

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ – ТРИГГЕРЫ И МОДУЛЯТОРЫ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ

© 2024 г. А. Е. Гайдуков<sup>1,\*</sup>, О. П. Балезина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 04.09.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Запуск быстрой синхронной квантовой секреции нейротрансмиттеров в центральных и периферических синапсах обеспечивается за счет локального возрастания концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных терминалах около  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров синаптических везикул в ответ на деполяризацию пресинаптической мембраны распространяющимся по аксону потенциалом действия. Вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи через пресинаптические потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы  $\text{Ca}_v2.1$  или  $\text{Ca}_v2.2$  (P/Q- или N-типа) – основной способ формирования динамического  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, запускающего процесс экзоцитоза синаптических везикул практически во всех типах химических синапсов и способного индуцировать развитие определенных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых форм синаптической пластичности. Однако в последние годы стало очевидным, что набор источников и спектр пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов весьма разнообразен. Выявление спектра регуляторных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, работающих в комплексе с соответствующими им мишенями, описание их вклада в механизмы, управляющие квантовой секрецией нейротрансмиттера, представляет собой актуальное направление современной синаптической физиологии. Среди таких дополнительных к триггерному  $\text{Ca}^{2+}$ -входов особый интерес представляют  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, роль и условия активации которых в нервно-мышечных синапсах малоизучены и не дают однозначного представления о месте этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляции секреции ацетилхолина в моторных синапсах позвоночных. Данный обзор систематизирует имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований многообразной функциональной роли потенциал-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в нервно-мышечных синапсах млекопитающих и пресинаптических сигнальных путях, контролирующих эти  $\text{Ca}^{2+}$ -входы, и их участие в процессах тонкой настройки квантовой секреции ацетилхолина.

*Ключевые слова:* нервно-мышечный синапс,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, квантовая секреция, ацетилхолин

**DOI:** 10.31857/S0869813924100044, **EDN:** VRWHWE

### ВВЕДЕНИЕ

Исключительная роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , входящих снаружи в нервные терминалы синапсов и приводящих к выбросу нейротрансмиттера, впервые была обнаружена в нервно-мышечных синапсах (НМС) [1]. В настоящее время вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через определен-

ные пресинаптические потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы известен как специфический триггерный сигнал, запускающий процесс экзоцитоза синаптических везикул во всех типах химических синапсов [2, 3]. К концу XX века стало очевидным, что набор источников и спектр внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в нейронах и других клетках весьма разнообразен. В постсинаптических структурах синапсов ЦНС подробно описана пространственно-временная организация  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, их мишени и влияния на разные режимы синаптической передачи [4, 5]. В то же время в пресинаптических нервных окончаниях подобные явления до сих пор остаются малоизученными.

В настоящее время известны примеры  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пресинаптической пластичности, такие как  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое облегчение, депрессия, посттетаническая потенция [6, 7]. Однако источники регуляторного  $\text{Ca}^{2+}$  в таких случаях часто остаются неясными либо – по умолчанию – приписываются  $\text{Ca}^{2+}$ , входящему в нервные терминалы по основному, триггерному  $\text{Ca}^{2+}$ -входу – в случае моторных синапсов млекопитающих это  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа [8]. Между тем в последние годы идентифицирован целый ряд других путей и возможностей локального повышения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных терминалах. Это и активность разнообразных пресинаптических потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, отличных от триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа [9, 10], и пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие ионотропные хеморецепторы [11, 12], и выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо по каналам рианодиновых (РиР) или  $\text{IP}_3$ -рецепторов [13]. Как правило, такие  $\text{Ca}^{2+}$ -входы рассматривают как вспомогательный источник ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для усиления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в терминалах. Способны ли такие  $\text{Ca}^{2+}$ -входы обеспечивать определенную регулировку параметров квантовой секреции нейротрансмиттера как в сторону ее усиления, так и торможения – остается малоизученным. Выявление спектра регуляторных  $\text{Ca}^{2+}$ -входов, работающих в комплексе с соответствующими им мишенями, условий их вовлечения в управление квантовой секрецией нейротрансмиттера, установление механизмов, лежащих в основе их регуляторного влияния, безусловно, представляет собой актуальное направление современной синаптической физиологии.

Несмотря на имеющиеся попытки описания ряда пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и мишеней ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных терминалах синапсов в ЦНС [14–16], наиболее удобной моделью для решения проблемы являются периферические НМС – благодаря их крупным размерам, изолированной локализации на мышечных волокнах и доступности пресинаптических процессов для электрофизиологических экспериментов [17].

В настоящее время в моторных нервных терминалах млекопитающих, наряду с триггерным для экзоцитоза синаптических везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -входом (потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа), описан ряд других потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [18–20]. Среди них особый интерес представляют «медленные»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, чьи условия активации и модуляторная роль в отношении нервно-мышечной передачи неоднозначны и продолжают интенсивно изучаться.

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ $\text{Ca}^{2+}$ -КАНАЛЫ

$\text{Ca}^{2+}$ -проводимость в нервных терминалах синапсов активируется в ответ на депolarизацию пресинаптической мембраны распространяющимся по аксону потенциалом действия (ПД). Каналы, обеспечивающие такую проводимость, относятся к семейству потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов ( $\text{Ca}_v$ ).

В нервных терминалах синапсов в ЦНС и на периферии описана экспрессия нескольких типов  $\text{Ca}_v$ , которые отличаются по молекулярной структуре, функциональным свойствам, регуляции, локализации и влияниям на секрецию нейротрансмиттеров. Если рассматривать  $\text{Ca}_v$  безотносительно паттерна экспрессии и локализации именно в пресинаптической мембране нервных окончаний, то их традиционно делят на две группы.

Первая группа – высокопороговые  $Ca_v$ , активирующиеся (переходящие в открытое состояние) при низких значениях мембранного потенциала (МП) (HVA – high voltage activated). Им требуется значительная деполяризация мембраны по сравнению с потенциалом покоя (ПП) для их активации. К ним относят L-тип ( $Ca_v1.1-1.4$ ), P/Q-тип ( $Ca_v2.1$ ), N-тип ( $Ca_v2.2$ ) и R-тип ( $Ca_v2.3$ ) потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов [3, 7, 21].

Вторая группа – единственный T-тип  $Ca^{2+}$ -каналов ( $Ca_v3.1-3.3$ ) – низкопороговый (LVA – low voltage activated). Эти каналы активируются при незначительных деполяризующих сдвигах МП, близких к ПП, демонстрируют быструю кинетику срабатывания воротного механизма и обладают малой унитарной проводимостью. LVA-каналы играют главную роль в реализации нейрональной пейсмейкерной активности, развитии эпилепсии и проведении болевых сигналов [22].

На рубеже XX-XXI веков было установлено, что у млекопитающих каналообразующие  $\alpha 1$ -субъединицы  $Ca_v$  кодируются 10 отдельными генами, разделяемыми на три отдельных подсемейства по сходству последовательностей. Основываясь на генетических данных, в современной физиологии  $Ca_v$  также делят на 3 группы –  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  и  $Ca_v3$  [3, 21, 23]. Несмотря на определенные нюансы, такое деление на три группы справедливо и для беспозвоночных [24].

Исследование потенциал-активируемых  $Ca^{2+}$ -токов и опосредующих их каналов на многочисленных объектах показало, что простое разделение потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов на LVA и HVA достаточно искусственно и в малой степени отражает фактическое положение дел. Реально существует континуум порогов активации среди различных подтипов  $Ca_v$ , который меняется в зависимости от результата альтернативного сплайсинга основной каналообразующей  $\alpha 1$ -субъединицы в конкретных клетках и дополнительно модифицируется в результате комбинирования изоформ вспомогательных субъединиц  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  и  $\gamma$ , взаимодействующих с  $\alpha 1$ . Это в конечном итоге способно приводить к различным физиологическим проявлениям, включая модулирование синаптической передачи [25–27]. Тем не менее буквенные варианты обозначений  $Ca_v$  до сих пор продолжают употребляться для подчеркивания функциональной специфики.

На пресинаптической мембране могут быть представлены разные типы  $Ca_v$ , при этом в разных синапсах плотность и степень их участия в определенных режимах функционирования нервных терминалей выражены по-разному. Наиболее типичными для центральных синапсов в качестве триггеров экзоцитоза синаптических везикул являются HVA-каналы N- и P/Q-типов, тогда как у периферических синапсов амфибий в качестве такого триггера задействован N-тип, а у млекопитающих – P/Q-тип  $Ca^{2+}$ -каналов [28, 29].

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ

### *Основная каналообразующая $\alpha 1$ -субъединица $Ca_v$ -каналов*

Потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы представляют собой мультисубъединичный комплекс, состоящий из основной каналообразующей субъединицы  $\alpha 1$  с дополнительными субъединицами (за исключением  $Ca_v3$ , образующих канал без участия дополнительных субъединиц) [30, 31]. Субъединица  $\alpha 1$  (190–250 кДа) является самой большой и включает в себя структуры, образующие проводящую ионы  $Ca^{2+}$  пору, сенсор напряжения и воротный механизм, а также большинство специфических участков, обеспечивающих широкий спектр регуляторных влияний на работу канала со стороны вторичных посредников, фармакологических агентов и токсинов.

Топологическая организация субъединицы  $\alpha 1$ , состоящей из примерно 2000 аминокислотных остатков, представляет собой 4 гомологичных домена (I–IV). Каждый из доменов состоит из 6 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (S1 – S6) и неспирализованной P-петли между S5 и S6. Сенсор потенциала S4 содержит последовательности из 4–5

положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина или лизина, разделенных трехаминокислотными интервалами. Положительные заряды в составе S4 находятся во взаимодействии с «противозарядами» (негативно заряженные и полярные аминокислотные остатки) в составе S1 – S3, образуя совместно потенциал-чувствительный домен [32, 33]. Р-петли выстилают пору и содержат в определенных местах негативно заряженные аминокислотные остатки (в основном глутамат), формирующие ионоселективный фильтр канала.

Конформационные изменения S5 и S6, индуцированные в ответ на деполяризацию мембраны транслокацией во внешний листок плазмалеммы S4 в составе потенциал-чувствительного домена, обеспечивают непосредственное функционирование воротного механизма  $Ca_v$  [33]. Обширные внутриклеточные неспирализованные участки  $\alpha 1$ -субъединицы – направленные в цитоплазму N- и C-концы, междоменные петли – служат своеобразной сигнальной платформой для модулирования  $Ca^{2+}$ -токов и в конечном итоге  $Ca^{2+}$ -зависимой регуляции синаптической передачи.

#### *Вспомогательные субъединицы $Ca_v$ -каналов*

Свойства  $Ca_v 1$  и  $Ca_v 2$  модулируются вспомогательными субъединицами, зачастую обеспечивая различные роли этих типов каналов в секреции нейротрансмиттеров.

$\beta$ -субъединицы  $Ca_v$  – результат экспрессии 4 отдельных генов. Это цитоплазматические модуляторы функций  $Ca_v$ , регулирующие как количество каналов на мембране клетки, так и их потенциал-зависимую активацию и инактивацию [34, 35].  $\beta$ -субъединицы взаимодействуют с  $\alpha 1$ -субъединицами за счет наличия у последних специального участка на внутриклеточной петле между I и II доменами.

Субъединицы  $\alpha 2\delta$  – результат посттрансляционного процессинга продукта одного из 4 генов, кодирующих препробелок, в результате протеолиза которого образуются  $\alpha 2$  и  $\delta$ , соединенные дисульфидным мостиком. За счет гликозилфосфатидилинозитольного якоря  $\alpha 2\delta$  взаимодействуют с внешним листом плазмалеммы и одновременно связываются с первой внеклеточной петлей домена I  $\alpha 1$ -субъединиц  $Ca_v 1$  и  $Ca_v 2$ .  $\alpha 2\delta$ -субъединицы могут регулировать активацию и инактивацию  $Ca_v$ , а также не просто их плотность на поверхности клеток (вместе с  $\beta$ -субъединицами), но и трафик  $Ca_v$  в специфические мембранные домены нейронов, включая пресинаптическую мембрану [36, 37]. Кроме того,  $\alpha 2\delta$  могут обеспечивать трансинаптические взаимодействия с белками постсинаптической мембраны, включая рецепторы к нейротрансмиттерам [38, 39], и определять уровень вероятности выброса нейротрансмиттера в синапсах ЦНС [40].

$\gamma$ -субъединица является неотъемлемым компонентом  $Ca_v 1.1$ , но не пресинаптических  $Ca_v 2.1$  и  $Ca_v 2.2$  [21].

Таким образом, ансамбль дополнительных субъединиц  $Ca_v$ , хотя и модулирует функциональные характеристики  $Ca^{2+}$ -каналов, но ключевые фармакологические и физиологические различия  $Ca_v$  обусловлены преимущественно различиями в структуре изоформ их  $\alpha 1$ -субъединиц.

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ В АКТИВНЫХ ЗОНАХ МОТОРНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЕЙ

Начиная с 60-х годов XX столетия стало известно, что в НМС и всех других химических синапсах квантовая секреция нейротрансмиттера происходит в специализированных регионах пресинаптической мембраны – активных зонах [41, 42]. Набор специфически взаимодействующих белков активных зон обеспечивает не только рекрутирование, докинг, прайминг синаптических везикул и их последующий экзоцитоз, но и позиционирование  $Ca_v$  в непосредственной близости от везикул и точное распо-

ложение пре- и постсинаптических структур друг напротив друга, а также участвует в реализации пресинаптической пластичности [43, 44].

Активные зоны НМС млекопитающих организованы в виде коротких (80–100 нм) линейных рядов, образованных синаптическими везикулами и внутримембранными частицами (ионными каналами и др.). В каждой активной зоне экзоцитоз синаптических везикул происходит в местах их докинга, а по бокам от них расположены ряды из примерно 20 трансмембранных частиц, часть из которых считается  $Ca_v$  [45]. Таким образом, в активных зонах НМС млекопитающих  $Ca_v$  расположены по обеим сторонам докированных синаптических везикул, в отличие от НМС лягушки, где ряды частиц в активных зонах значительно длиннее (1–2 мкм), а  $Ca_v$  располагаются только с одной стороны от синаптических везикул [46]. Эксперименты с использованием высокочастотной стимуляции показали, что в НМС мыши число докированных синаптических везикул, отражающих максимально возможный размер пула везикул, готовых к выбросу (RRP – readily-releasable pool), составляет около 1700 [47]. Учитывая, что зрелый НМС мыши содержит примерно 900 активных зон [29, 48], эти данные подтверждают предположения, полученные с помощью электронно-микроскопических методов, о наличии в каждой активной зоне моторных синапсов млекопитающих двух синаптических везикул, потенциально готовых к экзоцитозу.

Слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной может происходить и в отсутствие электрической стимуляции мембраны (спонтанная секреция), и в течение миллисекунд после достижения потенциала действия нервной терминали (быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера) или в течение десятков секунд после стимуляции (асинхронный выброс). Все эти паттерны секреции нейротрансмиттеров по-разному зависят от изменения внутритерминальной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и функционирования определенных  $Ca^{2+}$ -входов [49–51]. В подавляющем большинстве химических синапсов, включая нервно-мышечные, основными (триггерными)  $Ca^{2+}$ -входами, обеспечивающими быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера, служат  $Ca^{2+}$ -каналы семейства  $Ca_v2$  –  $Ca_v2.1$  (P/Q-тип) и  $Ca_v2.2$  (N-тип) и в меньшей степени –  $Ca_v2.3$  (R-тип). Ключевая роль единичной изоформы  $Ca_v2$  для запуска выброса нейротрансмиттеров показана и в НМС беспозвоночных (*Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*) [37, 52, 53], несмотря на ее определенные структурно-функциональные отличия от изоформ  $Ca_v2$  позвоночных животных [24].

