

УДК 612.816

Управляемый деполяризацией кальций-независимый экзо- и эндоцитоз синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки

М. М. Абдрахманов, А. М. Петров*, П. Н. Григорьев, А. Л. Зефиоров

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.04.2013

РЕФЕРАТ В экспериментах на кожно-грудинной мышце лягушки с использованием внеклеточного микроэлектродного отведения миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП) и флуоресцентной микроскопии (краситель FM1-43) исследовали влияние деполяризации постоянным током мембраны нервных окончаний на секрецию медиатора и процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Показано, что в контроле деполяризация мембраны двигательного окончания вызывает выраженное повышение частоты МТКП (секреции квантов медиатора) и экзоцитоза (выгрузка FM1-43 из предварительно загруженных красителем синаптических везикул), которое связано с увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при открытии потенциал-зависимых Са-каналов. При блокировании Са-каналов и связывании внутриклеточных ионов Ca^{2+} (совместное действие ионов Cd^{2+} и EGTA-AM) деполяризующий ток слабо увеличивал частоту МТКП и экзоцитоз везикул. Процессы эндоцитоза (загрузка FM1-43 во вновь образующиеся синаптические везикулы) как в контроле, так и при совместном действии ионов Cd^{2+} и EGTA-AM протекали пропорционально количеству синаптических везикул, подвергнувшихся экзоцитозу. Высказано предположение, что в двигательном нервном окончании лягушки кроме Са-зависимого экзо- и эндоцитоза синаптических везикул существует Са-независимый экзо- и эндоцитоз, который может активироваться непосредственно деполяризацией мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА двигательное нервное окончание, экзоцитоз, эндоцитоз, кальций, постоянный деполяризующий ток, кадмий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EGTA-AM – этиленгликоль-бис(β-аминоэтил)-N,N,N',N'-тетраацетоксиметилловый эфир; МТКП – миниатюрные токи концевой пластинки.

ВВЕДЕНИЕ

Основной функцией пресинаптических нервных окончаний в химическом синапсе является высвобождение порций (квантов) медиатора посредством экзоцитоза синаптических везикул. Экзоцитоз сопровождается процессами эндоцитоза, т.е. образованием новых везикул, которые вновь заполняются медиатором и могут повторно участвовать в освобождении медиатора [1, 2]. Считается, что в естественных условиях процессы экзо- и эндоцитоза активируются за счет повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при открытии потенциал-зависимых Са-каналов плазматической мембраны [3–5].

Са-зависимость вызванного потенциалом действия экзоцитоза синаптических везикул связана со спе-

циализированными белками – синаптотагминами I, II, IX, которые являются основными сенсорами ионов Ca^{2+} [6]. Спонтанный (асинхронный) экзоцитоз также зависит от Ca^{2+} и определяется действием внутриклеточного Ca^{2+} на синаптотагмин I и Doc2b [7, 8]. Влияние ионов Ca^{2+} на эндоцитоз носит более сложный характер [9, 10]. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может как запускать и ускорять эндоцитоз [11], так и ингибировать его [3, 9]. Регуляция эндоцитоза ионами Ca^{2+} может опосредоваться кальцинеирином, Са-кальмодулин-зависимой фосфатазой и связыванием Ca^{2+} с синаптотагмином [12, 13].

Однако существует предположение, что секреция медиатора может контролироваться собственно изменением мембранного потенциала двигательного окончания.

ния без входа Ca^{2+} [14, 15]. В ганглионарных нейронах деполяризация Са-независимо усиливает экзоцитоз [16], а последующий эндоцитоз не зависит от повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и имеет быструю динамику [17].

В представленной работе с использованием электрофизиологического и флуоресцентного методов изучена роль деполяризации в процессах секреции медиатора и экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования, растворы

