
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УЧАСТИЕ Ca^{2+} -АКЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ
ЭКЗО-ЭНДОЦИТОЗНОГО ЦИКЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ
В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ СОМАТИЧЕСКОЙ
МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин^{1, 2, *}, Н. Д. Алмазов², Е. М. Волков^{2, **}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии
наук”, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

*E-mail: lenizn@yandex.ru

**E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 27.08.2024 г.

Методами флуоресцентной микроскопии изучали участие Ca^{2+} -акцепторных белков в процессах экзо-эндоцитозного цикла квантовой секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Ингибирование кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ приводило к усилению процесса эндоцитоза. Блокирование фосфорилирования синаптических белков усиливало процесс эндоцитоза, вызывало увеличение размеров общего везикулярного пула и ускоряло кругооборот синаптических везикул. Можно сделать вывод, что кальциевая модуляция экзо-эндоцитоза везикул в синапсах эволюционно-первичной соматической мускулатуры аннелид происходит при участии кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ.

Ключевые слова: Ca^{2+} -сенсорные белки, нервно-мышечный синапс, соматические мышечные клетки, дождевой червь

DOI: 10.31857/S0869813924090116, EDN: AJHJYK

ВВЕДЕНИЕ

В основе квантовой секреции медиатора в нервных окончаниях лежит процесс экзо-эндоцитоза синаптических везикул. В стадии экзоцитоза везикулы сливаются в активных зонах с пресинаптической мембраной и освобождают нейромедиатор в синаптическую щель. После экзоцитоза следует эндоцитоз, который восстанавливает пул синаптических везикул [1]. Процессы рециклинга обеспечивают поддержание везикулярных пулов в нервных терминалях и тем самым сохраняют физиологический характер синаптической секреции медиатора [2]. Общая совокупность синаптических везикул подразделяется на пул, готовый к освобождению, резервный пул и рецикли-

рующей пул [3]. В механизмы экзо- и эндоцитозного цикла синаптических везикул вовлечены различные синаптические белки, в том числе Ca²⁺-акцепторные белки [4]. Последние играют важную роль в процессах рециклинга везикул [5]. При этом роль данных белков в кругообороте везикул в нервно-мышечных синапсах эволюционно-первичной соматической мускулатуры остается до конца неясной. Отсюда целью настоящего исследования стало изучение участия Ca²⁺-акцепторных белков, а именно: кальциневрина, кальмодулина и Ca²⁺/кальмодулин-зависимых протеинкиназ в механизмах экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мускулатуры дождевого червя.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления препарата дождевой червь *Lumbricus terrestris* разрезался сбоку по всей длине, отрезались головной и хвостовой концы, раскрывался, удалялись внутренние органы и перегородки между сегментами [6]. Далее фрагменты кожно-мышечного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали физиологическим раствором Древесы – Пакса около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1 °C). Состав раствора (мМ): 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na₂SO₄, 6 CaCl₂, 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Всего в экспериментах было использовано 72 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-минутной инкубации с красителем FM2–10 в нормальном физиологическом растворе. В гиперкалиевом растворе происходит деполаризация мембраны нервных окончаний, что приводит к увеличению частоты спонтанной секреции нейромедиатора и усилению экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул. Состав гиперкалиевого раствора (мМ): 41 NaCl, 40 KCl, 43 Na₂SO₄, 6 CaCl₂, 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. В целях уменьшения фонового свечения после загрузки красителя препарат в течение 30 мин отмывали в бескальциевом растворе следующего состава (мМ): 89 NaCl, 4 KCl, 43 Na₂SO₄, 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Микроскопическое исследование препаратов проводилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с использованием водно-иммерсионного объектива 20×/1.0 NA. Для возбуждения эмиссии красителя FM2–10 применялся Ar лазер. Длина волны возбуждения красителя составляла 488 нм, максимум длины волны эмиссии 610 нм. Анализ изображений проводился в программе ImageJ (NIH, США; веб-сайт программы <https://imagej.net/ij/>). Поскольку наши измерения зависели от индивидуальных характеристик регистрирующей аппаратуры, за единицу измерения интенсивности флуоресценции были приняты относительные единицы.