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ $Ca^{2+}$ -КАНАЛЫ P/Q-ТИПА ( $Ca_v2.1$ ) И ИХ РОЛЬ В НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ

Свое название  $Ca^{2+}$ -каналы P/Q-типа получили после описания токсинов пауков, блокирующих  $Ca^{2+}$ -токи, опосредуемые  $Ca^{2+}$ -каналами в клетках Пуркиньи (P-тип) или в гранулярных клетках мозжечка (Q-тип) [54, 55].  $Ca^{2+}$ -токи, чувствительные к этим токсинам, обеспечивают вызванную синаптическую активность не только во многих синапсах ЦНС, но и в НМС млекопитающих. В них селективный блокатор  $Ca_v2.1$   $\omega$ -агатоксин IVA способен полностью терминировать быструю синхронную многоквантовую секрецию АХ [56, 57]. Оба  $Ca^{2+}$ -тока P- и Q-типа развиваются при срабатывании  $Ca_v$  с основной порообразующей субъединицей  $\alpha 1A$ , кодируемой одним геном *CACNA1A*. Разделение токов (и каналов) на P- и Q-типы может быть результатом комбинирования  $\alpha 1A$ -субъединицы с различными изоформами  $Ca_v\beta$ -субъединиц [58]. В НМС мыши доминирующей изоформой  $\beta$ -субъединицы, взаимодействующей с  $\alpha 1A$   $Ca_v2.1$ , является  $\beta 4$  [59].

Еще одним фактором, обеспечивающим экспрессию широкого спектра  $Ca_v2.1$ -токов (которые сейчас называют P/Q-типом) с разными биофизическими и фармаколо-

гическими характеристиками, является альтернативный сплайсинг гена, кодирующего  $\alpha 1A$ -субъединицу  $Ca_v2.1$  [60].

### *Роль субъединицы $\alpha 1A$ $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа в их активности*

Об исключительной функциональной важности именно  $\alpha 1A$ -субъединицы по сравнению с дополнительными в составе гетеромультимерных комплексов  $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа для обеспечения нервно-мышечной передачи свидетельствуют данные о неврологических повреждениях (прогрессирующей атаксии и дистонии) у мышей с нокаутом гена  $\alpha 1A$ -субъединицы. Это сопровождалось значительными нарушениями синаптической передачи и смерти в течение нескольких недель после рождения, несмотря на компенсаторное участие в поддержании быстрой синхронной секреции квантов АХ со стороны других типов  $Ca_v$  [61, 62].

$\alpha 1A$ -субъединицы P/Q-типа  $Ca^{2+}$ -каналов моторных синапсов являются ключевой мишенью аутоантител при миастеническом синдроме Ламберта – Итона. Характерной особенностью патогенеза этого заболевания является не просто уменьшение поступления ионов  $Ca^{2+}$  в моторное нервное окончание, но и дезорганизация там активных зон, сопровождающаяся изменением сопряжения триггерного  $Ca^{2+}$ -входа и синаптических везикул. Это, учитывая нелинейность  $Ca^{2+}$ -зависимости быстрой синхронной секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах, крайне негативно сказывается на нервно-мышечной передаче [42, 63, 64].

Ключевая роль  $Ca_v2.1$  в обеспечении секреции нейротрансмиттеров не только в качестве триггерного  $Ca^{2+}$ -входа, но и как участника формирования и функционирования активных зон показана не только при каналопатиях и аутоиммунных воздействиях на этот тип  $Ca_v$ , но и по результатам протеомного анализа. Количественная протеомика свидетельствует, что пресинаптический интерактом (паттерн взаимодействия белков)  $Ca_v2$  образует так называемое наноокружение и насчитывает около 200 белков, хотя не все из них связаны с  $Ca_v2$  напрямую [65].

Именно такая эволюционно консервативная тесная ассоциация  $Ca_v2$  с определенными белками активных зон обеспечивает при открывании этих каналов в ответ на приход ПД регулируемый быстрый экзоцитоз синаптических везикул, что будет рассмотрено далее.

### *Связь $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа с белками докинга и прайминга синаптических везикул*

Белки, взаимодействующие с везикулярными малыми ГТФазами Rab3 (RIMs – Rab3-interacting molecules), являются одними из ключевых факторов активных зон, обеспечивающими не только докинг и прайминг синаптических везикул. Они также связываются посредством своих PDZ-доменов с консервативным аминокислотным мотивом на цитоплазматическом С-конце  $\alpha 1A$ -субъединицы  $Ca_v2.1$  [66]. Такое взаимодействие является необходимым для рекрутирования в активные зоны  $Ca_v2.1$  и их правильного позиционирования, определяя там их плотность. Помимо прямого взаимодействия, RIMs также контактируют с  $Ca_v2.1$  опосредованно, за счет взаимодействия с RIM-связывающими белками, которые связываются с богатыми пролином участками на С-конце субъединицы  $\alpha 1A$   $Ca_v2.1$ . Учитывая многочисленные связи RIMs и RIM-связывающих белков как с  $\beta$ -субъединицей  $Ca^{2+}$ -каналов, так и белками цитоматрикса активных зон CAST/ELKS и Bassoon, также взаимодействующими с  $\beta$ -субъединицей, можно говорить о наличии в активной зоне взаимосвязанной белковой сети. Основой такой сети служит тройной комплекс – RIMs, RIM-связывающие белки и С-концы  $Ca_v2.1$ , располагающий эти триггерные  $Ca^{2+}$ -каналы на определенном расстоянии от синаптических везикул (позиционный прайминг). Нарушение одной точки связи в такой сети может быть скомпенсировано за счет других молекулярных взаимодействий  $Ca_v2.1$ -каналов в активных зонах [3, 37, 67, 68].

В синапсах ЦНС взаимодействие субъединиц  $\text{Ca}_v2.1$  с RIMs, белками цитоматрикса и белковыми регуляторами прайминга определяет не только собственно позиционный прайминг синаптических везикул по отношению к триггерному  $\text{Ca}^{2+}$ -входу, но и разнонаправленно контролирует время перехода самих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов из закрытого в открытое состояние и обратно в ответ на пресинаптический ПД, а также – потенциалозависимость их инактивации. Это в конечном итоге обуславливает динамику функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого характера секреции квантов нейротрансммиттера при ритмической нейрональной активности [69, 70].

Учитывая высокую консервативность белков активных зон и машинерии экзоцитоза, а также доказанное наличие всех ключевых белков в активных зонах моторных нервных терминалей млекопитающих [71, 72], можно с уверенностью предполагать, что сходный характер влияния белков позиционного прайминга на активность  $\text{Ca}_v2.1$  имеет место и в активных зонах НМС млекопитающих.

#### *Регуляция $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: synprint-сайт $\text{Ca}_v2$ -каналов*

В составе триггерных  $\text{Ca}_v2$  был идентифицирован synprint-сайт (synaptic protein interaction). Это последовательность аминокислот в составе цитоплазматической петли между доменами II и III  $\alpha 1$ -субъединиц каналов  $\text{Cav}2.1$  и  $\text{Cav}2.2$ . Synprint обеспечивает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое связывание несущих его  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов с белками экзоцитоза SNARE-комплекса синтаксином и SNAP-25, а также с быстрым низкоаффинным везикулярным  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсором синаптотагмином (1, 2 или 9) [73, 74]. Физиологическое значение такого прямого взаимодействия заключается не в физической связи канала с синаптической везикулой и машинерией экзоцитоза, а в регуляции активности самих триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Встроенные в пресинаптическую мембрану синтаксин и SNAP-25 (t-SNAREs) еще вне собранных SNARE-комплексов при отсутствии докированной синаптической везикулы обеспечивают сдвиг потенциалозависимости инактивации  $\text{Ca}_v2.1$  в сторону более негативных значений МП. Это уменьшает доступность каналов для обеспечения экзоцитоза, но не препятствует их активации [74, 75]. Образование окончательно собранных SNARE-комплексов с участием везикулярных синаптотагминов и взаимодействие именно этих синаптотагминов с synprint обеспечивает отмену негативного влияния t-SNARE на  $\text{Ca}_v2.1$ . Это способствует открытию  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, входу через них ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , взаимодействию последних с синаптотагминами и в конечном итоге увеличению вероятности выброса ( $p$  – probability) докированных вблизи этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов синаптических везикул [74, 76]. Совсем недавно появились данные о взаимодействии медленного, высокоаффинного синаптотагмина-7 с synprint-сайтом  $\text{Ca}_v2.1$ , что модулирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую фасилитацию (CDF) и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую инактивацию (CDI) канала, обеспечивая в конечном итоге кратковременное облегчение квантовой секреции и асинхронный выброс нейротрансммиттера в синапсах ЦНС [76–78].

Взаимодействие t-SNAREs с сайтом synprint контролируется фосфорилированием synprint  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми ферментами – протеинкиназой C (PKC) и кальций-кальмодулин-зависимой киназой II типа (CaMKII) [79, 80]. Кроме того, не только synprint, но и другие участки в составе  $\alpha 1A$ -субъединицы  $\text{Ca}_v2.1$  могут функционально взаимодействовать со SNARE-белками, расширяя таким образом возможности регуляторных воздействий со стороны  $\text{Ca}_v2.1$  на процесс запуска нейротрансмиссии [81].

#### *Регуляция $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: ионы $\text{Ca}^{2+}$ и кальмодулин (CaM)*

Вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , изменяя их цитоплазматическую концентрацию около  $\text{Ca}_v2.1$ , влияет не только на экзоцитоз синаптических везикул, но и на активность самих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Это происходит за счет стимулирования  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков и прежде всего CaM. Внутриклеточный C-конец  $\alpha 1A$ -субъединицы несет два функционально

важных участка, обеспечивающих ее взаимодействие с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками – IQ-подобным мотивом (IM) и CaM-связывающим доменом (CBD). При увеличении локальной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  связывающие его белки сначала взаимодействуют с участком IM, инициируя CDF, обеспечивая развитие кратковременного облегчения синаптической передачи в НМС мышцы. В случае длительного (глобального) повышения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  CaM, связывая больше ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , взаимодействует и с CBD, индуцируя CDI  $\text{Ca}_v2.1$  [82–84]. Эти данные свидетельствуют о том, что регулирование активности триггерных  $\text{Ca}_v2.1$  с помощью CaM и других  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков может играть одну из ключевых ролей в механизмах кратковременной пластичности в моторных синапсах.

*Регуляция  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: пресинаптические метаботропные рецепторы и G-белки*

Модулирование активности  $\text{Ca}_v2.1$  не исчерпывается их взаимодействием с белками SNARE-комплекса и  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками. Еще один путь регуляции работы  $\text{Ca}_v2$  – их ингибирование за счет активности G-белок-сцепленных рецепторов, связанных с  $G_i/G_o$ -белками. Такое ингибирование  $\text{Ca}_v$  реализуется за счет замедления их активации и опосредуется непосредственным взаимодействием  $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка с определенными участками на N- и C-концах, а также на цитоплазматической петле между I и II доменами  $\alpha 1$ -субъединиц  $\text{Ca}_v2$ -каналов при необходимом участии  $\beta$ -субъединицы [85, 86].

$G_{\beta\gamma}$ -опосредованное ингибирование  $\text{Ca}_v2$  является потенциал-зависимым, поскольку его влияние на работу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов может быть значительно снижено при сильной и/или повторяющейся деполяризации мембраны, что вызывает уход  $G_{\beta\gamma}$ -субъединиц от  $\text{Ca}_v$  [85]. В НМС млекопитающих такой способ регуляции активности триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа принципиально может функционировать в случае активации и запуска сигнальных путей со стороны пресинаптических метаботропных  $G_i$ -белок-сцепленных аденозиновых  $A_1$ - и  $A_3$ -рецепторов [87, 88], пуриновых P2Y<sub>13</sub>-рецепторов [89, 90] и мускариновых M2-рецепторов [91].

*Регуляция  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: пресинаптические ферменты*

Существует еще один возможный способ модулирования активности в НМС  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа – за счет их фосфорилирования различными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимыми протеинкиназами, как это показано для ряда центральных синапсов и в гетерологичных экспрессирующих системах [92]. Среди потенциальных кандидатов, способных оказывать влияние на работу P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, можно рассматривать цАМФ-зависимую протеинкиназу А (РКА), различные пресинаптические изоформы РКС и CaMKII.

В зависимости от результата альтернативного сплайсинга получающиеся белковые продукты  $\alpha 1A$ -субъединицы  $\text{Ca}_v2.1$  могут дифференцированно фосфорилироваться РКА или РКС [93]. В ЦНС активация  $G_s$ -белок-сцепленных рецепторов, стимулирующих аденилатциклазу и РКА, обеспечивает усиление  $\text{Ca}_v2.1$ -опосредуемых  $\text{Ca}^{2+}$ -токов [94]. Предполагается, что РКА может модулировать активность  $\text{Ca}_v2.1$  не напрямую, а противодействуя негативному влиянию на канал мембранного фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата, сдвигающего потенциал-зависимость активации  $\text{Ca}_v2.1$  в сторону более деполяризованного МП [95, 96]. Активация РКС может приводить к фосфорилированию  $G_{\beta\gamma}$ -связывающего сайта в I-II линкерном участке  $\text{Ca}_v2.1$ , противодействуя таким образом G-белок-опосредованному торможению  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [97]. В НМС крысы активация РКА и РКС и последующее потенцирование одиночной вызванной секреции квантов АХ зависит от функционирования P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Это позволяет

рассматривать  $\text{Ca}_v2.1$ -каналы как возможную мишень, обеспечивающую регуляторное действие этих протеинкиназ на секрецию АХ в НМС млекопитающих [98].

Согласно данным, полученным при экспрессии  $\text{Ca}_v2.1$  в клеточных линиях и их активности в нервных терминалах пирамидальных нейронов гиппокампа, потенцировать работу этого типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, замедляя развитие их потенциал-зависимой инактивации, способна СаМКП. Причем оказалось, что модулирующая роль СаМКП обеспечивается самой ее посадкой на С-конец  $\alpha 1$ -субъединиц  $\text{Ca}_v2.1$ , а не ее каталитической активностью [79]. Связывание СаМКП с  $\text{Ca}_v2.1$  обеспечивает усиление активности самой СаМКП за счет увеличения ее аутофосфорилирования  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым способом [99]. Такая связанная с  $\text{Ca}_v2.1$  СаМКП способна фосфорилировать синапсины, снижая уровень связи синаптических везикул в резервном или рециклирующем пулах с актиновым цитоскелетом, что способствует восполнению RRP при высокочастотной и/или длительной активности синапсов [100].

### *Пресинаптические $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа и создание в активных зонах $\text{Ca}^{2+}$ -доменов*

Срабатывание в течение определенного (обычно короткого) промежутка времени  $\text{Ca}^{2+}$ -входа вызывает появление в цитоплазме нервной терминали локализованного и достаточно короткоживущего увеличения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{Ca}^{2+}$ -домена.

Пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -домены можно разделить на два типа. Первый – нанодомен, своеобразная «струя» ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в высокой концентрации, возникающая в цитоплазме в результате открытия одиночного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (или иного источника ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервной терминали). Нанодомен возникает и прекращается практически мгновенно при открытии и закрытии  $\text{Ca}^{2+}$ -канала (микросекунды) и имеет достаточно однородный концентрационный профиль с центром в устье канала. Данные  $\text{Ca}^{2+}$ -имиджинга свидетельствуют, что концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в таком нанодомене может достигать сотен микромолей [101], но только в нескольких десятках нм от устья  $\text{Ca}^{2+}$ -канала, а на больших расстояниях – резко снижается до 1 мкМ [102].

Второй тип  $\text{Ca}^{2+}$ -домена – микродомен – может возникать в результате перекрывания отдельных нанодоменов кластера открывающихся вблизи друг от друга  $\text{Ca}^{2+}$ -входов. Данный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал – его размер, продолжительность существования и концентрационный профиль – достаточно вариабелен, поскольку будет определяться количеством  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в их кластере и их взаимном пространственном расположении, а также флуктуациями их перехода из открытого состояния в закрытое [103, 104].

Таким образом, когда быстрый запуск секреции медиатора осуществляется с использованием нанодомена, необходимо расположение одного (или небольшого количества)  $\text{Ca}^{2+}$ -входов в непосредственной близости от синаптической везикулы (на расстоянии порядка 10–20 нм) – тогда везикула будет практически «омываться» входящим потоком ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Разобщить такой  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал способен только  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер с быстрой кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  – 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ВАРТА) [46, 105, 106]. При формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -микродомена, когда расстояние от источников ионов  $\text{Ca}^{2+}$  до готовых к выбросу синаптических везикул превышает 20 нм (100 нм – 1 мкм), необходимо срабатывание большего числа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и подъем концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , при котором возможен запуск экзоцитоза более удаленных везикул. При этом не только ВАРТА, но и  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер с более медленной кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  – этиленгликоль-бис(β-аминоэтил)-N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (EGTA) – способен эффективно конкурировать с везикулярными синаптотагминами за свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  [3, 103, 107]. Исследование сопряжения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в районе активных зон и секреции нейротранмиттера в разных синапсах показало, что имеет место континуум разных расстояний и геометрии расположения  $\text{Ca}^{2+}$ -входов по отношению к синаптическим везикулам как в отдельных синапсах, так иногда и в пределах одного синапса [108–111].