Опыты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы озерных лягушек (*Rana ridibunda*) в зимний (декабрь–февраль) период. Лягушек содержали в холодильнике при температуре 5°C и за 2 ч до опыта переносили в лабораторию. Работа проведена в соответствии с международными правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Использовали стандартный раствор Рингера следующего состава (в мМ): 115.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl_2 , 2.4 NaHCO_3 ; pH поддерживали на уровне 7.2–7.4, а температуру – 20°C . Все опыты проводили только на поверхностно лежащих нервных окончаниях. Для блокирования потенциала действия нервного окончания в перфузирующий раствор добавляли тетродотоксин в концентрации 1 мкМ. В ряде случаев для блокирования Са-каналов нервного окончания использовали раствор Рингера с добавлением ионов Cd^{2+} в концентрации 0.2 мМ. Для связывания внутриклеточных ионов Ca^{2+} препарат обрабатывали в течение 1 ч проникающей через мембрану формой кальциевого хелатора EGTA (EGTA-AM) в концентрации 50 мкМ. Все использованные вещества фирмы Sigma (США). Опыты выполнены при постоянной перфузии 5 мл/мин, объем ванночки – 10 мл.

Электрофизиология

Миниатюрные токи концевой пластинки (МТКП) регистрировали при помощи внеклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором NaCl, с диаметром кончика около 1 мкм и сопротивлением 1–5 МОм. Электрод подводили к нервному окончанию на расстоянии 20–40 мкм от последнего миелинового сегмента. Сигналы усиливались с помощью внеклеточного усилителя и при использовании L-CARD 1250 преобразовывались в цифровую форму. Частоту МТКП определяли по среднему интервалу времени между соседними сигналами (в имп/с).

Флуоресцентная микроскопия

В экспериментах использовали флуоресцентный краситель FM1-43 (SynaptoGreen C4, Invitrogen, США) в концентрации 6 мкМ. Маркер обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в нервное окончание) [18]. Флуоресценцию наблюдали с помощью CCD-видеокамеры Orca II (Hamamatsu, Япония) и моторизованного микроскопа Olympus BX51 (Германия, программное обеспечение Cell[^]P), оснащенного конфокальной системой DSU и объективом Olympus LUMPLFL 60xw. Анализ свечения терминалей проводили в центральном и дистальном участках нервного окончания. Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах свечения пикселя за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50×50 пикселей в участке изображения без нервного окончания [19].

Деполяризация нервного окончания

Для деполяризации нервного окончания использовали две стеклянных микропипетки с диаметром кончиков 2–5 мкм, заполненных 2 М раствором NaCl. Одну (деполяризующую) пипетку под визуальным контролем подводили к претерминальному участку нервного окончания, а вторую – на расстоянии 1 мм от первой к мышечному волокну, на котором располагается нервное окончание. Стимулирующие пипетки подсоединялись к синхронизируемому через компьютер стимулятору DS3 (Digitimer Ltd.), который служил источником тока. Ток в цепи контролировали с помощью микроамперметра.

Статистический анализ проводили при помощи программы Origin Pro. Количественные результаты представлены в форме – среднее значение \pm стандартная ошибка, n – число независимых опытов. Статистическую значимость определяли с использованием критериев Стьюдента и ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрофизиология. Секреция медиатора при деполяризации нервных окончаний

При внеклеточной концентрации Ca^{2+} , равной 1.8 мМ, частота МТКП составляла 0.23 ± 0.03 имп/с ($n = 25$). Деполяризация мембраны постоянным током приводила к быстрому увеличению частоты МТКП (рис. 1А), которое сохранялось в течение всего периода пропускания тока (до 40–50 мин). Увеличение частоты МТКП зависело от силы тока (рис. 1Б). Так, при действии постоянного тока силой 2 мкА часто-

