

УЧАСТИЕ ФЕРМЕНТА ГЛИКОГЕН-СИНТАЗЫ КИНАЗЫ-3 И ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Ca^{2+} -КАНАЛОВ В ВЕЗИКУЛЯРНОМ ЦИКЛЕ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРА В ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2025 г. Л. Ф. Нуруллин^{1,2,*}, Д. А. Пешехонов², Е. М. Волков^{2,**}

¹Казанский институт биохимии и биофизики — структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр” Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

* e-mail: lenizn@yandex.ru

** e-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 07.02.2025 г.

После доработки 26.03.2025 г.

Принята к публикации 06.04.2025 г.

Методами флуоресцентной конфокальной микроскопии изучали влияние специфических блокаторов (ω -коноксина GVIA, ω -агадоксина IVA, нитрендипина, SNX-482, мибефрадила) потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N, P/Q, L, R, T-типов, а также ингибитора фермента гликоген-синтазы киназы-3 GSK3 (1-азакенпауллон) на процессы экзо-эндозезикулярного цикла в холинергических нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. В механизмах везикулярного цикла участвуют ионы Ca^{2+} , входящие в терминали через все типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов пресинаптической мембраны. При этом наибольший вклад в процессы эндоцитоза вносят Ca^{2+} -каналы N-, P/Q- и L-типов, тогда как экзоцитоза только каналы N- и P/Q-типов. В процессах рециклинга существенную роль играет динамин-зависимый эндоцитоз, а восстановление везикулярных пулов в таких синапсах преимущественно происходит при участии клатрин-зависимого эндоцитоза. Можно считать, что базисные механизмы регуляции везикулярного цикла в двигательных нервно-мышечных синапсах являются общими для всего филогенетического древа позвоночных и беспозвоночных животных, начиная с аннелид. При этом значение отдельных регулирующих элементов машины везикулярной секреции у аннелид имеет свою отчетливую специфику.

Ключевые слова: потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, динамин, экзоцитоз, эндоцитоз, синаптические везикулы, нервно-мышечное соединение, двигательная мускулатура, аннелиды

DOI: 10.31857/S0044452925020059, **EDN:** IFDCJD

ВВЕДЕНИЕ

Деполаризация мембраны двигательных нервных окончаний вызывает открытие потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, что, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и запускает процесс экзоцитоза везикул с медиатором в синаптическую щель [1]. Следующий за экзоцитозом компенсаторный эндоцитоз восстанавливает запасы синаптических везикул. Известно несколько типов эндоцитоза: клатрин-опосредованный эндоцитоз (медленный), зависимый от функциональной активности объемный (bulk) эндоцитоз (быстрый), клатрин-независимый эндоцитоз (быстрый), эндофин-опосредованный эндо-

цитоз (быстрый), “kiss-and-run” и ультрабыстрый эндоцитоз [2, 3]. Белки динамины при гидролизе ГТФ усиливают клатрин-опосредованный эндоцитоз и зависимый от функциональной зависимости объемный (bulk) эндоцитоз [4]. Активность самих динаминов будет регулироваться фосфорилированием их ферментом гликоген-синтазой киназой-3 (GSK3) [5]. Показано, что потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы на пресинаптической мембране обеспечивают приток Ca^{2+} для запуска быстрого и медленного эндоцитозов и, таким образом, связывают процессы эндоцитоза с экзоцитозом [6].

Аннелиды первые в филогенетическом ряду приобрели соматическую мускулатуру и двигатель-

ную иннервацию [7, 8]. Структурная организация нервно-мышечных синапсов дождевого червя в виде “гроздьев винограда” [9] отличается от классических нервных терминалей в мышцах у представителей высших классов позвоночных животных. Однако секрецию медиатора в синапсах осуществляет универсальная машина везикулярного цикла. Важные аспекты регуляции этого процесса у аннелид остаются неизвестными. Последнее не позволяет создать представление о том, с какого этапа эволюционного развития окончательно сформировались консервативные механизмы регуляции секреции медиатора. Известно, что ключевую роль в этих процессах играют Ca^{2+} -каналы и Ca^{2+} -акцепторные структуры [1]. Ранее нами было установлено наличие в нервно-мышечном соединении аннелид потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N, P/Q, L, R, T-типов [10]. Остается неясным вклад каждого типа Ca^{2+} -канала в механизмы регуляции кругооборота везикул в двигательных нервных окончаниях эволюционно-первичной соматической мускулатуры аннелид. Также неизученным является участие белков динаминов в процессах экзо-эндоцитоза везикул в данных нервно-мышечных контактах. В этой связи целью настоящей работы стало изучение влияния специфических блокаторов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N, P/Q, L, R, T-типов, а также ингибитора внутриклеточного фермента GSK3 на процессы рециклинга везикул в нервно-мышечном соединении соматической мускулатуры дождевого червя.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления препарата дождевого червя *Lumbricus terrestris* разрезался сбоку по всей длине, отрезались головной и хвостовой концы, раскрывался, удалялись внутренние органы и перегородки между сегментами [11, 12]. Далее фрагменты кожно-мышечного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали нормальным физиологическим раствором Древесы–Пакса около 30 мин при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Состав раствора в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Всего в экспериментах было использовано 63 препарата дождевого червя.