Для ингибирования Ca²⁺-акцепторных белков использовали следующие реактивы: циклоспорин А (Sigma-Aldrich, США), STO-609 (Sigma-Aldrich) и W-5 гидрохлорид (Sigma-Aldrich). Поскольку данные вещества плохо растворимы в воде, мы делали промежуточный раствор, содержащий органический растворитель диметилсульфоксид (DMSO, Sigma-Aldrich), в котором растворяли вещества. Далее из промежуточного раствора вещества добавлялись в нужной концентрации в физиологический раствор. Для оценки влияния DMSO на изучаемые процессы проводили контрольные эксперименты в присутствии и в отсутствие DMSO.

В экспериментах по изучению процессов эндоцитоза везикул препараты фрагментов кожно-мышечного мешка дождевого червя инкубировали в присутствии блокаторов Ca²⁺-акцепторных белков, окрашивали FM2–10 (22 мкМ) в гиперкалиевом раство-

ре (40 мМ), отмывали в бескальциевом растворе, а затем проводили исследование на микроскопе. На полученных изображениях анализировалось среднее значение флуоресценции нервно-мышечных синапсов в контроле и после действия веществ. В следующей серии экспериментов изучались процессы экзоцитоза везикул в двигательных нервных терминалях. Для этого мышечные препараты дождевого червя окрашивали FM2–10 в гиперкалиевом растворе. Затем отмывали в течение 30 мин в бескальциевом растворе, после чего стимулировали в гиперкалиевом растворе и регистрировали флуоресценцию на 0, 3 и 5 мин «разгрузки» в контроле и после действия веществ.

В экспериментах с кальциевым хелатором ВАРТА-АМ (Sigma-Aldrich) предварительно окрашенные FM2–10 мышечные препараты инкубировали 30 мин в бескальциевом растворе с хелатором в концентрации 0.5 мМ. Затем препараты в присутствии хелатора разгружали в бескальциевом растворе (0 мМ Ca^{2+}) с высоким содержанием K^+ (40 мМ) следующего состава (мМ): 53 NaCl, 40 KCl, 43 Na_2SO_4 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Потом регистрировали флуоресценцию нервно-мышечных синапсов при помощи микроскопа на 0, 3 и 5 мин «разгрузки».

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 мин. Средние значения флуоресценции достоверно не отличались друг от друга. Это говорит о том, что в наших условиях эксперимента выгорание красителя не наблюдалось.

Статистическая обработка данных 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 ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивание мышечного препарата в гиперкалиевом растворе маркером FM2–10 в концентрации 22 мкМ приводило к появлению множества светящихся пятен овальной формы, которые являются кластерами синаптических образований с протекающими в них процессами экзо-эндоцитоза везикул (рис. 1).

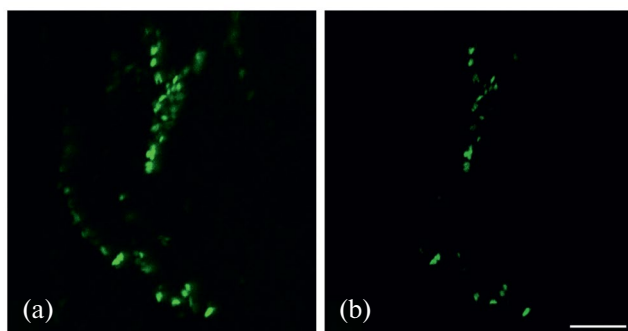


Рис. 1. Флуоресценция нервно-мышечных синапсов соматических мышечных клеток дождевого червя, загруженных липофильным красителем FM2–10. (а) – 0 мин, (б) – через 5 мин «разгрузки» красителя при 40 мМ K^+ в окружающем растворе. Масштабная линейка: 20 мкм.