В настоящий момент считается, что сопряжение входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и синаптогамина в НМС млекопитающих – очень тесное, то есть обеспечивается  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодоменом протяженностью порядка 20 нм [29, 43, 44].

В отличие от НМС лягушки, где количество триггерных  $\text{Ca}_v2.2$  на везикулу, докированную в активной зоне, не превышает 2, в НМС млекопитающих это соотношение может достигать 4 [44, 112]. Кроме того, в НМС млекопитающих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы теснее сопряжены пространственно с синаптическими везикулами, что, по всей видимости, обеспечивает более высокую вероятность выброса АХ и меняющийся характер синаптической пластичности при ритмической активности в НМС млекопитающих по сравнению с таковыми у холоднокровных. При этом в НМС млекопитающих, несмотря на высокое количество мест, откуда может осуществляться экзоцитоз синаптических везикул (500–900 активных зон, каждая содержит две везикулы – итого около 1000–1800 потенциальных мест выброса АХ), квантовый состав постсинаптических потенциалов концевой пластинки (ПКП) составляет всего от 20 до 80, в зависимости от экспериментальных процедур, используемых при регистрации и анализе данных электрофизиологических сигналов. Это свидетельствует о низкой вероятности выброса квантов АХ (порядка 3–5% на везикулу).

*Гетерогенность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимости вероятности выброса синаптических везикул и ее связь с локализацией пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа*

Биномиальный анализ секреции АХ в НМС мыши показал, что вероятность выброса квантов АХ достаточно высока (около 0,9), однако число мест секреции оказалось довольно низким (около 70) [113]. Это резко противоречит вышеприведенным данным о количестве активных зон в моторной нервной терминали и числе синаптических везикул, потенциально готовых к выбросу в них, если не допускать, что значительное большинство активных зон в составе НМС «молчит», и лишь небольшое их количество (меньше 10–20%) принимает участие в вызванной приходом пресинаптического ПД быстрой квантовой секреции АХ. Такая гетерогенность вероятности выброса АХ между активными зонами может быть связана с разной чувствительностью аппаратуры экзоцитоза синаптических везикул к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в отдельных активных зонах, что, возможно, определяется разным положением  $\text{Ca}^{2+}$ -входов ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа) по отношению к везикулам [114].

Косвенно о том, что вероятность выброса в НМС млекопитающих реально не приближена к 1, а гораздо ниже при небольшом числе функционирующих активных зон, говорят исследования кратковременной пластичности при высокочастотной ритмической активности НМС. Если секреция АХ осуществляется из небольшого числа активных зон с очень высокой вероятностью выброса, следует ожидать сильную кратковременную депрессию передачи по ходу залпа за счет преобладания истощения RRP над рекрутированием синаптических везикул из других пулов к активным зонам, что, однако, не наблюдается в экспериментах. Наоборот, при короткой высокочастотной активности моторных синапсов сначала наблюдается выраженное облегчение синаптической передачи, и затем следует депрессия [47, 106, 114]. Таким образом, либо вероятность выброса квантов АХ из каждой отдельной активной зоны очень низка, либо после первого стимула в коротком залпе последующие ПД приводят к экзоцитозу синаптических везикул из набора активных зон, отличных от задействованных в выбросе АХ при первом ПД в залпе (последнее нуждается в строгом экспериментальном подтверждении).

Выявленное в моторных терминалях млекопитающих значительное число отдельно расположенных и независимых друг от друга активных зон неизбежно порождает вопрос о гомогенности их секреторной активности для обеспечения надежной и достаточно эффективной нервно-мышечной передачи. Имеется ли и какова допустимая степень гетерогенности вероятности выброса квантов АХ между активными зонами в НМС? При использовании везикулярных оптических зондов слияния синаптических

везикул в НМС мышцы было установлено, что при высокочастотной активности моторных терминалей экзоцитоз синаптических везикул по ходу ритмического залпа начинается преимущественно происходить в определенных кластерах активных зон, названных «горячими точками» [115–117]. Такие данные свидетельствуют в пользу того, что выброс АХ в моторной нервной терминали при физиологических режимах ее работы может преимущественно осуществляться в определенном наборе активных зон, где происходит повышенное рекрутирование резервных везикул, в то время как оставшаяся часть активных зон остается функционально «молчащей» [44, 47, 118].

Число мест в моторной нервной терминали, где происходит вызванная пресинаптическими ПД секреция АХ, зависит от частоты стимуляции терминали [115]. Более того, оценка размера RRP – общего числа докированных везикул, содержимое которых может выбрасываться при ритмической активности НМС, выявила зависимость этого параметра от частоты стимуляции [43, 47, 118]. Это также свидетельствует в пользу того, что в НМС млекопитающих, видимо, существуют «молчащие» активные зоны, часть из которых вовлекается в секрецию АХ при переходе от одиночной или низкочастотной активности к высокочастотной. Такое вовлечение недавно было показано в НМС дрозофилы [119].

Таким образом, с функциональной точки зрения НМС млекопитающих представляет собой большой, одиночный и самое главное надежный в плане обеспечения передачи сигнала синаптический контакт, построенный из сотен «ненадежных» активных зон с преимущественно низкой вероятностью выброса АХ [29, 48, 105]. Низкая вероятность выброса АХ обеспечивает надежность синаптической передачи во время ритмической активности НМС, поскольку в этом случае активные зоны не вовлекаются в секрецию слишком часто, предотвращая развитие мощной депрессии нервно-мышечной передачи за счет быстрого массивированного истощения RRP, не компенсируемого восполнением за счет рекрутирования резервных синаптических везикул. Активно обсуждается вопрос – в чем причина такой низкой вероятности секреции медиатора в отдельных активных зонах НМС млекопитающих?

Количество триггерных  $Ca_v2.1$  в активных зонах НМС млекопитающих невелико, а вероятность их открытия, зависящая от пространственно-временных характеристик деполяризации пресинаптической мембраны, создаваемой коротким (~1 мс) пресинаптическим ПД, также, скорее всего, низка – около 0.2 [46, 64]. Об этом свидетельствуют как данные о вероятности открытия триггерных  $Ca^{2+}$ -входов в ответ на пресинаптический ПД в НМС лягушки [120] и в синапсе *Calyx of Held* [121], так и моделирование динамики квантовой секреции АХ в НМС мышцы с учетом особенности архитектуры и взаиморасположения его активных зон [29, 122].

Таким образом, в ответ на генерацию пресинаптического ПД в каждой отдельной активной зоне возможно открытие одного (или совсем небольшого) числа потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, способных обеспечить вход ионов  $Ca^{2+}$ , достаточный для запуска слияния синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. Однако реальные случаи экзоцитоза (исходя из вышеописанных условий срабатывания  $Ca^{2+}$ -каналов и взаимодействия  $Ca^{2+}$ -сигнала с синаптической везикулой) будут возникать с очень низкой вероятностью.

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ $Ca^{2+}$ -КАНАЛЫ N- И R-ТИПОВ ( $Ca_v2.2$ И $Ca_v2.3$ ) И ИХ РОЛЬ В МОТОРНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ

R/Q-тип  $Ca^{2+}$ -каналов – ключевой, но отнюдь не единственный потенциал-зависимый  $Ca^{2+}$ -вход в моторных нервных терминалях млекопитающих.

В неонатальных НМС крыс и мышей показано, что наряду с  $Ca_v2.1$ , блокируемыми  $\omega$ -агатаксином IVA, экспрессируется и принимает участие в запуске выброса АХ

и блокируемый  $\omega$ -конотоксином GVIA N-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов ( $\text{Ca}_v2.2$ ), хотя сопряжение этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа с секрецией АХ было слабее, чем у  $\text{Ca}_v2.1$ . Это связывают с более удаленным расположением  $\text{Ca}_v2.2$  от синаптических везикул [123–126].

Что касается зрелых НМС, то долгое время считалось, что там вклад в регуляцию секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, отличных от  $\text{Ca}_v2.1$ , проявляется либо при особых экспериментальных условиях, либо при патологиях, затрагивающих  $\text{Ca}_v2.1$  [28]. Генетическая элиминация каналов  $\text{Ca}_v2.1$  у мышей вызывала быстро прогрессирующие неврологические синдромы, приводящие к утрате способности передвигаться и гибели животных на самых ранних этапах постнатального развития. При этом возможность нервно-мышечной передачи сохранялась, однако в электрофизиологических экспериментах в моторных синапсах у таких мышей отмечались сильные нарушения быстрой мультиквантовой синхронной секреции АХ и кратковременной пластичности – сниженный по сравнению с диким типом квантовый состав ПКП, увеличенная вариабельность задержек синаптической передачи (что свидетельствует о десинхронизации выброса АХ) и угнетение парной фасилитации. Функции отсутствующего P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в таких случаях берут на себя  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы N- и R-типов, но полностью компенсировать тотальную утрату основного триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа эти типы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов не могут [61, 127]. Подобные компенсаторные подключения к контролю секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов N- и R-типов в НМС млекопитающих отмечены и при определенных мутациях, затрагивающих как каналообразующую  $\alpha 1A$ -субъединицу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа [18, 20], так и регуляторную  $\beta$ -субъединицу [59].

В последнее время появляются экспериментальные данные, свидетельствующие об участии N- и R-типов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляции как спонтанной, так и вызванной квантовой секреции АХ в нормальных зрелых НМС млекопитающих, обеспечивая там определенный уровень синхронизации выброса нейротрансмиттера [128].

Кроме того, в моторных нервных терминалях млекопитающих, наряду с N- и R-типами потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, показана экспрессия и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа [19].

## НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ $\text{Ca}^{2+}$ -КАНАЛЫ L-ТИПА ( $\text{Ca}_v1.2$ И $\text{Ca}_v1.3$ ) И ИХ СВОЙСТВА

Семейство  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в настоящее время включает в себя 4 подтипа ( $\text{Ca}_v1.1$ – $1.4$ ), имеющих около 70% идентичности каналообразующих  $\alpha 1S$ -F субъединиц. Представители данного семейства были первоначально названы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа по результатам ранних исследований на кардиомиоцитах и нейронах – благодаря опосредуемым этими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами при деполяризации мембраны долго длящимся входящим  $\text{Ca}^{2+}$ -токам с медленной кинетикой спада (long-lasting), что позволило отделить их от короткоживущих (transient)  $\text{Ca}^{2+}$ -токов через  $\text{Ca}_v3$  [129, 130].

Особенностью L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, отличающей его от всех остальных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, является его чувствительность к органическим модуляторам (преимущественно блокаторам) трех химически различающихся видов: дигидропиридинам, фенилалкиламинам и бензотиазепинам. Данные соединения, такие как соответственно нитрендипин, верапамил и дилтиазем, а также их многочисленные структурные аналоги не только являются излюбленным фармакологическим инструментом для работы с данными  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами (и опосредуемыми ими  $\text{Ca}^{2+}$ -токами) *in vitro*, но и широко используются много лет в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [23, 131]. Выделение, гомологичное клонирование и исследование биохимических характеристик субъединиц  $\text{Ca}_v1$  показало, что в скелетных мышцах экспрессируется изоформа  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Ca}_v1.1$ , кодируемая геном *SACNAIS*. В нейронах, кардиомиоцитах, хромоаффинных клетках надпочечников были выявлены другие изоформы  $\alpha 1$ -субъединицы –  $\text{Ca}_v1.2$

(CACNA1C) и  $Ca_v1.3$  (CACNA1D). В сетчатке выявлена экспрессия отдельной изоформы  $\alpha 1$ -субъединицы –  $Ca_v1.4$  (CACNA1F) [132], которая, обладая ограниченной инактивацией, обеспечивает постоянную работу  $Ca^{2+}$ -канала и поддерживает пролонгированную секрецию глутамата в ленточных синапсах фоторецепторов.

Все 4 подтипа  $Ca_v1$  обладают сходной чувствительностью к фармакологическим агентам – до сих пор отсутствуют изоформ-специфические модуляторы их активности [133, 134]. При этом подтипы  $Ca_v1$  различаются по представленности в тканях и биофизическим характеристикам.  $Ca_v1.1$  и  $Ca_v1.4$  имеют очень ограниченный паттерн экспрессии – скелетные мышечные волокна и сетчатка соответственно.  $Ca_v1.2$  и/или  $Ca_v1.3$  экспрессируются в большинстве электровозбудимых клеток и часто – совместно в одних и тех же клетках. Обе эти изоформы каналов необходимы для нормального функционирования мозга и играют каждый определенную роль в сердечно-сосудистой и эндокринной системах [10, 21].

Несмотря на высокую степень структурного сходства их каналообразующих  $\alpha 1$ -субъединиц и чувствительности к блокаторам, изоформы  $Ca_v1.2$  и  $Ca_v1.3$  различаются по особенностям работы воротного механизма образуемых ими  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, вовлеченности в различные белок-белковые регуляторные взаимодействия и по механизмам тонкой настройки их работы в результате альтернативного сплайсинга [10, 133]. Так, нейрональные каналы  $Ca_v1.3$  активируются при более высоких (негативных) значениях МП (на 9–25 мВ) и медленнее инактивируются, чем  $Ca_v1.2$  [135–137].

Инактивация  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа – важнейший процесс, необходимый для тонкого регулирования входа ионов  $Ca^{2+}$  в клетку. Специфической особенностью инактивации  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа является ее очень медленная кинетика, приводящая к пролонгированному снижению  $Ca^{2+}$ -тока в ответ на деполяризацию мембраны. Инактивация  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа может обеспечиваться за счет функционирования нескольких механизмов.

Потенциал-зависимая инактивация («в чистом виде») ее исследуют при экспрессии  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в клеточных системах и замене  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$ ) включает в себя несколько процессов с разной кинетикой развития и участием нескольких сайтов в составе  $\alpha 1$ -субъединиц  $Ca_v1.2$  и  $Ca_v1.3$ . Это цитозольные концы S6-сегментов, N- и C-концы, участок линкерной петли между доменами II и III, а также линкерная петля между I и II доменами, служащая инактивационной створкой [138–140]. Наряду с потенциал-зависимой инактивацией, у каналов, образованных  $Ca_v1.2$  и  $Ca_v1.3$  (так же, как и у  $Ca_v2.1$ ), ярко выражена CDI [139].

CDI  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа реализуется за счет конформационных перестроек, затрагивающих многие участки каналообразующих  $\alpha 1$ -субъединиц при взаимодействии определенных аминокислотных мотивов их C-концов с CaM, который служит  $Ca^{2+}$ -сенсором [141–143]. Наличие CDI у L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов обеспечивает таким образом тонкий ауторегуляторный механизм лимитирования входа ионов  $Ca^{2+}$  по этим каналам [144].

$Ca^{2+}$ -каналы L-типа располагают еще одним  $Ca^{2+}$ -зависимым механизмом регуляции – CDF. CDF проявляется в увеличении вероятности нахождения  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в открытом состоянии при продолжительной или повторяющейся активности. Данное усиление  $Ca^{2+}$ -входа реализуется с участием CaM и CaMKII [145–147].

Управление воротным механизмом (как активации, так и инактивации) каналов, образованных  $Ca_v1.2$  и  $Ca_v1.3$ , контролируется белок-белковыми взаимодействиями между участками C-конца канала [143]. При этом конкретные электрофизиологические характеристики  $Ca^{2+}$ -токов L-типа в местах их функционирования в значительной степени будут определяться тканеспецифическим альтернативным сплайсингом, затрагивающим в результате многие важные структурные компоненты  $\alpha 1$ -субъединицы, участвующие как в активации и инактивации каналов, так и в различных механизмах регуляции этих процессов [148, 149].