Фрагменты кожно-мышечного мешка дождевого червя окрашивались липофильным флуоресцентным маркером FM2-10 (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 22 мкМ. “Загрузка” маркером FM2-10 двигательных нервных терминалей проводилась в течение 3 мин в модифицированном физиологическом растворе с высоким содержанием ионов K^+ (40 мМ, гиперкалиевый раствор) после предварительной 5 мин инкубации с красителем

FM2-10 в нормальном физиологическом растворе. В гиперкалиевом растворе происходит деполяризация мембраны нервных окончаний, что приводит к увеличению частоты спонтанной секреции нейромедиатора и усилению экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул. Состав гиперкалиевого раствора в мМ: 41 NaCl, 40 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. В целях уменьшения фонового свечения после “загрузки” красителя препарат отмывали 3 раза по 10 мин в течение 30 мин в нормальном растворе при $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Микроскопическое исследование препаратов проводилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с использованием водно-иммерсионного объектива $20\times/1.0 \text{ NA}$. Для возбуждения эмиссии красителя FM2-10 применялся Ar-лазер. Длина волны возбуждения красителя составляла 488 нм, максимум длины волны эмиссии 610 нм. На изображениях, полученных при помощи микроскопа, в программе ImageJ (NIH, США; веб-сайт программы <https://imagej.net/ij/>) анализировалась флуоресценция двигательных нервных окончаний. Поскольку наши измерения зависели от индивидуальных характеристик регистрирующей аппаратуры, за единицу измерения интенсивности флуоресценции были приняты относительные единицы (а. у.).

Статистическая обработка значений флуоресценции в контроле и после действия блокаторов проводилась в программе Excel 2016 (Microsoft Corporation, США; веб-сайт программы <https://www.microsoft.com/ru-ru>). Сравнение выборочных совокупностей проводили при помощи независимого t-критерия Стьюдента при уровне значимости 0.05. Результаты обработки значений флуоресценции приведены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm \text{SEM}$).

Для ингибирования фермента GSK3 использовали реактив 1-азакенпауллон (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкМ. Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы ингибировали высокоаффинными блокаторами: ω -конотоксин GVIA (концентрация 1 мкМ, Alomone Labs, Израиль), ω -агатоксин IVA (40 нМ, Alomone Labs), нитрендипин (5 мкМ, Sigma-Aldrich), SNX-482 (50 нМ, Sigma-Aldrich), мибэфрадил (10 мкМ, Sigma-Aldrich). Поскольку вещества 1-азакенпауллон и нитрендипин имеют плохую растворимость в воде, мы делали промежуточный раствор, содержащий органический растворитель диметилсульфоксид (DMSO, Sigma-Aldrich), в котором растворяли вещество. Далее из промежуточного раствора вещество добавлялось в нужной концентрации в физиологический раствор. Для оценки влияния DMSO на изучаемые процессы проводили контрольные эксперименты в присутствии и отсутствии DMSO.

В экспериментах по изучению процессов эндоцитоза везикул в двигательных нервных окончаниях препараты фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя сначала инкубировали в присутствии блокаторов, затем окрашивали FM2-10 в гиперкалиевом растворе, отмывали в нормальном растворе и проводили исследование на микроскопе.

В опытах по исследованию процессов экзоцитоза везикул в нервных терминалях мышечные препараты дождевого червя сперва окрашивали FM2-10 в гиперкалиевом растворе, отмывали в нормальном растворе, после чего стимулировали в гиперкалиевом растворе и регистрировали флуоресценцию при помощи микроскопа на 0, 3 и 5 минутах “разгрузки” в контроле и после действия веществ.

В отдельной серии экспериментов проверяли выгорание красителя FM2-10. Для этого в нормальном растворе (при 4 мМ K^+) регистрировали значения флуоресценции на 0, 3 и 5 минутах. Средние значения флуоресценции достоверно не отличались друг от друга. Это говорит о том, что в наших условиях эксперимента выгорание красителя не наблюдалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация мышечного препарата в гиперкалиевом растворе с флуоресцентным красителем FM2-10 приводило к появлению светящихся пятен овальной формы, являющиеся скоплениями нервно-мышечных контактов, в которых произошел захват липофильного маркера в результате процессов экзо-эндоцитоза везикул (рис. 1) [9, 13].

Анализ флуоресцентных изображений синаптических контактов, загруженных красителем FM2-10, показал, что уровень флуоресценции составлял в контроле 155.9 ± 6.9 относительных единиц (о. е.) ($n = 98$) (рис. 2), а в присутствии 50 мкМ DMSO 115.5 ± 22.1 о. е. ($n = 77$) (рис. 2). Эти значения достоверно не отличались друг от друга ($p > 0.05$). Таким образом, присутствие в растворе DMSO не имело существенного влияния на процессы эндоцитоза плазматических мембран в двигательных нервных окончаниях дождевого червя.