Анализ флуоресцентных изображений синаптических контактов, загруженных красителем FM2–10, показал, что уровень флуоресценции составлял в контроле 88.3 ± 1.6 относительных единиц (о.е.) ($n = 62$) (рис. 2), а в присутствии 50 мкМ DMSO 86.5 ± 1.7 о.е. ($n = 67$) (рис. 2). Эти значения достоверно не отличались друг от друга ($p > 0.05$). Можно предполагать, что присутствие в окружающем растворе DMSO не оказывает существенного влияния на процессы эндоцитоза плазматических мембран в нервно-мышечных синапсах дождевого червя.

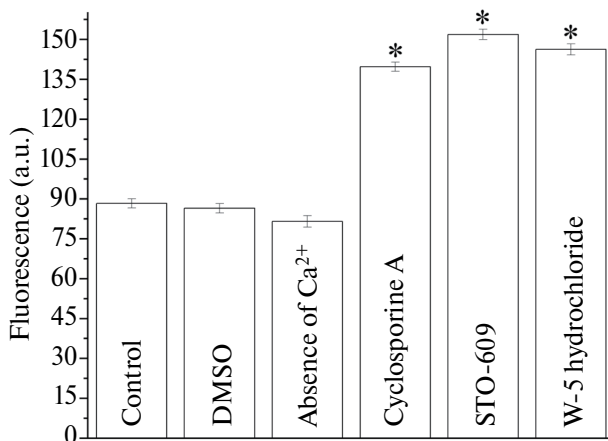


Рис. 2. Влияние DMSO, отсутствия ионов Ca²⁺ в растворе, ингибитора кальциневрина – циклоспорина А, ингибитора Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы киназы – STO-609, антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида на величину флуоресценции двигательных нервных терминалей препарата соматических мышечных клеток дождевого червя, загруженных липофильным красителем FM2–10. а.у. – относительные единицы.

При окрашивании мышечного препарата в бескальциевом гиперкалиевом растворе среднее значение флуоресценции составляло 81.5 ± 2.1 о.е. ($n = 66$) (рис. 2), которое достоверно не отличалось от контроля ($p > 0.05$). Таким образом, отсутствие ионов Ca²⁺ снаружи клеток существенно не влияет на процессы эндоцитоза везикул в нервно-мышечных контактах дождевого червя. Известно, что увеличение концентрации ионов K⁺ во внешней среде приводит к деполяризации мембраны нервного окончания и возрастанию частоты спонтанной секреции медиатора в синаптическую щель [7]. Показано, что спонтанное освобождение нейромедиатора регулируется внеклеточным и внутриклеточным кальцием. Высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо регулирует спонтанный выброс в возбуждающих и тормозных синапсах [8]. В наших условиях деполяризация клеточной мембраны гиперкалиевым раствором в отсутствие ионов Ca²⁺ снаружи клетки приводит к освобождению Ca²⁺ из внутриклеточных депо и увеличению частоты спонтанной секреции медиатора, что вызывает окрашивание нервных терминалей FM2–10 в процессе экзо-эндоцитоза синаптических везикул.

Кальциневрин – это активируемая Ca²⁺/кальмодулином серин/треониновая протеинфосфатаза, которая регулирует множество клеточных процессов, таких как экспрессия генов, ионный гомеостаз, дифференцировка мышц, секреция, эмбриогенез и т.д. [9]. Специфическое ингибирование циклоспорином А белка кальциневрина позволяет выявлять его роль в функционировании нервной системы [9]. В первичных культурах

гиппокампаальных нейронов блокирование кальциневрина угнетает эндоцитоз в синаптических терминалах [10]. Однако в нервно-мышечных соединениях дрозодилы ингибирование кальциневрина усиливает эндоцитоз везикул [11]. Наши эксперименты показали, что инкубация мышечного препарата в растворе в присутствии циклоспорина А в концентрации 10 мкМ в течение 15 мин приводила к достоверному возрастанию на 58% средней величины флуоресценции нагруженных красителем FM2–10 синапсов. По сравнению с контролем значение составило 139.7 ± 1.7 о.е. ($n = 102$; $p < 0.001$) (рис. 2). Можно полагать, что ингибирование циклоспорином А белка кальциневрина приводит к усилению эндоцитоза везикул в нервно-мышечном соединении дождевого червя.

Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа киназа (СаМКК) активирует СаМкиназу I (СаМКI), СаМкиназу IV (СаМКIV), протеинкиназу B (PKB/Akt) и 5'AMP-киназу (АМПК) посредством их фосфорилирования. Каскад киназ, опосредованный СаМКК, играет важную роль в ряде Ca^{2+} -зависимых путей, таких как морфогенез и пластичность нейронов, активация транскрипции, аутофагия и регуляция метаболизма [12]. СаМКК регулирует множество клеточных путей мембранного траффинга, в том числе клатрин-опосредованный эндоцитоз [13]. Препарат STO-609 ингибирует СаМКК, а также другую, не менее важную СаМК-киназу II (СаМКII) [14]. СаМКII – это наиболее распространенная киназа в возбуждающих синапсах, она ассоциирована с синаптическими везикулами, фосфорилирует большое количество синаптических белков и играет решающую роль в процессах синаптической пластичности и трансмиссии [15, 16]. Применение в наших экспериментах ингибитора STO-609 в концентрации 30 мкМ в течение 15 мин достоверно увеличивало среднее значение флуоресценции синапсов на 71% по сравнению с контролем и равнялось 151.9 ± 1.7 о.е. ($n = 112$; $p < 0.001$) (рис. 2). Таким образом, ингибирование СаМКК и СаМКII усиливало процессы эндоцитоза в нервно-мышечном контакте дождевого червя.

Кальмодулин является основным регулятором Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей в клетках, опосредуя многие физиологические процессы. При деполяризации нервной терминали Ca^{2+} /кальмодулин инициирует такие формы эндоцитоза, как клатрин-зависимый медленный эндоцитоз, балк-эндоцитоз, быстрый эндоцитоз и избыточный эндоцитоз [17]. В наших экспериментах аппликация на мышечный препарат 50 мкМ специфического антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида в течение 15 мин вызывала достоверное возрастание величины флуоресценции нервных терминалей на 65% по сравнению с контролем и была равна 151.9 ± 1.7 о.е. ($n = 105$; $p < 0.001$) (рис. 2). Необходимо отметить, что средняя величина флуоресценции нервных терминалей в присутствии STO-609 или W-5 гидрохлорида была достоверно выше по сравнению с циклоспорином А ($p < 0.01$). Среднее значение флуоресценции в присутствии W-5 гидрохлорида не отличалось от флуоресценции в присутствии STO-609 ($p > 0.05$) (рис. 2). Таким образом, инактивация кальмодулина приводила к достоверному увеличению светимости двигательных нервных терминалей в мышечном препарате дождевого червя, что можно трактовать как усиление процесса эндоцитоза.

Инкубация окрашенных маркером FM2–10 мышечных препаратов в течение 3–5 мин в растворе с высоким содержанием ионов K^+ приводила к «разгрузке» красителя из нервных терминалей (рис. 3). В контрольных экспериментах на 3-й и 5-й мин происходило снижение значений флуоресценции от начального уровня на 20% и 36% соответственно (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: 0 мин – 110.6 ± 3.4 о.е. ($n = 89$), 3 мин – 88.3 ± 2.6 о.е. ($n = 107$), 5 мин – 70.5 ± 2.9 о.е. ($n = 96$). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$).

