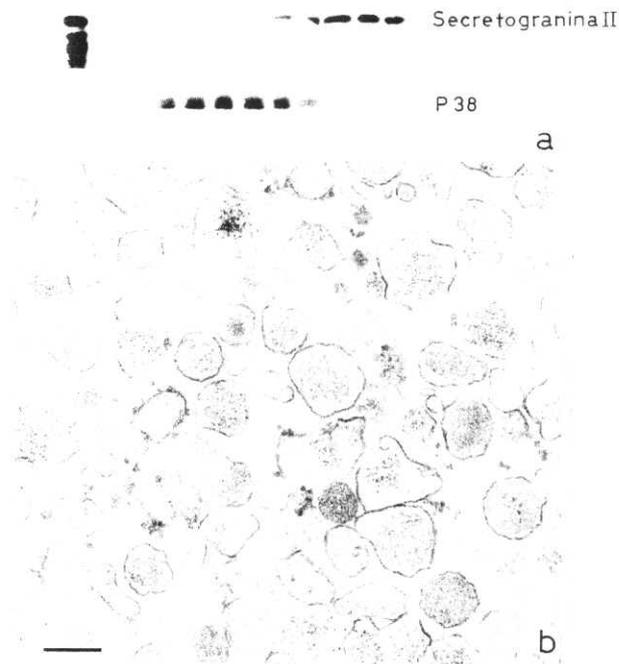


Fig. 2. - *Immunoblot* (2a) illustrante la distribuzione della secretogranina II e della p38 in un gradiente lineare di saccarosio su cui è stata caricata una frazione subcellulare di ipofisi posteriore arricchita di granuli di neurosecrezione [12]. La molarità del gradiente di saccarosio va da 0,5 a 1,8 (da sinistra a destra nella Fig.). Quantità uguali delle frazioni raccolte dal gradiente sono state sottoposte a SDS-PAGE, trasferite su nitrocellulosa ed immunocolorate per la secretogranina II e per la p38 (Navone *et al.*, manoscritto in preparazione). I picchi di immunoreattività per la secretogranina II e per la p38 non coincidono. Il picco della secretogranina II è a livello di frazioni la cui densità corrisponde alla densità di equilibrio dei granuli di neurosecrezione e la cui morfologia al microscopio elettronico è mostrata in Fig. 2b. Barra = 200 nm. Fotografia riprodotta da *Molecular mechanisms in secretion*, 1988. N. Thorn, M. Treiman, O.H. Petersen & J.H. Thaysen (Eds). Con il permesso di Munksgaard Publ. Ltd., Copenhagen.

te peptidergici e rafforza l'ipotesi che la coesistenza di due distinte vie secretive regolate sia un fenomeno generale a tutti i terminali nervosi [8].

#### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il Prof. P. De Camilli (Università di Milano), con il Dr. R. Jahn (Max Planck Institute, Monaco di Baviera) e con il Dr. P. Greengard (The Rockefeller University, New York).

Ricevuto il 4 marzo 1988.

Accettato il 7 aprile 1988.

#### BIBLIOGRAFIA

- LUNDBERG, J.M. & HOKFELT, T. 1983. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends NeuroSci.* 6: 325-333.
- KLEIN, R.L., LAGERCRANTZ, H. & ZIMMERMANN, H. (Eds). 1985. *Neurotransmitter vesicles*. Academic Press, New York. pp. 1-384.

3. REICHARDT, L.F. & KELLY, R.B. 1983. A molecular description of nerve terminal function. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 871-926.
4. BROWNSTEIN, M.J., RUSSEL, J.T. & GAINER, H. 1980. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* **207**: 373-378.
5. NAVONE, F., GREENGARD, P. & DE CAMILLI, P. 1984. Synapsin I in nerve terminals: selective association with small synaptic vesicles. *Science* **226**: 1209-1211.
6. NAVONE, F., JAHN, R., DI GIOIA, G., STUKENBROK, H., GREENGARD, P. & DE CAMILLI, P. 1986. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* **103**: 2511-2527.
7. LOWE, A.W., MADEDDU, L. & KELLY, R.B. 1988. Endocrine secretory granules and neuronal synaptic vesicles have three integral membrane proteins in common. *J. Cell Biol.* **106**: 51-59.
8. DE CAMILLI, P. & NAVONE, F. 1987. Regulated secretory pathways of neurons and their relation to the regulated secretory pathway of endocrine cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **493**: 461-479.
9. DOUGLAS, W.W., NAGASAWA, J. & SCHULZ, R. 1971. Electron microscopic studies on the mechanism of secretion of posterior pituitary hormones and significance of microvesicles ("synaptic vesicles"): evidence of secretion by exocytosis and formation of microvesicles as a by-product of this process. *Mem. Soc. Endocrinol.* **19**: 353-378.
10. MORRIS, J.F. & NORDMANN, J.J. 1980. Membrane recapture after hormone release from nerve endings in the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroscience* **5**: 639-649.
11. DE CAMILLI, P., HARRIS, S.M. Jr., HUTTNER, W.B. & GREENGARD, P. 1983. Synapsin I (protein I) a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J. Cell Biol.* **96**: 1355-1373.
12. RUSSEL, J.T. 1981. The isolation of purified neurosecretory vesicles from bovine neurohypophysis using isoosmolar density gradients. *Anal. Biochem.* **113**: 229-238.
13. ROSA, P., HILLE, A., LEE, R.V.H., ZANINI, A., DE CAMILLI, P. & HUTTNER, W.B. 1985. Secretogranins I and II: two tyrosine sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. *J. Cell Biol.* **101**: 1999-2011.
14. HUTTNER, W.B., SCHIEBLER, W., GREENGARD, P. & DE CAMILLI, P. 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* **96**: 1374-1388.
15. NAGASAWA, J., DOUGLAS, W.W. & SCHULZ, R.A. 1971. Micropinocytotic origin of coated and smooth microvesicles ("synaptic vesicles") in neurosecretory terminals of posterior pituitary glands demonstrated by incorporation of horseradish peroxidase. *Nature* **232**: 341-342.