Важную регулирующую роль, определяющую характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -токов и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, обеспечиваемых  $\text{Ca}_v1.2$  и  $\text{Ca}_v1.3$ -каналами, будут играть изоформы дополнительных субъединиц этих каналов –  $\beta$  и  $\alpha 2\text{-}\delta$  [150, 151].

$\text{Ca}^{2+}$ -индуцированные физические взаимодействия между С-концами  $\alpha 1$ -субъединиц  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, кластрированных в непосредственной близости друг от друга, потенцируют вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет увеличения активности соседних каналов, усиливая кооперативным образом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал в возбудимых клетках [152].

Таким образом, вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через нейрональные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа может регулироваться с использованием сигнальных механизмов, устроенных по принципу прямой и обратной связи.

#### *Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в пост- и пресинаптических структурах синапсов ЦНС*

Каналы  $\text{Ca}_v1.2$  и  $\text{Ca}_v1.3$  широко экспрессируются в мозге. Для обеих изоформ характерна преимущественная постсинаптическая дифференцированная сомато-дендритная локализация, где этот  $\text{Ca}^{2+}$ -вход является основополагающим для запуска электро-транскрипционного сопряжения с участием CaM, CaMKII и митоген-активируемых протеинкиназ [153–155]. Электро-транскрипционное сопряжение с ключевым участием именно  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в постсинаптических структурах дендритов и сомы нейронов трансформирует паттерны синаптической активности в ремоделирование нейронов и их участков. Данный процесс лежит в основе нейронального развития, обучения, формирования разных типов памяти и привыкания к лекарственным и наркотическим веществам [10, 156]. Регуляция транскрипционной активности обеспечивается за счет формирования на С-конце  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего якорные и каркасные белки цитоскелета, например, АКАР (A-kinase anchoring protein), а также ферменты, участвующие в сигнальных каскадах, такие как РКА и кальцинейрин (CaN), модулирующие входящий  $\text{Ca}^{2+}$ -ток по этим каналам [154, 157, 158].

Хорошо известно участие постсинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в индукции, экспрессии и поддержании различных форм синаптической пластичности [159–161] и регуляторного контроля спайковой и осцилляторной активности нейронов в разных отделах ЦНС [162–164].

Долгое время считалось, что в синапсах ЦНС, где доминируют быстрые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q- и N-типов, на пресинаптической мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа или практически отсутствуют [165], или, за редким исключением [9, 166], не участвуют в запуске секреции нейротрансмиттеров (в ходе базальной активности) [2, 167]. Однако за последние 10–15 лет постепенно появляются свидетельства как о присутствии разных изоформ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в нервных терминалях синапсов ЦНС [168, 169], так и о вовлечении этих каналов в реализацию разных форм пластичности во многих синапсах ЦНС именно на пресинаптическом уровне (в нормальных условиях и при патологиях) [170–172].

Тем удивительнее выглядят накопленные в литературе за последние десятилетия данные о присутствии и активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в НМС и их способности эффективно и специфически регулировать секрецию АХ при определенных функциональных состояниях и режимах активности синапсов.

#### *Потенциал-зависимые $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа ( $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$ ) в нервных терминалях НМС млекопитающих*

Исследование L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в НМС млекопитающих и их возможный вклад в регуляцию секреции АХ продолжается с конца 80-х годов XX века. Оно началось с использования в качестве агониста (активатора) этих каналов дигидропиридина S(-)

Vau K8644, который в субмикромольных концентрациях вызывал увеличение амплитуды и квантового состава одиночных многоквантовых ПКП в диафрагмальных синапсах крысы и мыши, что предотвращалось или реверсировалось блокатором L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нимодипином, который сам не оказывал влияния на вызванную секрецию АХ [173].

Экспрессия L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в НМС млекопитающих показана не только с помощью фармакологических воздействий в сочетании с электрофизиологией, но и с использованием иммуногистохимических методов. В 2004 г. было представлено первое безусловное доказательство наличия в НМС млекопитающих – и в здоровых зрелых нервных терминалях, и в НМС мышей с нокаутом  $\text{Ca}_v2.1$  –  $\alpha 1\text{D}$ -субъединицы ( $\text{Ca}_v1.3$ ), но не  $\alpha 1\text{C}$ -субъединиц ( $\text{Ca}_v1.2$ ) [19]. В более поздней работе на диафрагме крыс была выявлена экспрессия и  $\alpha 1\text{C}$ -субъединицы ( $\text{Ca}_v1.2$ ), причем значительная только у новорожденных и уменьшающаяся в ходе постнатального онтогенеза [174]. Выраженная экспрессия  $\alpha 1\text{D}$ -субъединицы ( $\text{Ca}_v1.3$ ) обнаружена и в созревающих, и в зрелых НМС мыши [175]. Используемые иммуногистохимические методы, конечно, не дают ответа на вопрос о точной локализации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа по отношению к активным зонам.

Учитывая низкий порог активации нейрональных изоформ, особенно у  $\text{Ca}_v1.3$ , и то, что эти каналы могут находиться в открытом состоянии дольше, чем триггерные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа, можно было бы ожидать появления опосредуемого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа выраженного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала при деполяризации моторных терминалей, потенциально способного влиять на секрецию квантов АХ. С таким предположением согласуются ранние данные электрофизиологических экспериментов о вовлечении L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в обеспечение уровня спонтанной секреции квантов АХ в НМС крысы. Нифедипин (дигидропиридиновый блокатор L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) вызывал уменьшение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки при нормальных внеклеточных концентрациях ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , но не в условиях  $\text{K}^+$ -деполяризации [176]. Предполагается, что вклад L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (наряду с другими типами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов) в поддержание уровня именно спонтанной секреции обеспечивается за счет возможности их стохастического открывания при значениях МП около ПП [128].

При этом уже пионерские работы постулировали, во-первых, неучастие пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляции вызванной квантовой секреции АХ в нормальных условиях [177, 178] и, во-вторых, наличие принципиальной способности у этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа при его принудительной прямой активации потенцировать выброс АХ в НМС млекопитающих [173, 179]. «Замаскированность»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и отсутствие вовлеченности этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию вызванного выброса АХ в НМС млекопитающих как при их одиночной, так кратковременной ритмичной стимуляции многократно подтверждались во многих дальнейших экспериментах разными научными коллективами, в том числе и нами [128, 174, 180, 181]. Нужно отметить, что в последнее время начинает рассматриваться мнение об относительно слабом участии  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в работе НМС млекопитающих в нормальных условиях [182], что никак не оспаривает доминирующую триггерную роль каналов  $\text{Ca}_v2.1$  в индукции экзоцитоза синаптических везикул, вызванного деполяризацией мембраны.

*$\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в нервных терминалях развивающихся, новообразованных при реиннервации и находящихся в патологических условиях моторных синапсов*

Эксперименты на развивающихся и новообразованных НМС, формирующихся на мышечных волокнах в ходе их реиннервации, показали, что в нервных терминалях таких нервно-мышечных контактов, во-первых, имеет место активация L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, а во-вторых, их вовлечение и в регуляцию секреции АХ, и в проведение ПД в таких моторных терминалях [183]. Однако данные о роли  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляции секреции АХ в развивающихся и новообразованных синапсах неоднознач-

ны. Отмечается как отсутствие влияния L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на секрецию АХ в таких синапсах [184], так и возможный позитивный вклад этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в функционирование незрелых моторных синапсов [183, 185]. Описано и негативное воздействие активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, тормозящее вызванную квантовую секрецию АХ [125, 186, 187], или десинхронизирующее ее (в условиях сниженной по сравнению с нормой внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ) [174]. Последний способ – уменьшение пресинаптического триггерного входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет уменьшения их наружной концентрации или частичного блокирования  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа, а также угнетение опосредуемого этими каналами инициирующего быструю синхронную секрецию квантов АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала за счет загрузки в нервные терминалы «быстрого»  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера в сочетании с ингибированием фосфатазы PP1 позволило выявить, во-первых, появление в таких условиях периневрального  $\text{Ca}^{2+}$ -тока, опосредуемого L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [188], а во вторых, демаскировать этот обычно «молчащий»  $\text{Ca}^{2+}$ -вход, зарегистрировав его участие в обеспечении квантовой секреции АХ в зрелых НМС млекопитающих [189].

Снижение опосредованного P/Q-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , наблюдаемое при экспериментальном моделировании развития синдрома Ламберта – Итона, также приводило к появлению в моторных нервных терминалах компоненты пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -токов, опосредуемых L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, и выявило их вовлечение в регуляцию квантовой секреции АХ [190, 191]. Аналогичная картина наблюдается при экспериментальном снижении внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в этих условиях вовлечение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в поддержание квантовой секреции АХ сопровождается ее десинхронизацией [192].

Таким образом, совокупность современных данных о последствиях подавления основного (по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов)  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в моторные нервные терминалы свидетельствует о том, что при нормальном функционировании НМС млекопитающих (в нормокальциевой наружной среде) и сохраняющейся активности триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа пресинаптические  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа, хотя и потенциально способны обеспечивать массиванный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную нервную терминаль млекопитающих, тем не менее не активны – по крайней мере, в отношении их вклада в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую регуляцию синхронной многоквантовой секреции АХ. Это неизбежно вызывает вопрос об их физиологическом назначении в нормально функционирующих НМС.

#### *Регуляция активности $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах млекопитающих*

Отсутствие проявлений регуляторных влияний L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую вызванную секрецию АХ у здоровых и зрелых НМС млекопитающих инициировало поиск факторов и сигнальных путей как подавляющих там эти каналы и препятствующих их участию в контроле над секрецией АХ, так и способствующих вовлечению этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию нервно-мышечной передачи. В настоящее время таких факторов насчитывается несколько.

В моторных синапсах мышцы  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{K}^+$ -каналы высокой проводимости (ВК-каналы) находятся в непосредственной близости от триггерных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа (входят в  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодомен) в составе белкового кластера активных зон [112]. Такой вывод был сделан в результате загрузки терминалей  $\text{Ca}^{2+}$ -буфером с быстрой кинетикой связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  – ВАРТА. В присутствии ВАРТА не наблюдалось активации  $\text{K}^+$ -тока, опосредуемого ВК-каналами: блокаторы ВК-каналов на фоне ВАРТА теряли способность вызывать облегчение секреции АХ [193]. Принято считать, что активация ВК-каналов входящим в терминаль  $\text{Ca}^{2+}$ -током во время нервного импульса, вызывая гиперполяризацию мембраны, ограничивает дальнейшее поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам по механизму отрицательной обратной связи [43]. Действительно, блокирование ВК-каналов в НМС мышцы сопровождается увеличени-

ем выброса АХ как в ответ на одиночный ПД [180], так и (в наших экспериментах) при короткой ритмической стимуляции [194, 195]. Важно, что такое потенцирование вызванной секреции АХ полностью предотвращалось предварительным блокированием L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Таким образом, роль ВК-каналов в активных зонах моторных нервных терминалей предназначена не для ограничения входящего  $\text{Ca}^{2+}$ -тока по триггерным каналам P/Q-типа, как считалось ранее, а в удержании в «молчащем» состоянии  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Механизм негативного влияния со стороны ВК-каналов на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа *in vivo* может быть связан с более медленной кинетикой активации этих каналов по сравнению с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами P/Q-типа [196] и, следовательно, зависимостью их активации от длительности пресинаптического ПД. Мы с уверенностью предполагаем, что в моторных синапсах млекопитающих существует взаимосвязь между активностью двух потенциал-управляемых  $\text{Ca}^{2+}$ -входов терминалей – через P/Q- и L-типы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, осуществляемая с участием ВК-каналов. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов под действием пресинаптического ПД активирует ВК-каналы. В свою очередь, их срабатывание предназначено для одновременного подавления активности L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. По-видимому, этот тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов играет роль резервного (страховочного)  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, необходимого для поддержания секреции АХ в условиях ослабления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа ( $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа). Выдвинутые нами представления подтверждаются и данными литературы, поскольку в случаях существенного ослабления активности P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в моторных терминалях мыши при миастенических синдромах [191] либо при длительной и интенсивной активности НМС [197] наблюдается компенсаторное растормаживание L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Помимо ВК-каналов, длительность ПД в моторных нервных терминалях, а значит, и возможность активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа может контролироваться пресинаптическими потенциал-зависимыми  $\text{K}^+$ -каналами преимущественно  $\text{K}_v3$ -типа, опосредующими калиевый А-ток. Присутствие этих каналов в моторных терминалях и их функциональная активность давно выявлены в многочисленных исследованиях с использованием аминопиридинов в качестве селективных блокаторов этого типа  $\text{K}^+$ -каналов [198, 199]. Блокаторы  $\text{K}_v3$ -каналов 4-аминопиридин и 3,4-диаминопиридин, вызывающие увеличение квантовой секреции АХ в НМС, рассматриваются в настоящее время как компоненты терапии, поддерживающей сниженную нервно-мышечную передачу при синдроме Ламберта – Итона и ряде других неврологических расстройств [64, 200, 201]. Считается, что это действие аминопиридинов связано с увеличением вероятности выброса квантов АХ за счет потенцирования входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторную терминаль при снижении потенциал-зависимой  $\text{K}^+$ -проводимости [179, 202]. Исследование возможного растормаживания именно L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов под действием близких к миллимолярным концентрациям аминопиридинов привело к неожиданному результату – подверглась сомнению сама их способность блокировать развитие пресинаптических потенциал-зависимых  $\text{K}^+$ -токов. Вместо этого в качестве нового механизма действия аминопиридинов предлагалось их прямое потенцирующее влияние на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы N- и L-типов [203], опосредуемое через взаимодействие с  $\text{Ca}_v\beta$ -субъединицей [204]. Такое непосредственное потенцирующее влияние аминопиридинов на активность дополнительных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов и в особенности клиническое значение такого влияния в настоящее время подвергаются критике [199, 205]. Тем не менее наши исследования с использованием 4-аминопиридина показывают способность L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов вовлекаться в контролирование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих при манипуляциях с потенциал-зависимой  $\text{K}^+$ -проводимостью [206].

Многочисленные данные свидетельствуют, что функционирование L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, как и других потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в НМС млекопитающих, может находиться под сильным управляющим контролем со стороны сигнальных путей,

запускаемых при активации многочисленных пресинаптических метаболитных рецепторов в работающих синапсах.

Анализ выделения меченного тритием АХ из моторных синапсов нервно-мышечного препарата, изменений флуоресценции липофильного красителя мембраны синаптических везикул (FM2-10) при стимуляции моторных синапсов и электрофизиологическая регистрация постсинаптических потенциалов концевой пластинки выявили, что  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа в моторных синапсах млекопитающих подвержены разнонаправленным влияниям со стороны компонентов пуринаргической системы. Активация пресинаптических аденозиновых  $A_1$ -рецепторов через торможение аденилатциклазы и фосфорилирующей активности РКА может приводить к ослаблению регуляторного фосфорилирования  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и торможению их функционирования. Это наблюдается при обычной залповой активности синапсов и образовании там соответствующих концентраций эндогенного аденозина [90, 207–210].

Пресинаптические мускариновые M2-рецепторы, преимущественно активируемые эндогенным АХ в моторных синапсах при их обычной работе, также могут оказывать аналогичное  $A_1$ -рецепторам тормозное влияние на L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [211–213].

Обсуждается комплексное взаимодействие пресинаптических мускариновых и аденозиновых рецепторов, направленное на тонкую регуляцию активности пресинаптических ферментов (РКА и РКС), способных потенциально менять функционирование пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -входов или компонентов машинерии экзоцитоза, регулируя таким образом квантовую секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих [214, 215]. О возможности регулирования работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в таких условиях комплексного контроля со стороны метаболитных рецепторов в НМС говорит присутствие в моторных терминалях якорного белка AKAP150 [216], необходимого для расположения в непосредственной близости от потенциальной мишени регуляторного воздействия РКА и РКС и их функционального антагониста – фосфатазы кальцинейрина (CaN). Мы установили, что CaN играет значимую роль в поддержании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в «молчащем» состоянии – равноценную таковой у BK-каналов и активностью метаболитных рецепторов [181, 195, 217].

Совсем недавно выявлено, что у метаболитных пуринорецепторов P2Y<sub>13</sub>, активируемых АТФ и в большей степени АДФ, присутствующих и негативно влияющих на квантовую секрецию АХ в НМС мыши [89, 90, 218], одной из мишеней являются  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа – при блокировании P2Y<sub>13</sub> данный  $\text{Ca}^{2+}$ -вход растормаживается, что приводит к характерному потенцированию вызванного выброса АХ [213].