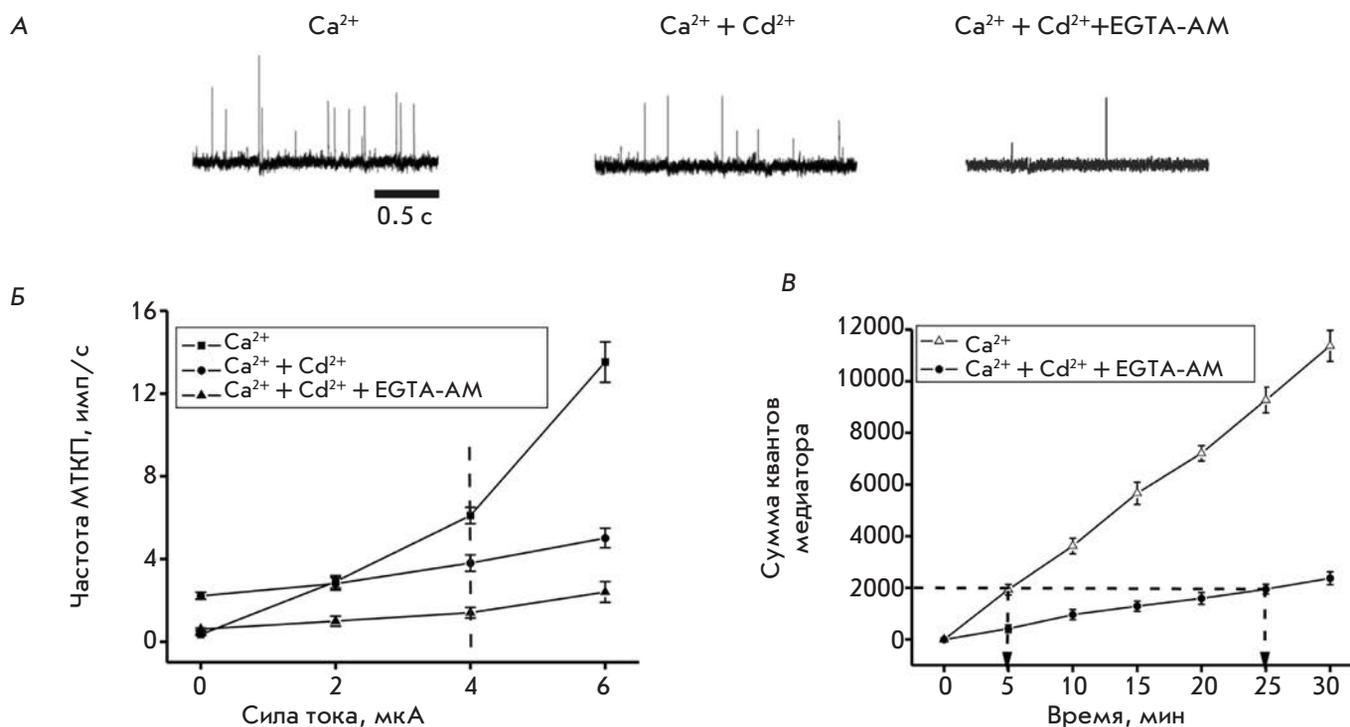


Рис. 1. Влияние деполяризующего тока на секрецию медиатора. А — изменение частоты МТКП при действии деполяризующего тока (4 мкА) в контроле, в присутствии ионов Cd²⁺, на фоне действия EGTA-AM и Cd²⁺. Б — зависимость частоты МТКП (имп/с) от силы деполяризующего тока (мкА). Штриховой линией указаны значения частоты МТКП при силе деполяризующего тока 4 мкА. В — кумулятивные кривые, иллюстрирующие секрецию медиатора при воздействии деполяризующего тока (4 мкА), с течением времени. По оси ординат — сумма квантов медиатора, по оси абсцисс — время от начала деполяризации. Штриховой линией обозначены координаты точек, соответствующих одинаковой сумме квантов медиатора

та МТКП увеличивалась до 2.9 ± 0.3 имп/с ($n = 10$, $p < 0.01$), а при 4 и 6 мкА — до 6.1 ± 0.4 ($n = 10$, $p < 0.01$) и 12.9 ± 0.5 имп/с ($n = 10$, $p < 0.01$) соответственно (рис. 1А,Б).

Добавление в перфузирующий раствор ионов Cd²⁺ (0.2 мМ) приводило к увеличению частоты МТКП до 2.22 ± 0.04 имп/с ($n = 20$, $p < 0.01$). При этом эффект деполяризации на частоту МТКП сохранялся, но был менее выражен (рис. 1А,Б). Так, при пропускании деполяризующего тока силой 2, 4 и 6 мкА частота МТКП возрастала до 2.8 ± 0.3 ($n = 10$, $p < 0.05$), 3.8 ± 0.4 ($n = 10$, $p < 0.01$), 5.2 ± 0.4 ($n = 10$, $p < 0.01$) имп/с соответственно (рис. 1А,Б).