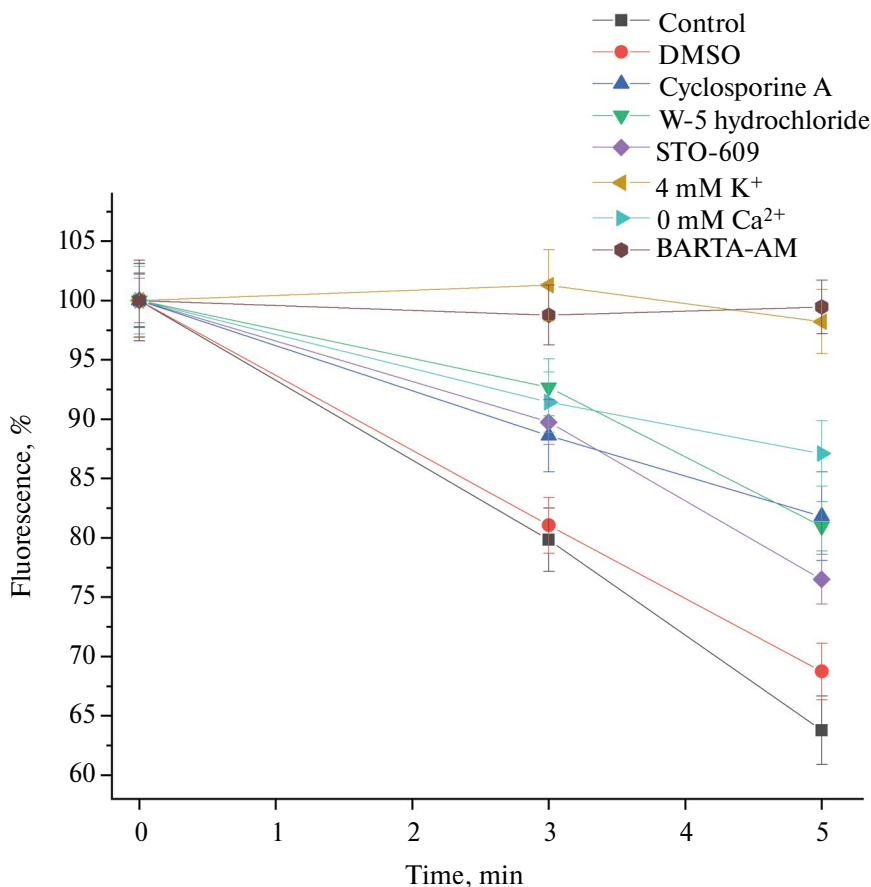


Рис. 3. Влияние ингибитора кальциневрина – циклоспорина А, ингибитора Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы киназы – STO-609, антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида, отсутствия ионов Ca²⁺ в окружающем растворе (0 мМ Ca²⁺), кальциевого хелатора ВАРТА-АМ на «разгрузку» двигательных нервных терминалей препарата соматических мышечных клеток дождевого червя, окрашенных флуоресцентным красителем FM2-10. В отдельной серии экспериментов контролировалось выгорание красителя FM2-10 в нормальном растворе (4 мМ K⁺) в течение 5 мин.

В присутствии DMSO в гиперкалиевом растворе также происходила «разгрузка» красителя из двигательных нервных терминалей. Значения флуоресценции на 3-й и 5-й мин 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 специфических блокаторов Ca²⁺-сенсорных белков циклоспорина А, W-5 гидрохлорида и STO-609 динамика «разгрузки» FM2-10 замедлялась, значения флуоресценции уменьшались на 3-й мин на 7–11%, на 5-й мин на 18–22% от начального уровня (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: для циклоспорина А – 0 мин – 107.7 ± 2.3 о.е. ($n = 99$), 3 мин – 95.5 ± 3.1 о.е. ($n = 117$),