Инкубация нервно-мышечного препарата в растворе в присутствии ингибитора GSK3 — 1-азакенпауллона в концентрации 2 мкМ в течение 15 мин приводило к достоверному уменьшению на 39% средней величины флуоресценции загруженных красителем FM2-10 синапсов по сравнению с контролем и составило 95.6 ± 6.1 о. е. ($n = 101$; $p < 0.01$) (рис. 2). Таким образом, можно думать, что ингибирование фермента GSK3 тормозит процессы эндоцитоза везикул в двигательных нервных терминалях дождевого червя. Можно предполагать, что ингибирование фосфорилирования белков динаминов угнетает процессы эндоцитоза везикул в нервно-мышечных синапсах соматической мускулатуры аннелид.

Инкубация окрашенных маркером FM2-10 мышечных препаратов в течение 3–5 мин в гиперкалиевом растворе приводила к “разгрузке” красителя из нервных терминалей (рис. 3). В контрольных экспериментах на 3 и 5 минуте происходило снижение значений флуоресценции от начального уровня на 20% и 36%, соответственно (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции были: 0 мин — 110.6 ± 3.4 о. е. ($n = 89$), 3 мин — 88.3 ± 2.6 о. е.

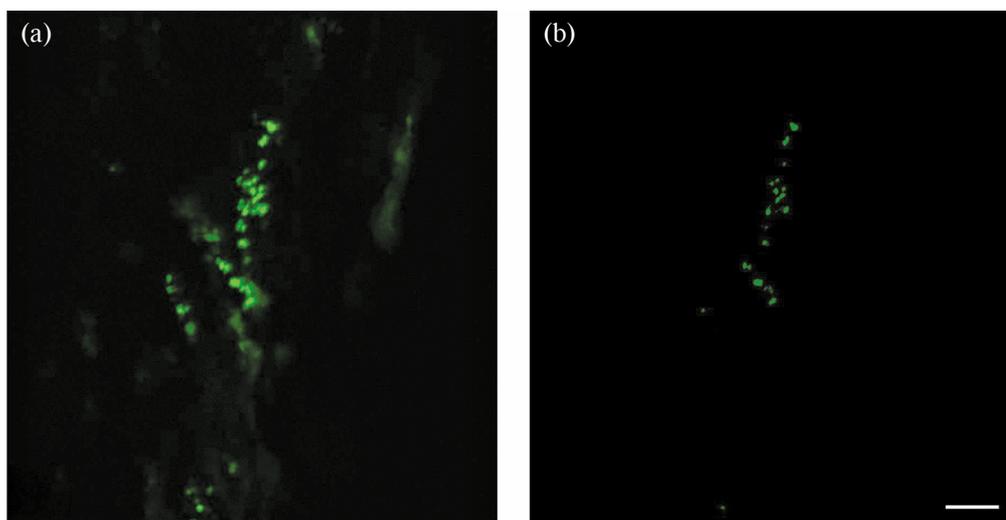


Рис. 1. Флуоресценция нервно-мышечных синапсов соматических мышечных клеток дождевого червя, загруженных липофильным красителем FM2-10: (a) — 0 мин, (b) — через 5 мин “разгрузки” красителя при 40 мМ K^+ в окружающем растворе. Масштабная линейка: 20 мкм.

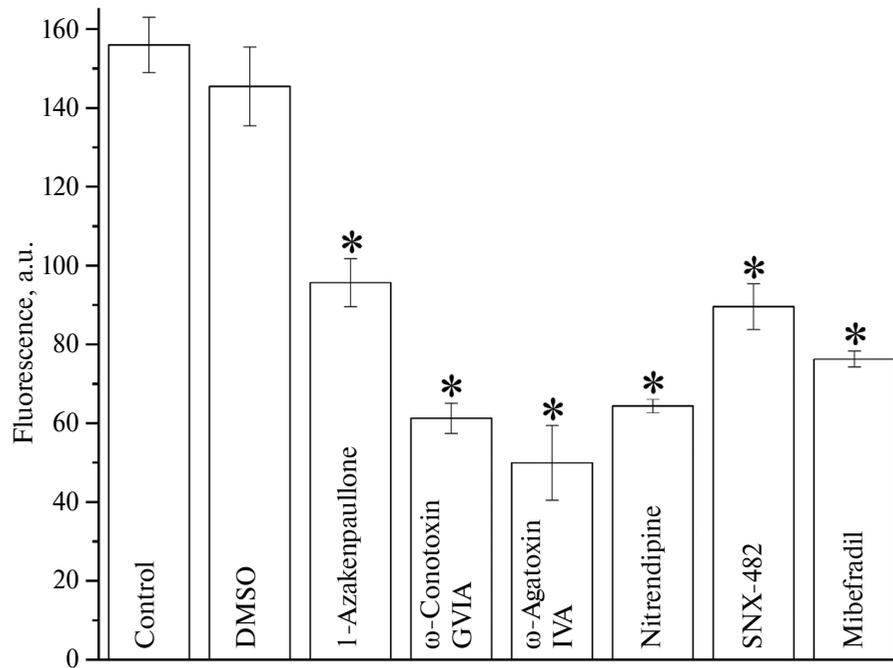


Рис. 2. Влияние DMSO, ингибитора фермента GSK3 — 1-азакенпауллона, ингибиторов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов — ω -конотоксина GVIA, ω -агатоксина IVA, нитрендипина, SNX-482, мибефрадила на “загрузку” липофильным красителем FM2-10 двигательных нервных терминалей препарата соматической мускулатуры дождевого червя. а. у. — относительные единицы.