Часовая экспозиция в EGTA-AM не изменяла значимо частоту МТКП, которая составляла при этом 0.20 ± 0.03 имп/с ($n = 16$, $p > 0.05$). Предварительная обработка нервно-мышечного препарата EGTA-AM (см. «Экспериментальную часть») приводила к исчезновению стимулирующего эффекта ионов Cd²⁺ (0.2 мМ) на частоту МТКП (рис. 1А,Б). Частота МТКП в этих условиях (0.21 ± 0.02 имп/с ($n = 20$, $p > 0.05$))

не отличалась от контрольных значений. Однако стимулирующий эффект деполяризации на частоту МТКП сохранялся, хотя и был меньше, чем в контроле или на фоне действия Cd²⁺ (рис. 1Б). Деполяризующий ток 2, 4 и 6 мкА увеличивал частоту МТКП до 0.9 ± 0.2 ($n = 10$, $p < 0.05$), 1.5 ± 0.2 ($n = 10$, $p < 0.01$), 2.8 ± 0.3 ($n = 10$, $p < 0.01$) имп/с соответственно.

Темп и временной ход секреции медиатора при деполяризации нервного окончания постоянным током мы анализировали с использованием кумулятивных кривых (рис. 1В). В этом случае строили зависимость суммы всех возникших МТКП от времени деполяризации. На рис. 1В представлены кумулятивные кривые секреции медиатора при деполяризации нервного окончания током величиной 4 мкА в течение 30 мин. При 5-минутной деполяризации в контроле из нервных окончаний освобождается примерно столько же квантов медиатора (1800–2000), сколько и при 25-минутной деполяризации нервного окончания, обработанного EGTA-AM, и в присутствии ионов Cd²⁺ в окружающей среде (рис. 1В).