5 мин – 88.1 ± 3.7 о.е. ($n = 93$); для W-5 гидрохлорида – 0 мин – 83.8 ± 2.2 о.е. ($n = 123$), 3 мин – 77.7 ± 2.4 о.е. ($n = 117$), 5 мин – 67.9 ± 2.1 о.е. ($n = 106$); для STO-609 – 0 мин – 88.8 ± 1.9 о.е. ($n = 105$), 3 мин – 79.7 ± 1.8 о.е. ($n = 107$), 5 мин – 67.9 ± 2.1 о.е. ($n = 116$). При этом во всех веществах средние значения светимости на 3-й и 5-й мин достоверно отличались от таковых в контроле и DMSO ($p < 0.05$). Таким образом, ингибирование Ca^{2+} -акцепторных белков кальциневрина, кальмодулина, CaMKK и CaMKII приводит к замедлению «разгрузки» маркера FM2–10 из двигательных нервных терминалей.

В бескальциевом гиперкальциевом растворе происходила «разгрузка» терминалей, нагруженных FM2–10, однако динамика «разгрузки» красителя несколько замедлялась по сравнению с контрольной кривой и кривыми «разгрузки» в присутствии специфических блокаторов Ca^{2+} -сенсорных белков (рис. 3). При этом на 3-й и 5-й мин «разгрузки» средние значения флуоресценции в бескальциевом растворе достоверно снижались на 9% и 13% соответственно ($p < 0.05$). Абсолютные величины флуоресценции в бескальциевом растворе составили: 0 мин – 81.5 ± 2.8 о.е. ($n = 103$), 3 мин – 74.5 ± 2.5 о.е. ($n = 102$), 5 мин – 71.0 ± 2.8 о.е. ($n = 99$). Как уже было сказано выше, спонтанное освобождение везикул происходит и в отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде, поэтому мы наблюдаем «разгрузку» двигательных нервных терминалей. В нашем случае «разгрузка» красителя из двигательных нервных терминалей несколько тормозится. По-видимому, кроме Ca^{2+} из внутриклеточных депо в процессе спонтанного экзо-эндоцитоза везикул в нервно-мышечном синапсе принимает участие также и внеклеточный Ca^{2+} . Эти результаты согласуются с данными литературы. Так, на центральных и периферических синапсах млекопитающих показано, что отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде только частично снижало интенсивность спонтанной секреции везикул с ацетилхолином в нервных терминалях [18, 19], а Ca^{2+} , освобождающийся из внутриклеточных запасов, регулирует спонтанное квантовое освобождение нейротрансмиттера [8].

В следующей серии опытов окрашенные FM2–10 нервно-мышечные синапсы разгружали в бескальциевом гиперкальциевом растворе в присутствии проникающего в клетки кальциевого хелатора ВАРТА-АМ. «Разгрузка» нервных терминалей не происходила, значение флуоресценции на 3-й и 5-й мин снижалось на 1–2%, что достоверно не отличалось от начального уровня ($p > 0.05$). Абсолютные величины флуоресценции при этом составили: 0 мин – 96.0 ± 3.1 о.е. ($n = 98$), 3 мин – 94.9 ± 2.5 о.е. ($n = 101$), 5 мин – 95.5 ± 2.2 о.е. ($n = 105$). Таким образом, хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} ингибирует спонтанную секрецию синаптических везикул, что отражается в отсутствии «разгрузки» окрашенных FM2–10 нервно-мышечных синапсов.

Известно, что реакции фосфорилирования-дефосфорилирования синаптических белков играют важную роль в рециклинге везикул. Так, дефосфорилирование синаптических белков кальциневрином влияет на фазу эндоцитоза синаптических везикул [20, 21]. В центральных синапсах гиппокампа мозга крысы размер рециклирующего пула везикул регулируется при участии CDK5/кальциневринового пути [22]. На нервно-мышечных соединениях дрозофилы показана роль кальциневрина в усилении процесса эндоцитоза, а также замедлении рециклинга синаптических везикул [11, 23]. В наших экспериментах инактивация кальциневрина увеличивала флуоресценцию нагруженных FM2–10 двигательных нервных терминалей и замедляла их «разгрузку». Можно полагать, что ингибирование дефосфорилирования внутриклеточных белков приводит к увеличению интенсивности эндоцитоза и, как следствие, возрастанию размеров общего везикулярного пула и ускорению рециклинга синаптических везикул.