Таким образом, в НМС млекопитающих L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов находится под мощным и разнообразным по природе тормозным контролем, в основе которого лежат как  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые факторы (BK-каналы и CaN), так и продублированные петли обратной связи, запускаемые со стороны пресинаптических эндогенно активируемых метаболитных рецепторов основного нейротрансмиттера (M2) и дериватов котрансмиттера – АТФ ( $A_1$  и P2Y<sub>13</sub>).

При этом не прекращаются поиски условий и механизмов, позволяющих превозмочь вышеописанный многоуровневый тормозной контроль и обеспечить вовлечение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляцию вызванного выброса АХ в НМС млекопитающих.

Выявлено, что при увеличении интенсивности и продолжительности синаптической активности (и возрастающей концентрации аденозина в синаптической щели) может происходить «растормаживание» L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [219]. Предполагается, что это реализуется вследствие сдвига баланса регуляторного действия аденозина от  $A_1$ -рецепторов в сторону преимущественной активации пресинаптических  $A_{2A}$ -рецепторов, стимулирующих аденилатциклазный сигнальный путь и облегчающих активацию L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [210, 220, 221]. Кроме того, показана возможность функционального взаимодействия  $G_q$ -белок-сцепленных мускариновых M1-рецепторов, стимули-

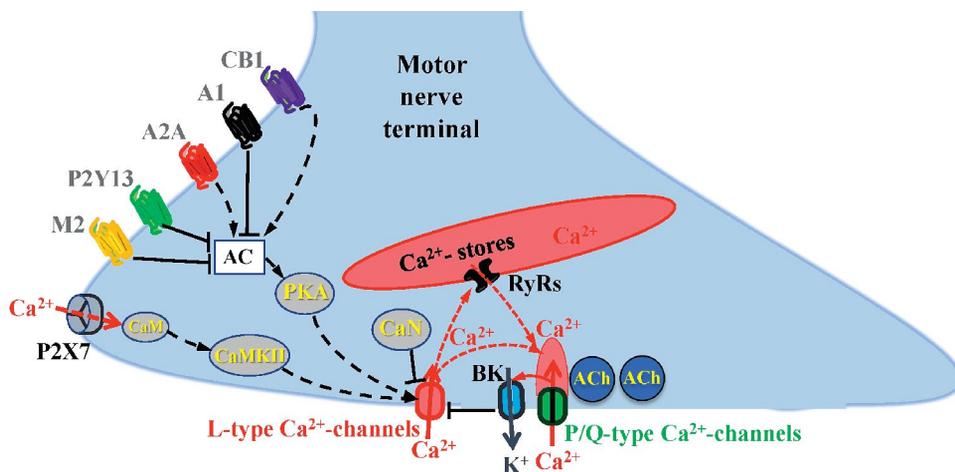
рующих активацию пресинаптической РКС, с  $A_{2A}$ -рецепторами в демаскировании L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов [222].

Такой сдвиг баланса активности  $A_1/A_{2A}$ -рецепторов в сторону PKA-опосредованного усиления активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов проявляется в моторных синапсах не только в норме как отражение изменений уровня аденозина в синаптической щели и его влияний на разные типы аденозиновых рецепторов, но может возникать в моторных синапсах и на модели бокового амиотрофического склероза в пресимптоматическую фазу [223, 224].

Мы обнаружили, что демаскирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов с последующим усилением нервно-мышечной передачи может происходить в результате селективного функционирования необычного синаптического  $Ca^{2+}$ -входа – ионотропных P2X7-рецепторов, активирующихся только АТФ в высоких концентрациях и обладающих значительной проводимостью для ионов  $Ca^{2+}$ . Механизм такого функционального сопряжения двух  $Ca^{2+}$ -входов обеспечивается активацией CaM и CaMKII за счет входа ионов  $Ca^{2+}$  через P2X7-рецепторы, с последующим CaMKII-зависимым усилением активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов [106, 225]. Активная CaMKII (наряду с PKA и РКС) требуется для проявления вовлечения L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в регуляцию квантовой секреции АХ в НМС млекопитающих [195].

Достаточно неожиданным, но мощным активатором пресинаптических  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в моторных синапсах млекопитающих оказался анандамид. Этот эндоканнабиноид через CB1-рецепторы неканоническим образом, стимулируя PKA (а не снижая ее активность, как это обычно происходит в синапсах ЦНС), вызывал растормаживание именно  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа и потенцирование квантовой секреции АХ [226–228].

Итак, обычно «молчащий» пресинаптический  $Ca^{2+}$ -вход через L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов находится под совокупным контролем целого ряда одновременно действующих как облегчающих, так и (обычно доминирующих) тормозных воздействий (рис. 1). Такая многокомпонентная регуляция  $Ca^{2+}$ -входа через L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов сходна с ранее описанной сложной и неоднозначной метаболической зависимостью активности L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов и в других возбудимых клетках [229, 230].



**Рис. 1.** Схема разнонаправленных влияний в нервной терминали НМС млекопитающих, контролирующих вовлечение L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в регуляцию квантовой секреции АХ. Черные пунктирные стрелки – активирующие влияния. Отрезки с плоским концом – тормозные влияния. Красные стрелки – потоки ионов  $Ca^{2+}$ . AC – аденилатциклаза.

Дублирование систем потенциальной негативной регуляции L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, вероятнее всего, связано с тем, что может различаться пространственно-временной паттерн появления в синаптической щели каждого из эндогенных активаторов (АХ, АТФ, АДФ и аденозина) разных типов метаболитных рецепторов (соответственно  $\text{M1-}/\text{M2-}$ ,  $\text{P2Y13}$  и  $\text{A}_1/\text{A}_{2\text{A}}$ ). Это позволяет создать в НМС комплексную и пролонгированную избирательную активацию сигнальных путей, функционирующих сходно либо параллельно (подавление РКА, активирование CaN), которые надежно препятствуют вовлечению  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ. При этом наличие регуляторных контуров не только для снижения активности аденилатциклазного сигнального каскада, но и подключение других сигнальных путей (за счет вероятной активации  $\text{M1-}$ ,  $\text{P2X7-}$ ,  $\text{A}_{2\text{A-}}$ , СВ1-рецепторов) позволяет потенциально не только препятствовать, но и промотировать (при определенных условиях) вовлечение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в регуляцию секреции АХ в НМС. Контур обратной связи для регуляции секреции нейротрансмиттеров с участием пресинаптических ауторецепторов хорошо известны и в синапсах ЦНС. Однако там они, как правило, обеспечивают тонкую настройку основного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа и функционирования ансамбля белков, обеспечивающего экзоцитоз синаптических везикул. В моторных терминалях аналогичные контуры, как выяснилось, могут быть нацелены на контроль не только и не столько триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, сколько на отслеживание активности дополнительного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа обычно «молчащих»  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Низкий порог активации этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и их пролонгированная  $\text{Ca}^{2+}$ -проводимость делает их принципиально легко вовлекаемыми в регуляцию работы нервных терминалей НМС. Именно поэтому, видимо, существуют множественные механизмы удерживания этих каналов от их активного включения в контролирование вызванной квантовой секреции АХ при нормальной работе НМС. В то же время предусмотренное «аварийное включение» именно L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в случае ослабления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа, сопровождающегося дефицитом секреции АХ и нервно-мышечной передачи, призвано поддержать секрецию АХ, причем, как оказалось, по собственным механизмам, не имеющим места при обычном функционировании выброса квантов АХ, запускаемого за счет входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по триггерному P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

*Особенности механизмов потенцирования квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих при демаскировании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа*

Влияние  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа на секрецию АХ при их демаскировании вышеописанными способами во время не одиночной, а более физиологически характерной для НМС ритмической вызванной активности имеет особый характер – единообразный симметричный прирост амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа [181, 225, 227]. При этом сохраняется неизменной выраженность всех трех фаз изменений амплитуд в залпе ПКП (начальное облегчение, депрессия и плато). Проведенный нами анализ с использованием последовательной модели [47] выявил, что такое характерное усиление секреции АХ при растормаживании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа связано не с увеличением вероятности выброса, как это наблюдается при усилении входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы P/Q-типа, а с возрастанием пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу (RRP) [225, 227] при высокочастотной ритмической активности НМС. Такое возрастание динамического параметра квантовой секреции АХ, как RRP, на наш взгляд, происходит за счет вовлечения в выброс АХ ранее «молчавших» активных зон.

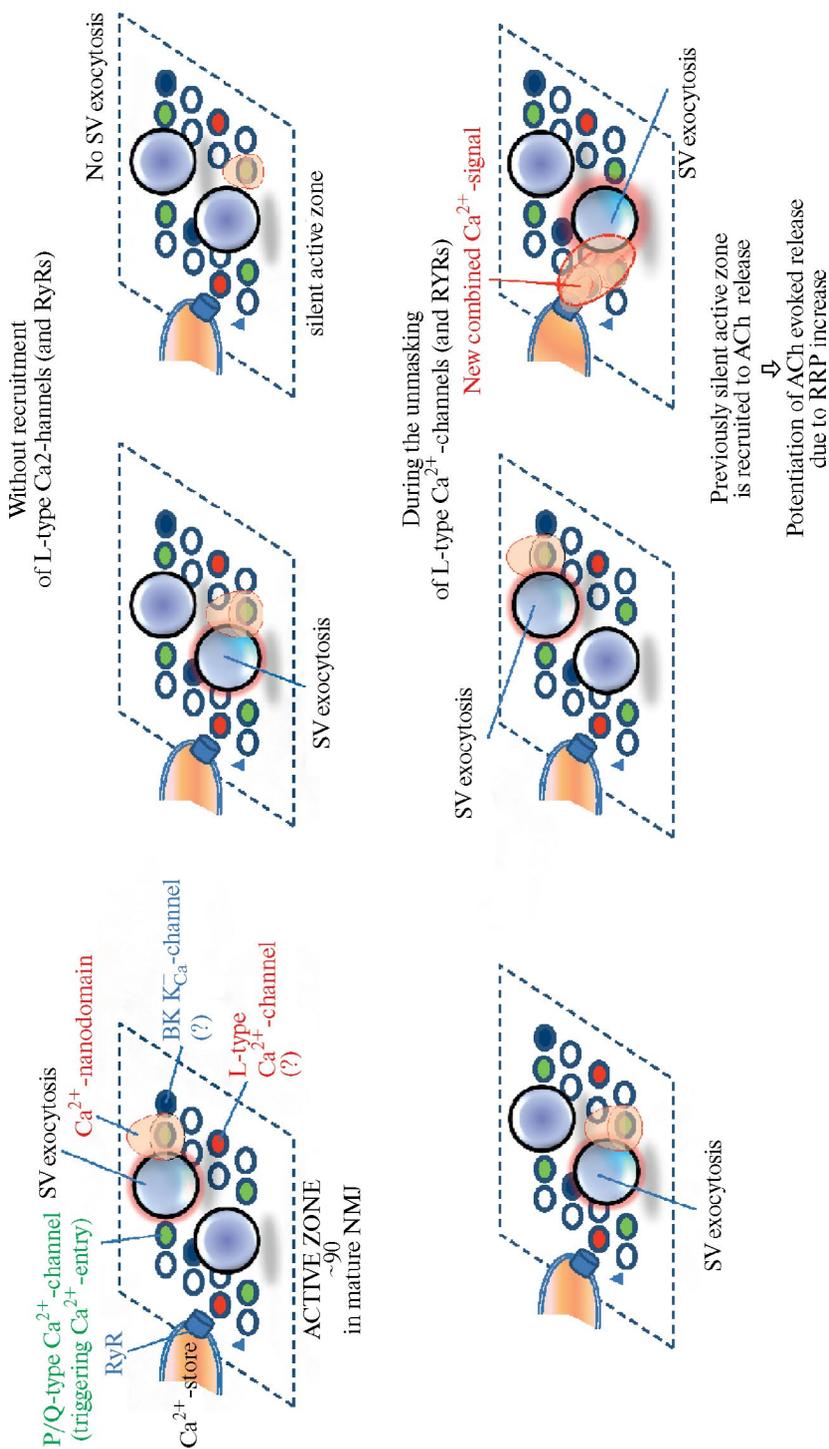
Необходимо было понять, происходит ли при демаскировании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа формирование нового  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала только за счет их активности, или, учитывая мощные негативные влияния на них и удаленность этих каналов от синаптических везикул, для вовлечения этого  $\text{Ca}^{2+}$ -входа в регуляцию секреции АХ требуется «усилитель  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала».

Наши исследования выявили, что при практически всех способах стимулирования входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в моторные нервные терминалы по пресинаптическим  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа – блокировании ВК-каналов, ингибировании  $\text{CaN}$  и  $A_1$ -рецепторов, активации  $A_{2A}$ -рецепторов и стимулировании РКС – происходит  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая активация пресинаптических риадиноновых рецепторов (РиР), необходимая для усиления (либо пространственного распространения)  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, формируемого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа [181, 194, 210]. Такое  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое подключение РиР и выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , генерируя новый, комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, способно обеспечить необходимую концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  для запуска экзоцитоза везикул, обычно не выбрасывающих АХ из-за недостаточной насыщаемости их  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , входящими снаружи. Это объясняет расширение пространственного диапазона доступных для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой секреции квантов АХ, что находит отражение в равномерном возрастании квантового состава ПКП по всему ходу короткого высокочастотного залпа именно за счет увеличения RRP, а не роста вероятности выброса при подключении в регуляцию секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (в комплексе с активацией РиР и выбросом депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ ). Такой комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, по-видимому, способен специфически усилить секрецию дополнительной популяции квантов АХ из ранее «молчавших» активных зон. Данный механизм отличен от реализуемого при входе ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Это позволяет выдвинуть новое, подкрепленное экспериментальными данными представление, согласно которому специфическое увеличение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет срабатывания функционального тандема «L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – РиР» может быть предназначено для вовлечения в секрецию АХ дополнительных, ранее «молчавших» активных зон и секреторируемых из них квантов АХ в ответ на достигающий моторной терминалы нервный импульс. Об этом свидетельствует возрастание значения RRP, но не вероятности выброса квантов АХ именно и только при активации (растормаживании разными способами) L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

Качественно подобный механизм усиления вызванной секреции нейротрансмиттера – за счет роста числа сайтов, участвующих в секреции квантов, а не возрастания вероятности выброса или размера квантов – недавно выявлен в созревающих ГАМКергических синапсах интернейронов зрительной коры мыши под действием эндоканнабиноидов [231]. НМС присуща низкая вероятность выброса квантов АХ, но при большом количестве активных зон в совокупности это обеспечивает достаточно высокое значение квантового состава ПКП [44, 47]. Такое сочетание структурных и функциональных особенностей позволяет предполагать, что в активных зонах значительное число потенциально доступных для выброса в ответ на приходящий ПД (и активацию входа в моторную терминалы ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ) синаптических везикул испытывает недостаток триггерного действия  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала из-за слабой «мощности» возникающих вблизи везикул  $\text{Ca}^{2+}$ -нанодоменов. Это может быть связано с низкой вероятностью открывания потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов P/Q-типа в ответ на короткий по длительности пресинаптический ПД [64]. Включение в активность моторных терминалей эффективно функционирующего тандема «L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов – РиР» в районе активных зон может дополнить недостающий уровень ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вблизи «молчавших» активных зон и расположенных там готовых к выбросу синаптических везикул (рис. 2) и тем самым вовлекать их в экзоцитоз. При этом в моторных терминалах нельзя исключить возможность прямой физической сцепки (характерной для триад в скелетных мышечных волокнах) между  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типа и РиР, опосредующей выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  [232].