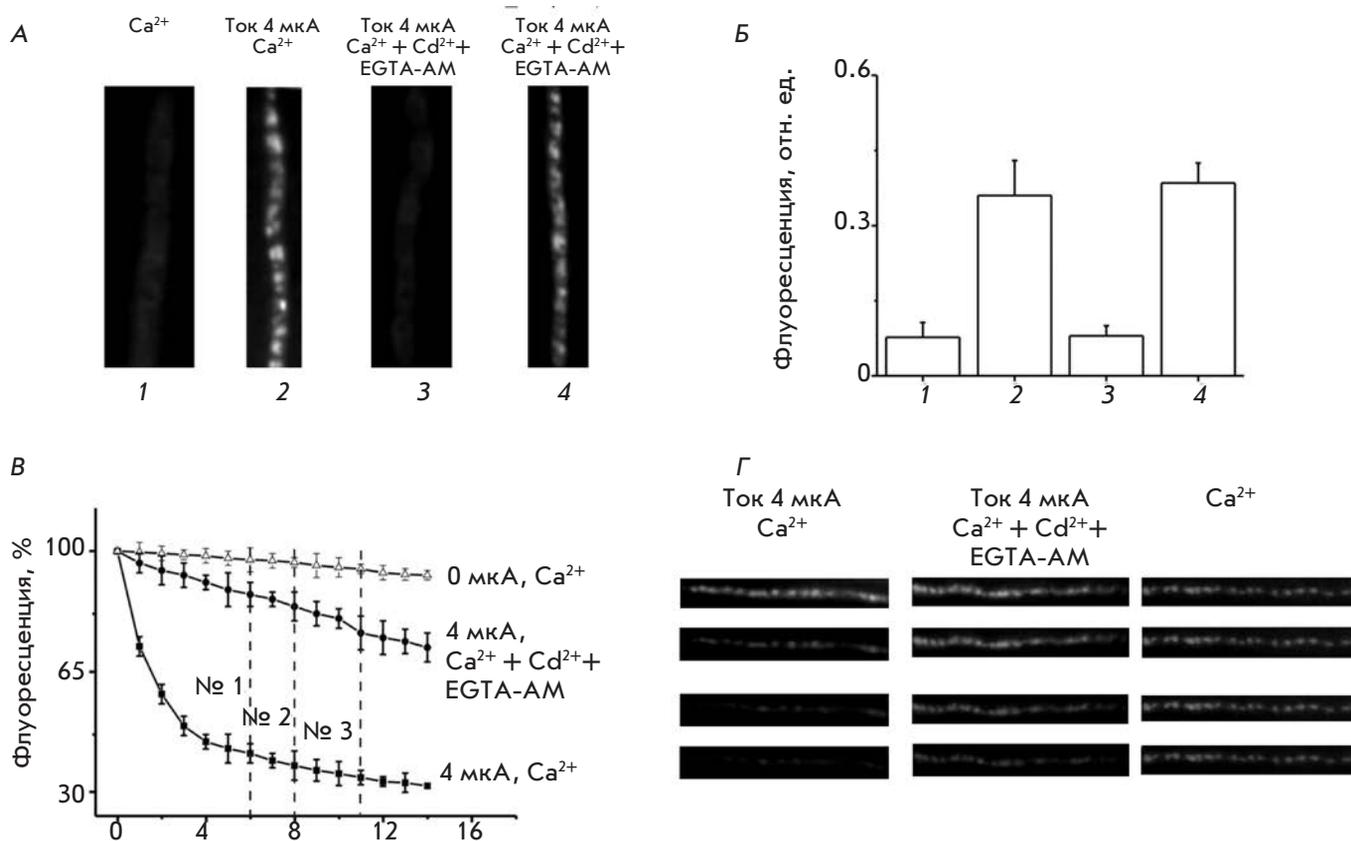


Рис. 2. Эндоцитоз и экзоцитоз синаптических везикул, вызванный деполяризацией мембраны нервного окончания. А — флуоресцентные изображения нервных окончаний, инкубируемых с FM1-43 (25 мин) в покое (1), при деполяризации током в контроле (в течение 5 мин (2)), на фоне действия EGTA-AM и ионов Cd²⁺ в течение 5 (3) и 25 мин (4). Б — интенсивность флуоресценции нервных окончаний, предварительно инкубируемых с FM1-43 в разных условиях. В — динамика снижения яркости флуоресценции нервных окончаний (выгрузки FM1-43) при деполяризации в контроле (4 мкА, Ca²⁺) и на фоне действия EGTA-AM и Cd²⁺ (4 мкА, Ca²⁺ + Cd²⁺ + EGTA-AM). На графике приведена кривая (0 мкА, Ca²⁺) изменения флуоресценции в покое без деполяризации. По оси ординат — интенсивность флуоресценции (100% — свечение до действия тока); по оси абсцисс — время действия тока (мин). Штриховыми линиями (№ 1, 2, 3) обозначены значения флуоресценции, соответствующие времени 6, 8 и 11 мин. Г — флуоресцентные изображения нервных окончаний, снятые в моменты времени 0, № 1, 2, 3

Флуоресцентная микроскопия. Деполяризация нервного окончания и процессы эндоцитоза синаптических везикул

Инкубация нервно-мышечного препарата в стандартном растворе Рингера с FM1-43 (5–40 мин) приводила к появлению неспецифического свечения нервного окончания (рис. 2А) из-за связывания красителя с мембраной [18–20]. При этом средняя интенсивность свечения нервного окончания составила 0.075 ± 0.005 отн. ед. ($n = 32$) (рис. 2Б). При деполяризации нервного окончания в течение 5 мин постоянным током силой 4 мкА в стандартном растворе Рингера с FM1-43 можно было обнаружить интенсивно светящиеся пятна, расположенные вдоль нервного окончания. Эти пятна представ-

ляют собой скопление везикул, прошедших цикл экзоцитоз–эндоцитоз и захвативших флуоресцентный краситель (рис. 2А). В этом случае средняя интенсивность свечения нервного окончания составила 0.16 ± 0.01 отн. ед. ($n = 27$, $p < 0.05$) (рис. 2Б). При совместном действии EGTA-AM и ионов Cd²⁺ и деполяризации мембраны постоянным током силой 4 мкА (5 мин) загрузки красителя в нервное окончание не происходило (неспецифическое свечение нервного окончания 0.08 ± 0.004 отн. ед., $n = 30$, $p > 0.01$) (рис. 2А,Б). Однако при более длительном воздействии постоянного тока (25 мин) вдоль нервного окончания появлялись светящиеся пятна (0.17 ± 0.01 отн. ед., $n = 25$, $p < 0.05$), отражающие протекание эндоцитоза (рис. 2А,Б).