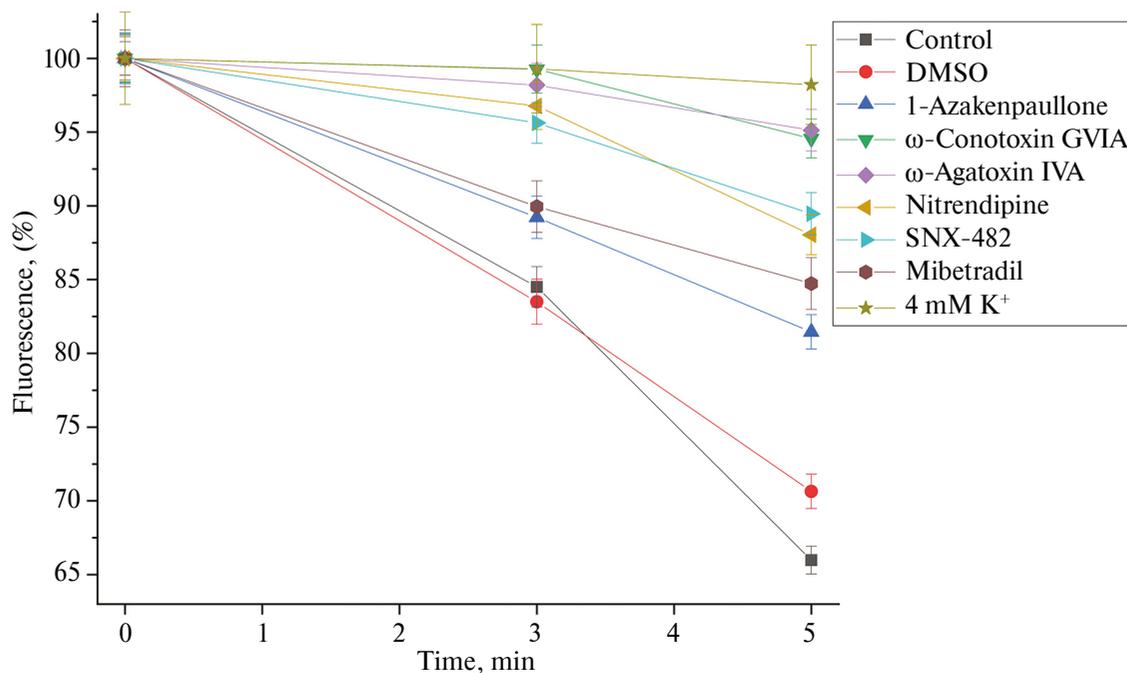


Рис. 3. Влияние DMSO, ингибитора фермента GSK3 — 1-азакенпауллона, ингибиторов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов — ω -конотоксина GVIA, ω -агатоксина IVA, нитрендипина, SNX-482, мибефрадила на “разгрузку” двигательных нервных терминалей препарата соматической мускулатуры дождевого червя, окрашенных флуоресцентным красителем FM2-10. В отдельной серии экспериментов контролировалось выгорание красителя FM2-10 в нормальном растворе (4 mM K^+) в течении 5 мин.

($n = 107$), 5 мин — 70.5 ± 2.9 о. е. ($n = 96$). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$).

В присутствии DMSO в гиперкалиевом растворе также происходила “разгрузка” красителя из двигательных нервных терминалей. Значения

флуоресценции на 3 и 5 минуте снизились на 19% и 31%, соответственно (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: 0 мин — 102.9 ± 2.3 о. е. ($n = 93$), 3 мин — 83.4 ± 2.3 о. е. ($n = 97$), 5 мин — 70.8 ± 2.4 о. е. ($n = 106$). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$). При этом достоверных отличий между кривыми “разгрузки” в контроле и DMSO выявлено не было ($p > 0.05$).

В присутствии специфического блокатора 1-азакенпауллона динамика “разгрузки” FM2-10 замедлялась, значения флуоресценции уменьшались на 3 минуте на 10–12%, на 5 минуте на 17–19% от начального уровня (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции: 0 мин — 72.7 ± 1.7 о. е. ($n = 93$), 3 мин — 64.8 ± 1.4 о. е. ($n = 114$), 5 мин — 59.2 ± 1.2 о. е. ($n = 91$). Таким образом, ингибирование фермента GSK3 блокатором 1-азакенпауллоном тормозит “выгрузку” красителя FM2-10 из двигательных нервных окончаний. Скорее всего, такое замедление кругооборота синаптических везикул связано с торможением компенсаторного эндоцитоза плазматической мембраны, возникающего после экзоцитоза везикул. Вполне возможно, что в механизмах эндоцитоза мембран в синапсах соматической мускулатуры дождевого червя принимают участие клатрин-опосредованный эндоцитоз и зависимый от функциональной активности объемный (bulk) эндоцитоз. Эти виды эндоцитоза регулируются внутриклеточными ГТФазами динамически [4], активность последних зависит от фермента GSK3 [5]. Таким образом, можно думать, что в процессы кругооборота везикул в нервно-мышечном соединении эволюционно-первичной соматической мускулатуры аннелид вносит определенный вклад динамин-зависимый эндоцитоз везикул.