Стабильность обеспечиваемого L-типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, вызывающего активацию РиР и выброс депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , может обеспечивать комбинированный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал и, как следствие, повышение размера RRP и обусловленное этим возрастание квантового состава (количества квантов) ПКП по всему ходу короткого



**Рис. 2.** Схема, иллюстрирующая механизм равномерного увеличения квантового состава ПҚП в ритмических высокочастотных залпах при растормаживании функционального тандема «L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов – РrР». Слева вверху представлены архитектура и вероятное расположение ионных каналов в активной зоне НМС млекопитающих. Демаскирование L-типа  $Ca^{2+}$ -каналов с обязательным участием РrР в качестве «усилителя»  $Ca^{2+}$ -сигнала приводит к вовлечению в секрецию АХ везикул из ранее «молчащих» активных зон (справа внизу). Знак ? означает не установленное точно расположение определенных ионных каналов в активных зонах НМС млекопитающих. Относительное пространственное расположение везикул и каналов в составе активных зон основано на литературных данных [43, 44, 112].

ритмического залпа. Именно это и наблюдается при растормаживании L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, но, как оказалось, обязательно в тандеме с выбросом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин-чувствительных пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -депо.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре собраны воедино данные о специфической роли пресинаптических потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в управлении квантовой секрецией АХ в НМС млекопитающих. У этих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов имеется четкое разделение функциональных ролей – триггером экзоцитоза синаптических везикул в нормальных условиях служит P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов ( $\text{Ca}_v2.1$ ). N-, R- и особенно L-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов не дублируют роль P/Q-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в НМС, но могут существенно влиять на квантовую секрецию АХ в зависимости от функционального состояния НМС и условий их работы, причем задействуя разнообразные механизмы. В НМС активность обычно «молчащих» пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа находится под многоуровневым и разнонаправленным (преимущественно тормозным) контролем со стороны метаботропных и ионотропных рецепторов, ферментов и калиевых токов в терминалях. При этом достаточно выключения лишь одного из тормозных либо усиления облегчающего влияния, чтобы сдвинуть баланс модулирующих воздействий в сторону активации L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Включение L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов облегчает выброс нейротрансмиттера по особому механизму – за счет увеличения размера RRP – роста числа срабатывающих активных зон при стабильной вероятности выброса, что обеспечивает повышенный уровень секреции АХ. Такое потенцирование секреции АХ при растормаживании  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа вызывает активация РиР. Это может быть частью адаптивной системы страхования надежности синаптической передачи через единственный синапс мышечного волокна – в случае функционального ослабления триггерного  $\text{Ca}^{2+}$ -входа по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при избыточной активности или различных патологиях нервно-мышечной передачи. Таким образом, роль модуляторных типов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов не сводится лишь к повышению внутритерминальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  за счет суммации с  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающим по P/Q-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Каждый такой  $\text{Ca}^{2+}$ -вход является частью дифференцированной адаптивной регуировки параметров секреции АХ в работающих моторных синапсах. Взятые вместе, такие данные расширяют современные представления о возможностях  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции квантовой секреции нейротрансмиттеров.

### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, сбор данных (А. Е. Г. и О. П. Б.), написание и редактирование манускрипта (А. Е. Г.).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета научного проекта государственного задания Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова № 121032300071-8 (28-3-21). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katz B, Miledi R* (1965) The Effect Of Calcium On Acetylcholine Release From Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161: 496–503.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0017>
2. *Dolphin AC* (2020) Functions of Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels. *Function (Oxf)*.  
<https://doi.org/10.1093/FUNCTION/ZQAA027>
3. *Dolphin AC, Lee A* (2020) Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 21: 213–229.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2>
4. *Padamsey Z, Foster WJ, Emptage NJ* (2018) Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release and Synaptic Plasticity: A Tale of Many Stores. *Neuroscientist* 25: 208–226.  
<https://doi.org/10.1177/1073858418785334>
5. *Rozov A, Zakharova Y, Vazetdinova A, Valiullina-Rakhmatullina F* (2018) The Role of Polyamine-Dependent Facilitation of Calcium Permeable AMPARs in Short-Term Synaptic Enhancement. *Front Cell Neurosci* 12.  
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00345>
6. *Regehr WG* (2012) Short-Term Presynaptic Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005702.  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005702>
7. *Nanou E, Catterall WA* (2018) Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* 98: 466–481.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.017>
8. *Catterall WA, Few AP* (2008) Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 59: 882–901.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.005>
9. *Brimblecombe KR, Gracie CJ, Platt NJ, Cragg SJ* (2015) Gating of dopamine transmission by calcium and axonal N-, Q-, T- and L-type voltage-gated calcium channels differs between striatal domains. *J Physiol* 593: 929–946.  
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2014.285890>
10. *Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P* (2014) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3: 15–38.  
<https://doi.org/10.1002/wmts.102>
11. *Moore TS, Hasdemir B, Vega-Riveroll L, Deuchars J, Parson SH* (2005) Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction. *Brain Res* 1034: 40–50.  
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.12.001>
12. *Yakel JL* (2014) Nicotinic ACh receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity. *J Physiol* 592: 4147–4153.  
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2014.273896>
13. *De Juan-Sanz J, Holt GT, Schreier ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA* (2017) Axonal Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron* 93: 867–881.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.01.010>
14. *Castillo PE, Purpura DP, Sheng M, Sabatini B, Sü T* (2012) Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005728.  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005728>
15. *Jans AF, van Heusden FC, Al-Mubarak B, Padamsey Z, Emptage NJ* (2017) Homeostatic Presynaptic Plasticity Is Specifically Regulated by P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels at Mammalian Hippocampal Synapses. *Cell Rep* 21: 341–350.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.09.061>
16. *De Jong AP, Verhage M* (2009) Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 19: 245–253.  
<https://doi.org/10.1016/J.CONB.2009.06.005>
17. *Slater CR* (2015) The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol* 134: 55–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.004>
18. *Kaja S, Van de Ven RCG, Ferrari MD, Frants RR, Van den Maagdenberg AMJM, Plomp JJ* (2006) Compensatory Contribution of Ca<sub>v</sub> 2.3 Channels to Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction of *Tottering* Mice. *J Neurophysiol* 95: 2698–2704.  
<https://doi.org/10.1152/jn.01221.2005>
19. *Pagani R, Song M, Mcenery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD* (2004) Differential expression of  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunits of voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca<sup>2+</sup> channel knockout mouse. *Neuroscience* 123: 75–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.019>

20. *Pardo NE, Hajela RK, Atchison WD* (2006) Acetylcholine release at neuromuscular junctions of adult tottering mice is controlled by N-(Cav2.2) and R-type (Cav2.3) but not L-type (Cav1.2) Ca<sup>2+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1009–1020.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.108670>
21. *Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC* (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67: 821–870.  
<https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
22. *Weiss N, Zamponi GW* (2019) T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *Int J Biochem Cell Biol* 108: 34–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.008>
23. *Catterall WA, Linares MJ, Gamal El-Din TM* (2020) Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60: 133–154.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757>
24. *Senatore A, Spafford JD* (2022) Voltage-Gated Calcium Channels in Invertebrates. In: Zamponi GW, Weiss N (eds) *Voltage-Gated Calcium Channels*. Springer Internat Publ. Cham. 115–158.
25. *Brockhaus J, Schreitmüller M, Repetto D, Klatt O, Reissner C, Elmslie K, Heine M, Missler M* (2018)  $\alpha$ -Neurexins together with  $\alpha\delta$ -1 auxiliary subunits regulate Ca<sup>2+</sup> influx through Cav2.1 channels. *J Neurosci* 38: 8277–8294.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-18.2018>
26. *Heck J, Parutto P, Ciuraszkiewicz A, Bikbaev A, Freund R, Mitlöhner J, Andres-Alonso M, Fejtova A, Holcman D, Heine M* (2019) Transient Confinement of CaV2.1 Ca<sup>2+</sup>-Channel Splice Variants Shapes Synaptic Short-Term Plasticity. *Neuron* 103: 66–79.e12.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.030>
27. *Thalhammer A, Contestabile A, Ermolyuk YS, Ng T, Volynski KE, Soong TW, Goda Y, Cingolani LA* (2017) Alternative Splicing of P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Shapes Presynaptic Plasticity. *Cell Rep* 20: 333–343.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.055>
28. *Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Uchitel OD* (2002) Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review). *Mol Membr Biol* 19: 293–300.  
<https://doi.org/10.1080/0968768021000035087>
29. *Laghaei R, Ma J, Tarr TB, Homan AE, Kelly L, Tilwala MS, Vuocolo BS, Rajasekaran HP, Meriney SD, Dittrich M* (2018) Transmitter release site organization can predict synaptic function at the neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 119: 1340–1355.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00168.2017>
30. *Catterall WA* (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–23.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
31. *Dolphin AC* (2018) Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv* 2: 239821281879480.  
<https://doi.org/10.1177/2398212818794805>
32. *Groome JR, Bayless-Edwards L* (2020) Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels. *Front Pharmacol* 11.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00160>
33. *Tuluc P, Yarov-Yarovoy V, Benedetti B, Flucher BE* (2016) Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of CaV Calcium Channels. *Structure* 24: 261–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.011>
34. *Ferron L, Guderyan SD, Smith EJ, Zamponi GW* (2022) CaV $\beta$ -subunit dependence of forward and reverse trafficking of CaV1.2 calcium channels. *Mol Brain* 15: 1–7.  
<https://doi.org/10.1186/S13041-022-00930-X/FIGURES/3>
35. *Tran-Van-Minh A, De Waard M, Weiss N* (2022) Cav $\beta$  surface charged residues contribute to the regulation of neuronal calcium channels. *Mol Brain* 15: 1–5.  
<https://doi.org/10.1186/S13041-021-00887-3/FIGURES/1>
36. *Risher WC, Eroglu C* (2020) Emerging roles for  $\alpha\delta$  subunits in calcium channel function and synaptic connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 63: 162–169.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.04.007>
37. *Cunningham KL, Littleton JT* (2022) Mechanisms controlling the trafficking, localization, and abundance of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Front Mol Neurosci* 15: 1116729.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1116729>
38. *Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, MacLean DM, Zhang Y, Zhou MH, Jayaraman V, Pan HL* (2018) The  $\alpha\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell Rep* 22: 2307–2321.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.021>

39. Geisler S, Schöpf CL, Stanika R, Kalb M, Campiglio M, Repetto D, Traxler L, Missler M, Obermair GJ (2019) Presynaptic  $\alpha 2\delta$ -2 calcium channel subunits regulate postsynaptic GABAA receptor abundance and axonal wiring. *J Neurosci* 39: 2581–2605.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2234-18.2019>
40. Hoppa MB, Lana B, Margas W, Dolphin AC, Ryan TA (2012)  $\alpha 2\delta$  expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature* 486: 122–125.  
<https://doi.org/10.1038/nature11033>
41. Badawi Y, Nishimune H (2018) Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging. *Neurosci Res* 127: 78–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.014>
42. Ginebaugh SP, Badawi Y, Tarr TB, Meriney SD (2022) Neuromuscular Active Zone Structure and Function in Healthy and Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome States. *Biomol* 12: 740.  
<https://doi.org/10.3390/B10M12060740>
43. Dittrich M, Homan AE, Meriney SD (2018) Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction. *Curr Opin Physiol* 4: 15–24.  
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.004>
44. Homan AE, Meriney SD (2018) Active zone structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Synapse* 72.  
<https://doi.org/10.1002/syn.22057>
45. Nagwaney S, Harlow ML, Jung JH, Szule JA, Ress D, Xu J, Marshall RM, McMahan UJ (2009) Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *J Comp Neurol* 513: 457–468.  
<https://doi.org/10.1002/cne.21975>
46. Meriney SD, Dittrich M (2013) Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction. *J Physiol* 591: 3159–3165.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248625>
47. Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31: 2000–2008.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
48. Cano R, Torres-Benito L, Tejero R, Biea AI, Ruiz R, Betz WJ, Tabares L (2013) Structural and functional maturation of active zones in large synapses. *Mol Neurobiol* 47: 209–219.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8347-9>
49. Bukharaeva EA (2015) Synchronous and asynchronous quantal release at synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 263–269.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050025>
50. Chanaday NL, Kavalali ET (2018) Presynaptic origins of distinct modes of neurotransmitter release. *Curr Opin Neurobiol* 51: 119–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.005>
51. Kaeser PS, Regehr WG (2014) Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release. *Annu Rev Physiol* 76: 333–363.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170338>
52. Mueller BD, Merrill SA, Watanabe S, Liu P, Niu L, Singh A, Maldonado-Catala P, Cherry A, Rich MS, Silva M, Maricq AV, Wang Z-W, 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>
53. 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 Ca<sup>2+</sup> pump PMCA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2106621118.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2106621118>
54. Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15: 351–355.  
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90053-B](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90053-B)
55. Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15: 2995–3012.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-04-02995.1995>
56. Hong SJ, Chang CC (1995) Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J Physiol* 482(Pt 2): 283–290.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020517>
57. Protti DA, Uchitel OD (1993) Transmitter release and presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents blocked by the spider toxin  $\omega$ -aga-IVA. *NeuroReport* 5: 333–336.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199312000-00039>

58. Richards KS, Swensen AM, Lipscombe D, Bommert K (2007) Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current. *Eur J Neurosci* 26: 2950–2961. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05912.x>
59. Molina-Campos E, Xu Y, Atchison WD (2015) Age-Dependent Contribution of P/Q- and R-Type Ca<sup>2+</sup> Channels to Neuromuscular Transmission in Lethargic Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 352: 395–404. <https://doi.org/10.1124/JPET.114.216143>
60. Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of  $\alpha$ (1A) subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2: 407–415. <https://doi.org/10.1038/8070>
61. Depetris RS, Nudler SI, Uchitel OD, Urbano FJ (2008) Altered synaptic synchrony in motor nerve terminals lacking P/Q-calcium channels. *Synapse* 62: 466–471. <https://doi.org/10.1002/syn.20516>
62. Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Schellner RH, Tsien RW, Shin HS (1999) Ablation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the  $\alpha$ (1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15245–15250. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15245>
63. Tarr TB, Wipf P, Meriney SD (2015) Synaptic Pathophysiology and Treatment of Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Mol Neurobiol* 52: 456–463. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8887-2>
64. Meriney SD, Tarr TB, Ojala KS, Wu M, Li Y, Lacomis D, Garcia-Ocaña A, Liang M, Valdomir G, Wipf P (2018) Lambert–Eaton myasthenic syndrome: mouse passive-transfer model illuminates disease pathology and facilitates testing therapeutic leads. *Ann N Y Acad Sci* 1412: 73–81. <https://doi.org/10.1111/nyas.13512>
65. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nanoenvironments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14950–14957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005940107>
66. Mochida S (2019) Presynaptic calcium channels. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092217>
67. Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schröder MS, Altmann WD, Henneberger C, Rusakov DA, Gundelfinger ED, Fejtova A (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82: 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.012>
68. Hirano M, Takada Y, Wong CF, Yamaguchi K, Kotani H, Kurokawa T, Mori MX, Snutch TP, Ronjat M, De Waard M, Mori Y (2017) C-terminal splice variants of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav2.1  $\alpha$ 1 subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins. *J Biol Chem* 292: 9365–9381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778829>
69. Calloway N, Gouzer G, Xue M, Ryan TA (2015) The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07728>
70. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Nat Neurosci* 10: 691–701. <https://doi.org/10.1038/nn1904>
71. Juranek J, Mukherjee K, Rickmann M, Martens H, Calka J, Südhof TC, Jahn R (2006) Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification. *Eur J Neurosci* 24: 3043–3052. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05183.x>
72. Takikawa K, Nishimune H (2022) Similarity and Diversity of Presynaptic Molecules at Neuromuscular Junctions and Central Synapses. *Biomolecules* 12: 179. <https://doi.org/10.3390/biom12020179>
73. Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA (1996) Isoform-specific interaction of the  $\alpha$ 1A subunits of brain Ca<sup>2+</sup> channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7363>
74. Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin [1]. *Nat Neurosci* 2: 939–941. <https://doi.org/10.1038/14721>