Кальмодулин как наиболее распространенный Ca^{2+} -акцепторный белок, связываясь с другими белками, в том числе с кальциневрином, изменяет их активность, а также способен контролировать рециклинг синаптических везикул через SNARE белковый комплекс [24]. В аудиторных синапсах ЦНС крысы восстановление пула быстро освобождаемых везикул происходит при участии белка кальмодулина [25]. Нами было показано, что ингибирование кальмодулина приводило к увеличению светимости нагруженных FM2–10

синапсов и замедлению выхода маркера из терминалей при их «разгрузке» стимуляцией. Таким образом, инактивация кальмодулина также приводит к усилению процесса эндоцитоза везикул, возрастанию размеров общего везикулярного пула, а также ускорению рециклинга синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя.

Известно, что фермент СаМКК участвует в регуляции клеточного транспорта мембранных везикул [13]. Пресинаптическая киназа СаМКП фосфорилирует ряд ключевых белков экзоцитоза везикул, включая синтаксин, синапсин, RIM, SNARE белки и Ca²⁺-каналы [26]. СаМКП также способна повышать подвижность синаптических везикул и облегчать спонтанное и вызванное квантовое освобождение нейромедиатора [27]. В наших экспериментах инактивация СаМКК и СаМКП в нервно-мышечных синапсах дождевого червя увеличивала флуоресценцию окрашенных FM2–10 терминалей и замедляла динамику их «разгрузки» при стимуляции. Таким образом, можно предположить, что блокирование фосфорилирования ряда ключевых синаптических белков также усиливает процесс эндоцитоза мембран, вызывает увеличение размеров общего везикулярного пула и ускоряет кругооборот синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя. Можно сделать вывод, что в механизмы кальциевой модуляции процессов экзо-эндоцитоза везикул в синапсах эволюционно-первичной мускулатуры аннелид вовлечены такие Ca²⁺-акцепторные белки как кальциневрин, кальмодулин и Ca²⁺/кальмодулин зависимые протеинкиназы. Кольчатые черви являются одними из первых животных в эволюционном ряду, которые обладают развитой мышечной системой. Полученные данные указывают на высокую генетическую стабильность системы кальциевой регуляции секреции нейромедиатора, которая, вероятно, сформировалась на ранних этапах эволюции нервно-мышечной регуляции двигательной активности у животных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект 23–24–00239, <https://rscf.ru/project/23–24–00239/>). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (протокол № 23/5 от 12.05.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC (2014) Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76: 301–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170305>
2. Betz WJ, Wu LG (1995) Synaptic transmission. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr Biol* 5: 1098–1101. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00220-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00220-x)