В наших экспериментах окрашивание в гиперкалиевом растворе мышечного препарата FM2-10 в присутствии блокатора N-типа Ca^{2+} -каналов ω -конотоксина GVIA (1 мкМ) вызывало достоверное уменьшение на 61% средней величины флуоресценции по сравнению с контролем и составило 61.2 ± 3.8 о. е. ($n = 94$; $p < 0.01$) (рис. 2). Применение блокатора P/Q-типа Ca^{2+} -каналов ω -агатоксина IVA (40 нМ) уменьшало среднюю величину флуоресценции на 68% по сравнению с контролем и было 49.9 ± 9.5 о. е. ($n = 92$; $p < 0.01$) (рис. 2). Блокатор L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипин (5 мкМ) снижал флуоресценцию терминалей на 59% по сравнению с контролем, что составило 64.3 ± 1.7 о. е. ($n = 84$; $p < 0.01$) (рис. 2). Блокатор R-типа Ca^{2+} -каналов SNX-482 (50 нМ) уменьшал среднее значение флуоресценции синапсов на 43% по сравнению с контролем и было 89.6 ± 5.8 о. е. ($n = 103$; $p < 0.01$) (рис. 2). Блокатор T-типа Ca^{2+} -каналов мибефрадил (10 мкМ) вызывал снижение средней

величины флуоресценции терминалей на 54% по сравнению с контролем и составило 76.3 ± 1.9 о. е. ($n = 99$; $p < 0.01$) (рис. 2). Таким образом, наши эксперименты показали, что блокаторы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов снижают интенсивность эндоцитоза везикул в нервных терминалях соматической мускулатуры. Однако наибольшее влияние на процессы эндоцитоза синаптических везикул оказывали блокаторы N-, P/Q-, L-типов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Можно сделать вывод, что в процессах эндоцитоза везикул в нервно-мышечном соединении дождевого червя принимают участие ионы Ca^{2+} , входящие через все типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, при этом самый большой вклад в эти процессы вносят Ca^{2+} -каналы N-, P/Q- и L-типов.

В следующей серии экспериментов изучались процессы экзоцитоза везикул в двигательных нервных терминалях. Для этого нервно-мышечные препараты дождевого червя окрашивали FM2-10 в гиперкалиевом растворе, отмывали в течение 30 мин в нормальном растворе, а затем инкубировали с блокаторами потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и разгружали в гиперкалиевом растворе в присутствии блокаторов. В контрольных экспериментах на 3 и 5 минуте происходило снижение значений флуоресценции на ~20% и ~30%, соответственно (рис. 3). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$). То же самое наблюдалось и в экспериментах с DMSO. При этом достоверных отличий между контролем и DMSO выявлено не было. В присутствии специфических блокаторов Ca^{2+} -каналов ω -конотоксина GVIA (1 мкМ) или ω -агатоксина IVA (40 нМ) динамика “разгрузки” красителя FM2-10 из синапсов незначительно замедлялась, значения флуоресценции уменьшались на 3 минуте на ~2%, на 5 минуте на ~5% от начального уровня (рис. 3). Применение нитрендипина (5 мкМ) или SNX-482 (50 нМ) тормозило “разгрузку” FM2-10 из синапсов, значения светимости уменьшались на 3 минуте на ~4%, на 5 минуте на ~12% от начального уровня (рис. 3). Блокатор мибефрадил (10 мкМ) также замедлял выгрузку красителя FM2-10 из терминалей, величины флуоресценции уменьшались на 3 минуте на ~10%, на 5 минуте на ~15% от начального уровня (рис. 3). При этом средние значения светимости на 3 и 5 минутах для всех блокаторов достоверно отличались от таковых в контроле и DMSO (рис. 3) ($p < 0.05$). Таким образом, ингибирование потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов специфическими блокаторами приводит к торможению “разгрузки” маркера FM2-10 из двигательных нервных терминалей. Можно думать, что в процессах экзо-эндоцитоза везикул в нервных окончаниях соматической мускулатуры аннелид принимают участие все типы

потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. При этом значительное влияние на процессы эндоцитоза синаптических везикул оказывали блокаторы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N-, P/Q- и L-типов, тогда как на процессы экзоцитоза только блокаторы Ca^{2+} -каналов N- и P/Q-типов. Следовательно, можно сказать, что в кальциевых механизмах регуляции везикулярного цикла в холинергических синапсах соматической мускулатуры аннелид наибольшую роль играют ионы Ca^{2+} , входящие через N-, P/Q- и L-типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов.