75. *Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW* (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378: 623–626.  
<https://doi.org/10.1038/378623a0>
76. *Djillani A, Bazinet J, Catterall WA* (2022) Synaptotagmin-7 Enhances Facilitation of Cav2.1 Calcium Channels. *eNeuro* 9.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0081-22.2022>
77. *Turecek J, Regehr WG* (2018) Synaptotagmin 7 Mediates Both Facilitation and Asynchronous Release at Granule Cell Synapses. *J Neurosci* 38: 3240–3251.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3207-17.2018>
78. *Jackman SL, Regehr WG* (2017) The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94: 447–464.  
<https://doi.org/10.1016/j.NEURON.2017.02.047>
79. *Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA* (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 341–346.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0710213105>
80. *Yokoyama CT, Myers SJ, Fu J, Mockus SM, Scheuer T, Catterall WA* (2005) Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. *Mol Cell Neurosci* 28: 1–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.08.019>
81. *Serra SA, Gené GG, Elorza-Vidal X, Fernández-Fernández JM* (2018) Cross talk between  $\beta$  subunits, intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, and SNAREs in the modulation of CaV2.1 channel steady-state inactivation. *Physiol Rep* 6.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13557>
82. *Demaria CD, Soong TW, Alseikhan BA, Alyania RS, Yue DT* (2001) Calmodulin bifurcates the local Ca<sup>2+</sup> signal that modulates P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 411: 484–489.  
<https://doi.org/10.1038/35078091>
83. *Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA* (2008) Regulation of Presynaptic CaV2.1 Channels by Ca<sup>2+</sup> Sensor Proteins Mediates Short-Term Synaptic Plasticity. *Neuron* 57: 210–216.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.036>
84. *Nanou E, Yan J, Whitehead NP, Kim MJ, Froehner SC, Scheuer T, Catterall WA* (2016) Altered short-term synaptic plasticity and reduced muscle strength in mice with impaired regulation of presynaptic CaV2.1 Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1068–1073.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1524650113>
85. *Zamponi GW, Currie KPM* (2013) Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 1828: 1629–1643.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.10.004>
86. *Zhang Y, Chen YH, Bangaru SD, He L, Abele K, Tanabe S, Kozasa T, Yang J* (2008) Origin of the voltage dependence of G-protein regulation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 28: 14176–14188.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-08.2008>
87. *Cinalli AR, Guarracino JF, Fernandez V, Roquel LI, Losavio AS* (2013) Inosine induces presynaptic inhibition of acetylcholine release by activation of A3 adenosine receptors at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 169: 1810–1823.  
<https://doi.org/10.1111/bph.12262>
88. *Silinsky EM* (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 558: 389–401.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061457>
89. *Guarracino JF, Cinalli AR, Fernández V, Roquel LI, Losavio AS* (2016) P2Y13 receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 326: 31–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.NEUROSCIENCE.2016.03.066>
90. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2017) The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 11: 311–320.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747817040067/METRICS>
91. *Santafé MM, Salon I, García N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J* (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* 17: 119–127.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x>
92. *Dai S, Hall DD, Hell JW* (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89: 411–452.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2007>

93. Sakurai T, Hell JW, Woppmann A, Miljanich GP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the  $\alpha(1A)$  subunit of brain calcium channels. *J Biol Chem* 270: 21234–21242.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21234>
94. Huang CC, Wang SJ, Gean PW (1998) Selective enhancement of P-type calcium currents by isoproterenol in the rat amygdala. *J Neurosci* 18: 2276–2282.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-06-02276.1998>
95. Rodriguez-Menchaca AA, Adney SK, Zhou L, Logothetis DE (2012) Dual regulation of voltage-sensitive ion channels by PIP2. *Front Pharmacol* 3: 170.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00170>
96. Wu L, Bauer CS, Zhen X, Xie C, Yang J (2002) Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. *Nature* 419: 947–952.  
<https://doi.org/10.1038/nature01118>
97. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha 1$  subunit. *Nature* 385: 442–446.  
<https://doi.org/10.1038/385442a0>
98. Santafé MM, García N, Lanuza MA, Tomàs M, Tomàs J (2009) Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse. *J Neurosci Res* 87: 683–690.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.21885>
99. Mochida S (2018) Presynaptic calcium channels. *Neurosci Res* 127: 33–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.012>
100. Magupalli VG, Mochida S, Yan J, Jiang X, Westenbroek RE, Nairn AC, Scheuer T, Catterall WA (2013)  $Ca^{2+}$ -independent activation of  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain of CaV2.1 calcium channels. *J Biol Chem* 288: 4637–4648.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369058>
101. Digregorio DA, Peskoff A, Vergara JL (1999) Measurement of Action Potential-Induced Presynaptic Calcium Domains at a Cultured Neuromuscular Junction. *J Neurosci* 19(18): 78467859.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07846.1999>
102. Oheim M, Kirchhoff F, Stühmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40: 423–439.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.007>
103. Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2012) Nanodomain coupling between  $Ca^{2+}$  channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13: 7–21.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3125>
104. Stanley EF (2016) The Nanophysiology of Fast Transmitter Release. *Trends Neurosci* 39: 183–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.005>
105. Tarr TB, Dittrich M, Meriney SD (2013) Are unreliable release mechanisms conserved from NMJ to CNS? *Trends Neurosci* 36: 14–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.009>
106. Miteva A, Gaydukov A, Balezina O (2020) Interaction between Calcium Chelators and the Activity of P2X7 Receptors in Mouse Motor Synapses. *Int J Mol Sci* 2034(21): 2034.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS21062034>
107. Dittman JS, Ryan TA (2019) The control of release probability at nerve terminals. *Nat Rev Neurosci* 20: 177–186.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0111-3>
108. Bornschein G, Schmidt H (2019) Synaptotagmin  $Ca^{2+}$  sensors and their spatial coupling to presynaptic CaV channels in central cortical synapses. *Front Mol Neurosci* 11.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00494>
109. Fekete A, Nakamura Y, Yang YM, Herlitze S, Mark MD, DiGregorio DA, Wang LY (2019) Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules. *Nat Commun* 10.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08452-2>
110. Nakamura Y, Reva M, DiGregorio DA (2018) Variations in  $Ca^{2+}$  influx can alter chelator-based estimates of  $Ca^{2+}$  channel–synaptic vesicle coupling distance. *J Neurosci* 38: 3971–3987.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2061-17.2018>
111. Wang LY, Augustine GJ (2015) Presynaptic nanodomains: A tale of two synapses. *Front Cell Neurosci* 8: 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00455>
112. Ginebaugh SP, Badawi Y, Laghaei R, Mersky G, Wallace CJ, Tarr TB, Kaufhold C, Reddel S, Meriney SD (2023) Simulations of active zone structure and function at mammalian NMJs predict that loss of calcium channels alone is not sufficient to replicate LEMS effects. *J Neurophysiol* 129: 1259–1277.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00404.2022>

113. Wang X, Pinter MJ, Rich MM (2010) Ca<sup>2+</sup> dependence of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 103: 659–666.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00708.2009>
114. Wang X, Wang Q, Engisch KL, Rich MM (2010) Activity-dependent regulation of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction in vivo. *J Neurophysiol* 104: 2352–2358.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00460.2010>
115. Gaffield MA, Tabares L, Betz WJ (2009) Preferred sites of exocytosis and endocytosis colocalize during high- but not lower-frequency stimulation in mouse motor nerve terminals. *J Neurosci* 29: 15308–15316.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4646-09.2009>
116. Tabares L, Ruiz R, Linares-Clemente P, Gaffield MA, Alvarez De Toledo G, Fernandez-Chacón R, Betz WJ (2007) Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptotagmin. *J Neurosci* 27: 5422–5430.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0670-07.2007>
117. Wyatt RM, Balice-Gordon RJ (2008) Heterogeneity in synaptic vesicle release at neuromuscular synapses of mice expressing synaptotagmin. *J Neurosci* 28: 325–335.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3544-07.2008>
118. Cano R, Ruiz R, Shen C, Tabares L, Betz WJ (2012) The functional landscape of a presynaptic nerve terminal. *Cell Calcium* 52: 321–326.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.012>
119. Newman ZL, Hoagland A, Aghi K, Worden K, Levy SL, Son JH, Lee LP, Isacoff EY (2017) Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the Drosophila Larval Neuromuscular Junction. *Neuron* 93: 1388–1404.e10.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.028>
120. Luo F, Dittrich M, Cho S, Stiles JR, Meriney SD (2015) Transmitter release is evoked with low probability predominately by calcium flux through single channel openings at the frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 113: 2480–2489.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00879.2014>
121. Scarnati MS, Clarke SG, Pang ZP, Paradiso KG (2020) Presynaptic Calcium Channel Open Probability and Changes in Calcium Influx Throughout the Action Potential Determined Using AP-Waveforms. *Front Synaptic Neurosci* 12: 17.  
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00017>
122. Laghaei R, Meriney SD (2022) Microphysiological Modeling of the Structure and Function of Neuromuscular Transmitter Release Sites. *Front Synaptic Neurosci* 14: 34.  
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.917285>
123. Nudler S, Piriz J, Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Piedras Renteria ES, Uchitel OD (2003) Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 998: 11–17.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1254.003>
124. Rosato-Siri MD, Piriz J, Giugovaz Tropper BA, Uchitel OD (2002) Differential Ca<sup>2+</sup>-dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 15: 1874–1880.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02015.x>
125. Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514: 533–540.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.533ae.x>
126. Chand KK, Lee KM, Schenning MP, Lavidis NA, Noakes PG (2015) Loss of β2-laminin alters calcium sensitivity and voltage-gated calcium channel maturation of neurotransmission at the neuromuscular junction. *J Physiol* 593: 245–265.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284133>
127. Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3491–3496.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0437991100>
128. Tsentsevitsky AN, Khuzakmetova VF, Bukharaeva EA, Petrov AM (2024) The Mechanism of α2 adrenoreceptor-dependent Modulation of Neurotransmitter Release at the Neuromuscular Junctions. *Neurochem Res* 49: 453–465.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-023-04052-1>
129. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440–443.  
<https://doi.org/10.1038/316440a0>
130. Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC (1986) Mechanisms of calcium channel modulation by β-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol* 18: 691–710.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(86\)80941-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(86)80941-5)

131. *Godfraind T* (2017) Discovery and development of calcium channel blockers. *Front Pharmacol* 8: 286.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>
132. *Torben Bech-Hansen N, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM* (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19: 264–267.  
<https://doi.org/10.1038/947>
133. *Zuccotti A, Clementi S, Reinbothe T, Torrente A, Vandael DH, Pirone A* (2011) Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. *Trends Pharmacol Sci* 32: 366–375.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.02.012>
134. *Ortner NJ, Kaserer T, Copeland JN, Striessnig J* (2020) De novo CACAN1D  $\text{Ca}^{2+}$  channelopathies: clinical phenotypes and molecular mechanism. *Pflugers Arch* 472(7): 755–773.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02418-w>
135. *Lieb A, Ortner N, Striessnig J* (2014) C-terminal modulatory domain controls coupling of voltage-sensing to pore opening in Cav1.3 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biophys J* 106: 1467–1475.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.017>
136. *Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzig S, Striessnig J, Koschak A* (2011) Functional properties of a newly identified c-terminal splice variant of Cav1.3 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem* 286: 42736–42748.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269951>
137. *Xu W, Lipscombe D* (2001) Neuronal Cav1.3 $\alpha 1$  L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21: 5944–5951.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-05944.2001>
138. *Soldatov NM* (2012) Molecular Determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  v 1.2 Calcium Channel Inactivation. *ISRN Mol Biol* 2012: 1–10.  
<https://doi.org/10.5402/2012/691341>
139. *Tadross MR, Johnny MB, Yue DT* (2010) Molecular endpoints of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin- and voltage-dependent inactivation of Cav1.3 channels. *J Gen Physiol* 135: 197–215.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910308>
140. *Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P, Charnet P* (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 104–117.
141. *Aderemane-Ali F, Findeisen F, Rossen ND, Minor DL* (2019) A Selectivity Filter Gate Controls Voltage-Gated Calcium Channel Calcium-Dependent Inactivation. *Neuron* 101: 1134–1149e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.011>
142. *Kuzmenkina E, Novikova E, Jangsangthong W, Matthes J, Herzig S* (2019) Single-Channel Resolution of the Interaction between C-Terminal Cav1.3 Isoforms and Calmodulin. *Biophys J* 116: 836–846.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.01.025>
143. *Liu N, Yang Y, Ge L, Liu M, Colecraft HM, Liu X* (2017) Cooperative and acute inhibition by multiple C-terminal motifs of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *eLife* 6.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.21989>
144. *Simms BA, Zamponi GW* (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82: 24–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
145. *Simms BA, Souza IA, Rehak R, Zamponi GW* (2014) The amino-terminus of high voltage activated calcium channels: CaM you or can't you? *Channels* 8: 370–375.  
<https://doi.org/10.4161/chan.29313>
146. *Sahu G, Asmara H, Zhang FX, Zamponi GW, Turner RW* (2017) Activity-dependent facilitation of Cav1.3 calcium channels promotes Kca3.1 activation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 37: 11255–11270.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0967-17.2017>
147. *Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, Abiria S, Kim KY, Usachev YM, Obermair GJ, Colbran RJ, Lee A* (2010)  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent facilitation of Cav1.3  $\text{Ca}^{2+}$  channels by densin and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* 30: 5125–5135.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4367-09.2010>
148. *Lipscombe D, Andrade A, Allen SE* (2013) Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1522–1529.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.018>

149. *Bartels P, Yu D, Huang H, Hu Z, Herzig S, Soong TW* (2018) Alternative Splicing at N Terminus and Domain I Modulates CaV1.2 Inactivation and Surface Expression. *Biophys J* 114: 2095–2106. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.029>
150. *Savalli N, Pantazis A, Sigg D, Weiss JN, Neely A, Olcese R* (2016) The  $\alpha\delta$ -1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol* 148: 147–159. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611586>
151. *Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW* (2014) L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 94: 303–326. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2013>
152. *Moreno CM, Dixon RE, Tajada S, Yuan C, Opitz-Araya X, Binder MD, Santana LF* (2016) Ca<sup>2+</sup> entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered Cav1.3 channels. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15744>
153. *Murphy JG, Sanderson JL, Gorski JA, Scott JD, Catterall WA, Sather WA, Dell'Acqua ML* (2014) AKAP-anchored PKA maintains neuronal L-type calcium channel activity and NFAT transcriptional signaling. *Cell Rep* 7: 1577–1588. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.027>
154. *Wang X, Marks CR, Perfitt TL, Nakagawa T, Lee A, Jacobson DA, Colbran RJ* (2017) A novel mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to L-type Ca<sup>2+</sup> channels that initiates longrange signaling to the nucleus. *J Biol Chem* 292: 17324–17336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788331>
155. *Ma H, Cohen S, Li B, Tsienn RW* (2013) Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. *Biosci Rep* 33: 97–101. <https://doi.org/10.1042/BSR20120099>
156. *Berger SM, Bartsch D* (2014) The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res* 357: 463–476. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1936-3>
157. *Murphy JG, Crosby KC, Dittmer PJ, Sather WA, Dell'Acqua ML* (2019) AKAP79/150 recruits the transcription factor NFAT to regulate signaling to the nucleus by neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Biol Cell* 30: 1743–1756. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0060>
158. *Perfitt TL, Wang X, Dickerson MT, Stephenson JR, Nakagawa T, Jacobson DA, Colbran RJ* (2020) Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII $\alpha$ -SHANK3 interaction. *J Neurosci* 40: 2000–2014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-19.2020>
159. *Kim SS, Lee EH, Lee K, Jo S-H, Seo SR* (2015) PKA regulates calcineurin function through the phosphorylation of RCAN1: Identification of a novel phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 459: 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.155>
160. *Sridharan PS, Lu Y, Rice RC, Pieper AA, Rajadhyaksha AM* (2020) Loss of Cav1.2 channels impairs hippocampal theta burst stimulation-induced long-term potentiation. *Channels* 14: 287–293. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1807851>
161. *Vandael D, Okamoto Y, Jonas P* (2021) Transsynaptic modulation of presynaptic short-term plasticity in hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Commun* 12(12): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23153-5>
162. *Hasreiter J, Goldnagl L, Böhm S, Kubista H* (2014) Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels operate in a similar voltage range but show different coupling to Ca<sup>2+</sup>-dependent conductances in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 306. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2013>
163. *Plumbly W, Brandon N, Deeb TZ, Hall J, Harwood AJ* (2019) L-type voltage-gated calcium channel regulation of in vitro human cortical neuronal networks. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50226-9>
164. *Wang D, Grillner S, Wallén P* (2013) Calcium dynamics during NMDA-induced membrane potential oscillations in lamprey spinal neurons – contribution of L-type calcium channels (CaV1.3). *J Physiol* 591: 2509–2521. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248526>
165. *Leitch B, Szostek A, Lin R, Shevtsova O* (2009) Subcellular distribution of L-type calcium channel subtypes in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 164: 641–657. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.08.006>
166. *Giugovaz-Tropper B, González-Inchauspe C, Di Guilmi MN, Urbano FJ, Forsythe ID, Uchitel OD* (2011) P/Q-type calcium channel ablation in a mice glycinergic synapse mediated by multiple types of Ca<sup>2+</sup> channels alters transmitter release and short term plasticity. *Neuroscience* 192: 219–230. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.06.021>