3. *Rizzoli SO, Betz WJ* (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6: 57–69.
<https://doi.org/10.1038/nrn1583>
4. *Sudhof TC* (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509–547.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
5. *Igarashi M, Watanabe M* (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca^{2+} concentrations. *Neurosci Res* 58: 226–233.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.03.005>
6. *Volkov EM, Nurullin LF, Nikolsky EE, Švandová I, Vyskočil F* (2000) Participation of electrogenic $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol Res* 49: 481–484.
http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf
7. *He LS, Rue MCP, Morozova EO, Powell DJ, James EJ, Kar M, Marder E* (2020) Rapid adaptation to elevated extracellular potassium in the pyloric circuit of the crab, *Cancer borealis*. *J Neurophysiol* 123: 2075–2089.
<https://doi.org/10.1152/jn.00135.2020>
8. *Williams CL, Smith SM* (2018) Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release. *J Neurosci Res* 96: 335–347.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24116>
9. *Creamer TP* (2020) Calcineurin. *Cell Commun Signal* 18: 137.
<https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
10. *Kumashiro S, Lu YF, Tomizawa K, Matsushita M, Wei FY, Matsui H* (2005) Regulation of synaptic vesicle recycling by calcineurin in different vesicle pools. *Neurosci Res* 51: 435–443.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.12.018>
11. *Kuromi H, Kidokoro Y* (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 19: 1557–1565.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-05-01557.1999>
12. *Tokumitsu H, Sakagami H* (2022) Molecular Mechanisms Underlying Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Signal Transduction. *Int J Mol Sci* 23: 11025.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911025>
13. *Kennedy G, Gibson O, T O'Hare D, Mills IG, Evergren E* (2023) The role of CaMKK2 in Golgi-associated vesicle trafficking. *Biochem Soc Trans* 51: 331–342.
<https://doi.org/10.1042/bst20220833>
14. *Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Ikeda M, Saji I, Kobayashi R* (2002) STO-609, a specific inhibitor of the $\text{Ca}(2+)\text{-calmodulin}$ -dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* 277: 15813–15818.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M201075200>
15. *Mao LM, Jin DZ, Xue B, Chu XP, Wang JQ* (2014) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII. *Sheng Li Xue Bao* 66: 365–372.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4435801/>
16. *Wang ZW* (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol* 38: 153–166.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8039-7>
17. *Wu XS, McNeil BD, Xu J, Fan J, Xue L, Melicoff E, Adachi R, Bai L, Wu LG* (2009) Ca^{2+} and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci* 12: 1003–1010.
<https://doi.org/10.1038/nn.2355>
18. *Randic M, Padjen A* (1967) Effect of calcium ions on the release of acetylcholine from the cerebral cortex. *Nature* 215: 990.
<https://doi.org/10.1038/215990a0>
19. *Simpson LL* (1968) The role of calcium in neurohumoral and neurohormonal extrusion processes. *J Pharm Pharmacol* 20: 889–910.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09672.x>
20. *Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ* (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol* 5: 701–710.
<https://doi.org/10.1038/ncb1020>
21. *Cousin MA, Tan TC, Robinson PJ* (2001) Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem* 76: 105–116.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00049.x>

22. Marra V, Burden JJ, Thorpe JR, Smith IT, Smith SL, Häusser M, Branco T, Staras K (2012) A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron* 76: 579–589.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.042>
23. Kuromi H, Yoshihara M, Kidokoro Y (1997) An inhibitory role of calcineurin in endocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals of *Drosophila* larvae. *Neurosci Res* 27: 101–113.
[https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01132-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01132-7)
24. Igarashi M, Watanabe M (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci Res* 58: 226–233.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.03.005>
25. Sakaba T, Neher E (2001) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32: 1119–1131.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00543-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00543-8)
26. Xue R, Meng H, Yin J, Xia J, Hu Z, Liu H (2021) The Role of Calmodulin vs. Synaptotagmin in Exocytosis. *Front Mol Neurosci* 14: 691363.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.691363>
27. Wang ZW (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol.* 38: 153–166.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8039-7>

**Participation of Ca²⁺-Acceptor Proteins in the Mechanisms of the Exo-Endocytic Cycle
of Synaptic Vesicles in the Motor Nerve Endings of the Somatic Musculature
of the Earthworm *Lumbricus terrestris***

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

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center
of Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia*

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

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

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

Using fluorescence microscopy, we studied the participation of Ca²⁺-acceptor proteins in the processes of the exo-endocytotic cycle of neurotransmitter quantal secretion in the neuromuscular junction of the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Inhibition of calcineurin, calmodulin and Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinases led to an increase in the process of endocytosis. Blocking the phosphorylation of synaptic proteins enhances the process of endocytosis, causes an increase in the size of the total vesicular pool and accelerates the turnover of synaptic vesicles. It can be concluded that calcium modulation of vesicle exo-endocytosis at the synapses of the evolutionarily primary somatic muscles of annelids occurs with the participation of calcineurin, calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases.

Key words: Ca²⁺-sensor proteins, neuromuscular junction, somatic muscle cells, earthworm