Близость расположения к сайтам освобождения везикул пресинаптических потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов является чрезвычайно важным фактором, определяющим их роль в синаптической трансмиссии [14]. В центральных нейронах млекопитающих участие в секреции медиатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов опосредовано их взаимодействием с особыми белками на пресинаптической мембране. Ca^{2+} -каналы P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) и N ($\text{Ca}_v2.2$) типов рекрутируются в активную зону белком RIM [15]. Однако Ca^{2+} -канал P/Q-типа избирательно ассоциирован с определенными изоформами белка Munc13, что приводит к тому, что канал P/Q-типа ближе располагается к докированным везикулам, чем канал N-типа [16]. Также большую роль в секреции медиатора будет играть распределение Ca^{2+} -каналов на пресинаптической мембране. На нейронах гиппокампа с помощью блокаторов показали, что пресинаптический ток Ca^{2+} в разной степени зависит от каналов P/Q (~66%), N (~26%) и R (~8%) типов. Это позволило авторам оценить плотность распределения этих каналов на пресинаптической мембране [17]. В активных зонах нервно-мышечных синапсов *Drosophila melanogaster* имеются две отличающиеся по функциям популяции потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Первые — Cav1-каналы (гомолог L-типа) регулируют краткосрочную пластичность и скорость рециклинга везикул. Вторые — Cav2-каналы (гомолог P/Q-типа) запускают освобождение медиатора. Такое функциональное различие обусловлено взаимодействием каналов с Ca^{2+} -АТФазой плазматической мембраны [18]. В нервно-мышечных контактах *Caenorhabditis elegans* два разных класса потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, Cav2 и Cav1, опосредуют освобождение синаптических везикул из различных пулов. Каналы Cav2 сосредоточены в плотно упакованных кластерах с белками активной зоны нейрексином, α -липрином, SYDE, ELKS/CAST, RIM-VP, α -катулином и MAG11. Каналы Cav2 колокализированы с праймирующим белком UNC-13L. Напротив, каналы Cav1 рассредоточены в нервном окончании и колокализированы с UNC-13S. [19]. Полученные нами экспериментальные данные позволяют полагать, что

различный вклад N-, P/Q- и L-типов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в регуляцию везикулярного цикла в холинергических синапсах соматической мускулатуры аннелид может быть обусловлен локализацией и распределением каналов в активных зонах, а также взаимодействием данных каналов с ключевыми пресинаптическими белками.

Белок динамин является ферментом ГТФазой [20], катализирующим отделение везикулы от мембраны во время эндоцитоза [21]. Этот энзим довольно консервативен и встречается у многих видов живых существ — от бактерий до человека [22]. Геном млекопитающих содержит три гена динамина [23]. Динамин 1 избирательно и высоко экспрессируется в нейронах и обычно не присутствует в не нейрональных тканях [24]. Динамин 2 представлен во всех тканях [25]. Динамин 3 экспрессируется преимущественно в мозге и семенниках [26]. Беспозвоночные, такие как *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*, обладают только одним геном динамина [27, 28]. В синаптических контактах млекопитающих белок динамин выполняет существенную роль во всех формах компенсаторного эндоцитоза, включая механизм “kiss-and-run”, непосредственно регулирует размер синаптических везикул и участвует в их рециклинге [29–32]. В нервно-мышечных контактах *Drosophila melanogaster* с мутацией *shibire* полная инактивация динамина блокирует везикулярный цикл и приводит к образованию огромных связанных с мембраной цистерн [33]. У нематоды *Caenorhabditis elegans* мутация в гене динамина вызывает быстрый и обратимый локомоторный дефицит при изменении температуры [28], указывая на ключевую роль белка динамина в нервно-мышечной трансмиссии. В нервно-мышечном соединении лягушки *Rana pipiens* ингибирование динамина динасором увеличивает вероятность освобождения везикул с медиатором [34]. Результаты наших экспериментов, впервые показывают наличие в механизмах везикулярного цикла холинергических синапсов аннелид динамин-зависимого эндоцитоза, имеющего исключительное значение для нервно-мышечной передачи. Можно предполагать, что восстановление везикулярных пулов в таких синапсах в основном происходит при участии клатрин-зависимого эндоцитоза, при этом не исключено наличие механизма “kiss-and-run” экзо-эндоцитоза.

Подводя итог анализу данных, полученных в наших экспериментах на холинергических нервно-мышечных синапсах эволюционно-первичной соматической мускулатуре аннелид на примере дождевого червя, можно прийти к следующему заключению. В механизмах экзо-эндовезикулярного цикла участвуют ионы Ca^{2+} , входящие в терминаль через все типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -кана-