167. *Holmgard K, Jensen K, Lambert JDC* (2009) Imaging of Ca<sup>2+</sup> responses mediated by presynaptic L-type channels on GABAergic boutons of cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1249: 79–90. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.10.033>
168. *Subramanian J, Morozov A* (2011) Erk1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels. *J Neurosci* 31: 4755–4764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6594-10.2011>
169. *Tippens AL, Pare JF, Langwieser N, Moosmang S, Milner TA, Smith Y, Lee A* (2008) Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506: 569–583. <https://doi.org/10.1002/CNE.21567>
170. *Giansante G, Marte A, Romei A, Prestigio C, Onofri F, Benfenati F, Baldelli P, Valente P* (2020) Presynaptic L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Increase Glutamate Release Probability and Excitatory Strength in the Hippocampus during Chronic Neuroinflammation. *J Neurosci* 40: 6825–6841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2981-19.2020>
171. *Rey S, Maton G, Satake S, Llano I, Kang S, Surmeier DJ, Silverman RB, Collin T* (2020) Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons. *J Neurochem* 155: 390–402. <https://doi.org/10.1111/JNC.15100>
172. *Shin MC, Nonaka K, Yamaga T, Wakita M, Akaike H, Akaike N* (2018) Calcium channel subtypes on glutamatergic mossy fiber terminals synapsing onto rat hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol* 120: 1264–1273. <https://doi.org/10.1152/JN.00571.2017>
173. *Atchison WD, O'Leary SM* (1987) Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction. *Brain Res* 419: 315–319. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90599-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90599-3)
174. *Khuzakhmetova VF, Nurullin LF, Bukharaeva EA, Nikolsky EE* (2016) Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in high asynchrony of transmitter release in neuromuscular synapses of newborn rats. *Dokl Biol Sci* 470: 220–223. <https://doi.org/10.1134/S0012496616050124>
175. *García N, Hernández P, Lanuza MA, Tomàs M, Cilleros-Mañé V, Just-Borràs L, Duran-Vigara M, Polishchuk A, Balanya-Segura M, Tomás J* (2022) Involvement of the Voltage-Gated Calcium Channels L- P/Q- and N-Types in Synapse Elimination During Neuromuscular Junction Development. *Mol Neurobiol* 59: 4044–4064. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02818-2>
176. *Losavio A, Muchnik S* (1997) Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 273. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.c1835>
177. *Protti DA, Reisin R, Mackinley TA, Uchitel OD* (1996) Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology* 46: 1391–1396. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.5.1391>
178. *Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R* (1992) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3330–3333. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3330>
179. *Beske PH, Hoffman KM, Machamer JB, Eisen MR, McNutt PM* (2017) Use-dependent potentiation of voltage-gated calcium channels rescues neurotransmission in nerve terminals intoxicated by botulinum neurotoxin serotype A. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16064-3>
180. *Flink MT, Atchison WD* (2003) Iberiotoxin-induced block of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 646–652. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.046102>
181. *Gaydukov AE, Tarasova EO, Balezina OP* (2013) Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice. *Neurochem J* 7: 29–33. <https://doi.org/10.1134/S1819712413010030>
182. *Zhilyakov N, Arkhipov A, Malomouzh A, Samigullin D* (2021) Activation of Neuronal Nicotinic Receptors Inhibits Acetylcholine Release in the Neuromuscular Junction by Increasing Ca<sup>2+</sup> Flux through Cav1 Channels. *Int J Mol Sci* 22: 9031. <https://doi.org/10.3390/IJMS22169031>
183. *Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD* (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 497: 687–697. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021800>

184. *Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomás J* (2001) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* 102: 697–708.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00507-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00507-8)
185. *Santafé MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD* (1999) Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* 95: 227–234.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00382-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00382-6)
186. *Balezina OP, Bogacheva PO, Orlova TY* (2007) Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice. *Bull Exp Biol Med* 143: 171–174.  
<https://doi.org/10.1007/S10517-007-0041-Y>
187. *Bogacheva PO, Balezina OP* (2013) Multidirectional Effects of Calmodulin Kinase II on Transmitter Release in Mature and Newly Formed Mouse Motor Synapses. *Bull Exp Biol Med* 154: 316–319.  
<https://doi.org/10.1007/S10517-013-1940-8>
188. *Urbano FJ, Uchitel OD* (1999) L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca<sup>2+</sup> buffer at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 437: 523–528.  
<https://doi.org/10.1007/s004240050813>
189. *Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD* (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 441: 824–831.  
<https://doi.org/10.1007/s004240000489>
190. *Flink MT, Atchison WD* (2002) Passive transfer of Lambert-Eaton syndrome to mice induces dihydropyridine sensitivity of neuromuscular transmission. *J Physiol* 543: 567–576.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.021048>
191. *Giovannini F, Sher E, Webster R, Boot J, Lang B* (2002) Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 136: 1135–1145.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704818>
192. *Tsentsevitsky AN, Khuzakhmetova VF, Vasin AL, Samigullin DV, Bukharaeva EA* (2015) Calcium modulation of the kinetics of evoked quantum secretion in neuromuscular synapses of cold- and warm-blooded animals. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 270–277.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050177>
193. *Protti DA, Uchitel OD* (1997) P/Q-type calcium channels activate neighboring calcium-dependent potassium channels in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 434: 406–412.  
<https://doi.org/10.1007/s004240050414>
194. *Gaydukov AE, Melnikova SN, Balezina OP* (2009) Facilitation of Acetylcholine Secretion in Mouse Motor Synapses Caused by Calcium Release from Depots upon Activation of L-Type Calcium Channels. *Bull Exp Biol Med* 148: 163–166.  
<https://doi.org/10.1007/S10517-009-0678-9>
195. *Tarasova EO, Gaydukov AE, Balezina OP* (2015) Methods of activation and the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of acetylcholine secretion in the motor synapses of mice. *Neurochem J* 9: 101–107.  
<https://doi.org/10.1134/S1819712415020099>
196. *Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW* (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* 20: 266–273.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-01-00266.2000>
197. *Perissinotti PP, Tropper BG, Uchitel OD* (2008) L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 27: 1333–1344.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06113.x>
198. *Bradford AB, Machamer JB, Russo TM, McNutt PM* (2018) 3,4-diaminopyridine reverses paralysis in botulinum neurotoxin-intoxicated diaphragms through two functionally distinct mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 341: 77–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.012>
199. *Ojala KS, Ginebaugh SP, Wu M, Miller EW, Ortiz G, Covarrubias M, Meriney SD* (2021) A high-affinity, partial antagonist effect of 3,4-diaminopyridine mediates action potential broadening and enhancement of transmitter release at NMJs. *J Biol Chem* 296: 100302.  
<https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100302>
200. *Giglio LD, Cortese F, Pennisi EM* (2020) Aminopyridines in the treatment of multiple sclerosis and other neurological disorders. *Neurodegener Dis Manag* 10: 409–423.  
<https://doi.org/10.2217/nmt-2020-0018>

201. *Simon CM, Blanco-Redondo B, Buettner JM, Pagiazitis JG, Fletcher EV, Sime Longang JK, Mentis GZ* (2021) Chronic pharmacological increase of neuronal activity improves sensory-motor dysfunction in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 41: 376–389.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2142-20.2020>
202. *Ng F, Lee DC, Schruppf LA, Mazurek ME, Lee Lo V, Gill SK, Maselli RA* (2017) Effect of 3,4-diaminopyridine at the murine neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 55: 223–231.  
<https://doi.org/10.1002/mus.25208>
203. *Wu ZZ, Li DP, Chen SR, Pan HL* (2009) Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel  $\beta$  subunit. *J Biol Chem* 284: 36453–36461.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075523>
204. *Li L, Li DP, Chen SR, Chen J, Hu H, Pan HL* (2014) Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-Aminopyridine depends on subunit composition. *Mol Pharmacol* 86: 760–772.  
<https://doi.org/10.1124/mol.114.095505>
205. *Meriney SD, Lacomis D* (2018) Reported direct aminopyridine effects on voltage-gated calcium channels is a high-dose pharmacological off-target effect of no clinical relevance. *J Biol Chem* 293: 16100.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.L118.005425>
206. *Gaydukov AE, Marchenkova AA, Balezina OP* (2012) Involvement of basal and calcium-activated protein kinase C in neurotransmitter secretion in mouse motor synapses. *Bull Exp Biol Med* 153: 820–823.
207. *Correia-De-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (1996) Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76: 3910–3919.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.6.3910>
208. *Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (2000) A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: Influence of stimulus paradigm on calcium mobilization. *J Neurochem* 74: 2462–2469.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742462.x>
209. *Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (2000) Influence of stimulation on  $\text{Ca}^{2+}$  recruitment triggering [3H]acetylcholine release from the rat motor-nerve endings. *Eur J Pharmacol* 406: 355–362.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00686-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00686-5)
210. *Tarasova EO, Miteva AS, Gaidukov AE, Balezina OP* (2015) The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 318–328.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050141>
211. *Garcia N, Santafé MM, Salon I, Lanuza MA, Tomàs J* (2005) Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol* 20: 733–743.  
<https://doi.org/10.14670/HH-20.733>
212. *Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs J* (2006) Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* 23: 2048–2056.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x>
213. *Molchanova AI, Balezina OP, Gaydukov AE* (2024) BDNF Prodomain Inhibits Neurotransmitter Quantal Release in Mouse Motor Synapses with the Necessary Participation of Sortilin and Adenosine A1-Receptors. *J Evol Biochem Physiol* 60: 363–379.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093024010277>
214. *Nadal L, Garcia N, Hurtado E, Simó A, Tomàs M, Lanuza MA, Santafé M, Tomàs J* (2016) Presynaptic muscarinic acetylcholine autoreceptors (M1, M2 and M4 subtypes), adenosine receptors (A1 and A2A) and tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) modulate the developmental synapse elimination process at the neuromuscular junction. *Mol Brain* 9.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-016-0248-9>
215. *Santafé MM, Priego M, Obis T, Garcia N, Tomàs M, Lanuza MA, Tomàs J* (2015) Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci* 42: 1775–1787.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12922>
216. *Cilleros-Mañé V, Just-Borràs L, Tomàs M, Garcia N, Tomàs JM, Lanuza MA* (2020) The  $\text{M}_2$  muscarinic receptor, in association to  $\text{M}_1$ , regulates the neuromuscular PKA molecular dynamics. *FASEB J* 34: 4934–4955.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201902113R>

217. *Tarasova EO, Gaydukov AE, Balezina OP* (2018) Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission. *Biochemistry (Mosc)* 83(6): 674–689.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297918060056>
218. *Giniatullin AR, Mukhutdinova KA, Petrov AM* (2024) Mechanism of Purinergic Regulation of Neurotransmission in Mouse Neuromuscular Junction: The Role of Redox Signaling and Lipid Rafts. *Neurochem Res* 49: 2021–2037.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-024-04153-5>
219. *Perissinotti PP, Uchitel OD* (2010) Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 32: 985–996.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07332.x>
220. *Noronha-Matos JB, Morais T, Trigo D, Timóteo MA, Magalhães-Cardoso MT, Oliveira L, Correia-De-Sá P* (2011) Tetanic failure due to decreased endogenous adenosine A2A tonus operating neuronal Cav1 (L-type) influx in Myasthenia gravis. *J Neurochem* 117: 797–811.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07216.x>
221. *Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P* (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A2A receptor facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> influx into rat motor nerve terminals. *J Physiol* 560: 157–168.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.067595>
222. *Oliveira L, Correia-De-Sá P* (2005) Protein kinase A and Cav1 (L-type) channels are common targets to facilitatory adenosine A2A and muscarinic M1 receptors on rat motoneurons. *Neurosignals* 14: 262–272.  
<https://doi.org/10.1159/000088642>
223. *Nascimento F, Sebastião AM, Ribeiro JA* (2015) Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* 11: 471–480.  
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9465-4>
224. *Sebastião AM, Rei N, Ribeiro JA* (2018) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and adenosine receptors. *Front Pharmacol* 9.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00267>
225. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2018) Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signal* 14: 459–469.  
<https://doi.org/10.1007/S11302-018-9630-7>
226. *Tarasova EO, Khotkina NA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Spontaneous Acetylcholine Release Potentiation Induced by 2-Arachidonoylglycerol and Anandamide in Mouse Motor Synapses. *Mosc Univ Biol Sci Bull* 76: 1–6.  
<https://doi.org/10.3103/S0096392521010053>
227. *Tarasova EO, Khotkina NA, Bogacheva PO, Chernyshev KA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Noncanonical Potentiation of Evoked Quantal Release of Acetylcholine by Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Mouse Motor Synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser Membr Cell Biol* 15: 395–405.  
<https://doi.org/10.1134/S199074782106012X>
228. *Balezina OP, Tarasova EO, Gaydukov AE* (2021) Noncanonical Activity of Endocannabinoids and Their Receptors in Central and Peripheral Synapses. *Biochemistry (Mosc)* 86(7): 818–832.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297921070038>
229. *Dittmer PJ, Dell'Acqua ML, Sather WA* (2014) Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-dependent inactivation of neuronal L-Type Ca<sup>2+</sup> channels requires priming by AKAP-anchored protein kinase A. *Cell Rep* 7: 1410–1416.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.039>
230. *Qian H, Patriarichi T, Price JL, Matt L, Lee B, Nieves-Cintrón M, Buonarati OR, Chowdhury D, Nanou E, Nystoriak MA, Catterall WA, Poomvanicha M, Hofmann F, Navedo MF, Hell JW* (2017) Phosphorylation of Ser1928 mediates the enhanced activity of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2 by the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor in neurons. *Sci Signal* 10.  
<https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.AAF9659>
231. *Huang S, Kirkwood A* (2020) Endocannabinoid Signaling Contributes to Experience-Induced Increase of Synaptic Release Sites From Parvalbumin Interneurons in Mouse Visual Cortex. *Front Cell Neurosci* 14: 304.  
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.571133>
232. *Palma AG, Muchnik S, Losavio AS* (2011) Excitatory effect of the A2A adenosine receptor agonist CGS-21680 on spontaneous and K<sup>+</sup>-evoked acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 172: 164–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.015>

## Voltage-Dependent Calcium Channels in Mammalian Motor Synapses – Triggers and Modulators of Neuromuscular Transmission

A. E. Gaydukov<sup>a,\*</sup>, and O. P. Balezina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: gaydukov@gmail.com*

The initiation of fast synchronous quantal release of neurotransmitters in central and peripheral synapses is ensured by a local increase in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the nerve terminals near the  $\text{Ca}^{2+}$  sensors of synaptic vesicles in response to depolarization of the presynaptic membrane by an action potential (AP) propagating along the axon. The  $\text{Ca}^{2+}$ -entry from the outside through presynaptic voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels  $\text{Ca}_v2.1$  or  $\text{Ca}_v2.2$  (P/Q- or N-type) is the main way of forming a dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  signal that initiates the process of exocytosis of synaptic vesicles in virtually all types of chemical synapses and is capable of inducing the development of certain  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent forms of synaptic plasticity. However, in recent years it has become obvious that the set of sources and the spectrum of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  signals are very diverse. Identification of the ensemble of regulatory  $\text{Ca}^{2+}$ -entries operating in combination with their corresponding targets, description of their contribution to the mechanisms controlling quantal release of neurotransmitter is a topical area of modern synaptic physiology. Among such additional to the trigger  $\text{Ca}^{2+}$ -inputs, L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels are of particular interest. Their role and activation conditions in neuromuscular junctions (NMJs) are poorly studied and do not provide an unambiguous idea of the place of this  $\text{Ca}^{2+}$ -entry in the regulation of acetylcholine (ACh) release in vertebrate motor synapses. This review systematizes the currently available research results on the diverse functional role of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels in mammalian NMJs and presynaptic signaling pathways that control these  $\text{Ca}^{2+}$ -inputs and their participation in the processes of fine-tuning the ACh quantal release.

*Keywords:* neuromuscular synapse, P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, quantal release, acetylcholine