лов. При этом наибольший вклад в процессы эндоцитоза вносят Ca^{2+} -каналы N-, P/Q- и L-типов, тогда как экзоцитоза только каналы N- и P/Q-типов. В данных процессах существенную роль играет динамин-зависимый эндоцитоз, а восстановление везикулярных пулов в таких синапсах преимущественно происходит при участии клатрин-зависимого эндоцитоза. Таким образом, основываясь на анализе данных литературы и полученных нами результатах, можно считать, что базисные механизмы регуляции везикулярного цикла в двигательных нервно-мышечных синапсах являются общими для всего филогенетического древа позвоночных и беспозвоночных животных, начиная как минимум с аннелид, обладающих управляемой двигательной активностью. Это, конечно, не исключает наличие частных особенностей для отдельных типов и классов животных. Так, для аннелид значение отдельных регулирующих элементов машины везикулярной секреции, как мы это показали, имеет свою отчетливую специфику. В то же время есть все основания считать, что генные ансамбли, отвечающие за экспрессию пептидов, формирующих белковые структуры (ионные каналы, Ca^{2+} -акцепторные белки), обеспечивающие основные механизмы секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах, сформировались на самых ранних этапах эволюционного развития животных, имеющих соматическую мускулатуру, и чрезвычайно консервативны. Проведение сравнительного анализа общих черт и различий в организации везикулярного кругооборота в моторных синапсах дождевого червя и других таксонов в настоящее время невозможно из-за ограниченного объема экспериментального материала, что предполагает дополнительные исследования.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.Ф.Н. и Е.М.В.), сбор данных (Л.Ф.Н.), обработка данных (Л.Ф.Н., Д.А.П.), написание и редактирование манускрипта (Л.Ф.Н., Е.М.В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан» (Соглашение №76/2024-ПД от 16.12.2024 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использо-

вания животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол №23/5 от 12.05.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Südhof TC* (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011353. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353>
2. *Watanabe S, Boucrot E* (2017) Fast and ultrafast endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 47: 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.013>
3. *Gan Q, Watanabe S* (2018) Synaptic vesicle endocytosis in different model systems. *Front Cell Neurosci* 12: 171. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00171>
4. *Prichard KL, O'Brien NS, Murcia SR, Baker JR, McCluskey A* (2022) Role of clathrin and dynamin in clathrin mediated endocytosis/synaptic vesicle recycling and implications in neurological diseases. *Front Cell Neurosci* 15: 754110. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.754110>
5. *Clayton EL, Sue N, Smillie KJ, O'Leary T, Bache N, Cheung G, Cole AR, Wyllie DJ, Sutherland C, Robinson PJ, Cousin MA* (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci* 13: 845–851. <https://doi.org/10.1038/nn.2571>
6. *Xue L, Zhang Z, McNeil BD, Luo F, Wu XS, Sheng J, Shin W, Wu LG* (2012) Voltage-dependent calcium channels at the plasma membrane, but not vesicular channels, couple exocytosis to endocytosis. *Cell Rep* 1: 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.011>
7. *Parry L, Tanner A, Vinther J* (2014) The origin of annelids. *Front Palaeontology* 57: 1091–1103. <https://doi.org/10.1111/pala.12129>
8. *Purschke G, Müller MCM* (2006) Evolution of body wall musculature. *Integr Comp Biol* 46: 497–507. <https://doi.org/10.1093/icb/icj053>
9. *Nurullin LF, Almazov ND, Volkov EM* (2024) Calcium-binding proteins in synaptic vesicle exo- and endocytosis in somatic motor nerve endings of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *J Evol Biochem Phys* 60: 1818–1825. <https://doi.org/10.1134/S0022093024050144>
10. *Nurullin LF, Volkov EM* (2020) Immunofluorescent identification of $\alpha 1$ isoform subunits of voltage-gated Ca^{2+} -channels of CaV1, CaV2, and CaV3 families in areas of cholinergic synapses of somatic muscles in earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Tiss Biol* 14: 316–323. <https://doi.org/10.1134/S1990519X20040070>
11. *Nurullin LF, Volkov EM* (2024) Immunofluorescent identification of dystrophin, actin, and light and heavy myosin

- chains in somatic cells of earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Tiss Biol* 18: 341–346.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X24700287>
12. *Nurullin LF, Almazov ND, Volkov EM* (2023) Immunofluorescent identification of GABAergic structures in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem Moscow Suppl Ser A* 17: 208–213.
<https://doi.org/10.1134/S1990747823040074>
 13. *Coleman WL, McCartney LE* (2023) GABA has a presynaptic inhibitory effect at *Lumbricus terrestris* body wall muscle synapses. *MicroPubl Biol* 2023: 10.17912/micropub.biology.001055.
<https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001055>
 14. *Dolphin AC* (2021) Functions of presynaptic voltage-gated calcium channels. *Function (Oxf)* 2: zqaa027.
<https://doi.org/10.1093/function/zqaa027>
 15. *Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC* (2011) RIM proteins tether Ca(2+) channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144: 282–295.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.029>
 16. *Kusch V, Bornschein G, Loreth D, Bank J, Jordan J, Baur D, Watanabe M, Kulik A, Heckmann M, Eilers J, Schmidt H* (2018) Munc13-3 Is required for the developmental localization of Ca(2+) channels to active zones and the nanopositioning of Cav2.1 near release sensors. *Cell Rep* 22: 1965–1973.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.010>
 17. *Li L, Bischofberger J, Jonas P* (2007) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27: 13420–13429.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1709-07.2007>
 18. *Krick N, Ryglewski S, Pichler A, Bikbaev A, Götz T, Kobler O, Heine M, Thomas U, Duch C* (2021) Separation of presynaptic Cav2 and Cav1 channel function in synaptic vesicle exo- and endocytosis by the membrane anchored Ca²⁺ pump PMCA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2106621118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2106621118>
 19. *Mueller BD, Merrill SA, Watanabe S, Liu P, Niu L, Singh A, Maldonado-Catala P, Cherry A, Rich MS, Silva M, Maricq AV, Wang ZW, Jorgensen EM* (2023) CaV1 and CaV2 calcium channels mediate the release of distinct pools of synaptic vesicles. *Elife* 12: e81407.
<https://doi.org/10.7554/eLife.81407>
 20. *Shpetner HS, Vallee RB* (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59: 421–432.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90027-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90027-5)
 21. *Praefcke GJ, McMahon HT* (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133–147.
<https://doi.org/10.1038/nrm1313>
 22. *Ramachandran R, Schmid SL* (2018) The dynamin superfamily. *Curr Biol* 28: R411–R416.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.013>
 23. *Cao H, Garcia F, McNiven MA* (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 9: 2595–2609.
<https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2595>
 24. *Ferguson SM, Brasnjo G, Hayashi M, Wölfel M, Collesi C, Giovedi S, Raimondi A, Gong LW, Ariel P, Paradise S, O’toole E, Flavell R, Cremona O, Miesenböck G, Ryan TA, De Camilli P* (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* 316: 570–574.
<https://doi.org/10.1126/science.1140621>
 25. *Cook TA, Urrutia R, McNiven MA* (1994) Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 644–648.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.644>
 26. *Raimondi A, Ferguson SM, Lou X, Armbruster M, Paradise S, Giovedi S, Messa M, Kono N, Takasaki J, Cappello V, O’Toole E, Ryan TA, De Camilli P* (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 70: 1100–1114.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.031>
 27. *van der Bliek AM, Meyerowitz EM* (1991) Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* 351: 411–414.
<https://doi.org/10.1038/351411a0>
 28. *Clark SG, Shurland DL, Meyerowitz EM, Bargmann CI, van der Bliek AM* (1997) A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10438–10443.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10438>
 29. *Newton AJ, Kirchhausen T, Murthy VN* (2006) Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17955–17960.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606212103>
 30. *Jackson J, Papadopoulos A, Meunier FA, McCluskey A, Robinson PJ, Keating DJ* (2015) Small molecules demonstrate the role of dynamin as a bi-directional regulator of the exocytosis fusion pore and vesicle release. *Mol Psychiatry* 20: 810–819.
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.56>
 31. *Shi B, Jin YH, Wu LG* (2022) Dynamin 1 controls vesicle size and endocytosis at hippocampal synapses. *Cell Calcium* 103: 102564.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102564>
 32. *Lu W, Ma H, Sheng ZH, Mochida S* (2009) Dynamin and activity regulate synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. *J Biol Chem* 284: 1930–1937.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m803691200>
 33. *Kasprowicz J, Kuenen S, Swerts J, Miskiewicz K, Verstreken P* (2014) Dynamin photoinactivation blocks Clathrin and α -adaptin recruitment and induces bulk membrane retrieval. *J Cell Biol* 204: 1141–1156.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201310090>
 34. *Douthitt HL, Luo F, McCann SD, Meriney SD* (2011) Dynasore, an inhibitor of dynamin, increases the probability of transmitter release. *Neuroscience* 172: 187–195.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.002>

PARTICIPATION OF THE ENZYME GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 AND VOLTAGE-DEPENDENT Ca^{2+} CHANNELS IN THE VESICULAR CYCLE OF TRANSMITTER SECRETION IN CHOLINERGIC MOTOR NERVE ENDINGS OF THE SOMATIC MUSCLES OF THE EARTHWORM *LUMBRICUS TERRESTRIS*

L. F. Nurullin^{a, b, #}, D. A. Peshehonov^b and E. M. Volkov^{b, ##}

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia*

^b*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

[#]*e-mail: lenizn@yandex.ru*

^{##}*e-mail: euroworm@mail.ru*

The effects of specific blockers (ω -conotoxin GVIA, ω -agatoxin IVA, nitrendipine, SNX-482, mibefradil) of N, P/Q, L, R, and T-type potential-dependent Ca^{2+} channels were studied by fluorescence confocal microscopy, as well as the glycogen synthase kinase-3 enzyme inhibitor GSK3 (1-azakenpaullone) on exo-endovesicular cycle processes in cholinergic neuromuscular synapses of somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. The mechanisms of the vesicular cycle involve Ca^{2+} ions entering the terminals through all types of potential-dependent Ca^{2+} channels of the presynaptic membrane. At the same time, N-, P/Q-, and L-type Ca^{2+} channels contribute most to endocytosis processes, whereas only N- and P/Q-type channels contribute to exocytosis. Dynamin-dependent endocytosis plays an essential role in recycling processes, and the recovery of vesicular pools in such synapses is predominantly facilitated by clathrin-dependent endocytosis. It can be considered that the basic mechanisms of vesicular cycle regulation in motor neuromuscular synapses are common to the entire phylogenetic tree of vertebrates and invertebrates, beginning with annelids. At the same time, the importance of individual regulatory elements of the vesicular secretion machinery in annelids has its own distinct specificity.

Keywords: voltage-gated Ca^{2+} channels, dynamin, exocytosis, endocytosis, synaptic vesicles, neuromuscular junctions, motor muscles, annelids