Динамика экзоцитоза синаптических везикул при деполяризации нервных окончаний

Для непосредственной оценки экзоцитоза синаптических везикул мы анализировали динамику уменьшения свечения предварительно загруженных флуоресцентным маркером нервных окончаний [18–20]. Сначала с помощью деполяризации током 4 мкА в течение 5 мин производилась загрузка FM1-43, после периода покоя (1 ч) на окрашенные нервные окончания повторно воздействовали деполяризующим током (4 мкА), вызывающим освобождение красителя (путем экзоцитоза) из синаптических везикул и снижение флуоресценции нервных окончаний (рис. 2В,Г). Следует отметить, что в стандартном растворе Рингера светящиеся пятна сохранялись в течение длительного времени (рис. 2В,Г). На фоне действия постоянного тока (4 мкА) наблюдалось достаточно быстрое и выраженное уменьшение свечения предварительно загруженных нервных окончаний (рис. 2В,Г). К 2 мин деполяризации флуоресценция снижалась до $58 \pm 3\%$ ($n = 10$, $p < 0.01$), а через 12–15 мин – примерно до 30% от исходного уровня. Если после загрузки красителя препараты выдерживали в EGTA-AM, а потом мембрану нервного окончания подвергали деполяризации постоянным током в присутствии Cd^{2+} , то снижение интенсивности флуоресценции нервного окончания (выгрузка) происходило существенно медленнее (рис. 2В,Г). Так, после воздействия тока в течение 2 мин флуоресценция падала до $95 \pm 2\%$ ($n = 10$, $p < 0.01$), а по прошествии 12–15 мин светимость пятен сохранялась на уровне примерно 70% от первоначальной.

ОБСУЖДЕНИЕ

В большинстве работ по изучению процессов экзо- и эндоцитоза деполяризацию мембраны вызывают с помощью раствора с повышенным содержанием ионов калия [1, 20, 21]. Однако это изменяет равновесный потенциал K^+ и все сопряженные с транспортом ионов K^+ процессы (например, работу Na/K-АТФ-азы), а также может ингибировать процессы эндоцитоза синаптических везикул [22]. В нашей работе для оценки роли мембранного потенциала в экзо- и эндоцитозе синаптических везикул мы использовали метод деполяризации мембраны нервного окончания постоянным током, который лишен описанных побочных эффектов.

Са-независимый экзоцитоз

Проведенные нами исследования показали, что при внеклеточной концентрации ионов кальция, равной 1.8 мМ, деполяризация мембраны нервного окончания постоянным током вызывает увеличение квантовой секреции медиатора (частота МТКП) и до-

статочно быстрой и выраженной выгрузке FM1-43 (рис. 1Б, 2В). Все это свидетельствует о том, что деполяризация мембраны нервного окончания стимулирует экзоцитоз синаптических везикул за счет открытия потенциал-зависимых Са-каналов, входа ионов Ca^{2+} в нервные окончания и активации механизма слияния [1, 6, 23].

Следующая задача состояла в оценке значения ионов Ca^{2+} в вызванном деполяризацией экзоцитозе синаптических везикул. Для этого можно было попробовать стимулировать деполяризацией экзоцитоз в бескальциевой среде, однако удаление внеклеточного Ca^{2+} чревато нарушением архитектуры сайтов экзоцитоза, фазового состояния мембраны, структуры мембранных белков и блокирует эндоцитоз синаптических везикул [10, 24]. Поэтому все эксперименты были проведены при нормальной внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} .

Ионы Cd^{2+} в концентрации 0.2 мМ являются эффективными и универсальными блокаторами потенциал-зависимых Са-каналов всех (L-, N-, P/Q-, R-, T-) типов [25]. В двигательных нервных окончаниях холоднокровных обнаружены потенциал-зависимые Са-каналы L-, N-, P/Q- и T-типов [26]. В опытах с применением Cd^{2+} показано, что деполяризация вызывает увеличение частоты МТКП, хотя и существенно менее выраженное, чем в контроле (рис. 1Б). Интересно, что сами ионы Cd^{2+} вызывают некоторое увеличение секреции медиатора (рис. 1Б), что характерно и для других двухвалентных и трехвалентных катионов [27]. Возможно, Cd^{2+} действует на чувствительный к Ca^{2+} метаболитный рецептор, активация которого запускает сигнальный каскад, связанный с фосфолипазой С. В результате в нервном окончании образуется диацилглицерин (стимулирующий протеинкиназу С и белок экзоцитоза Munc13) и инозитолтрисфосфат, увеличивающий внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} за счет выхода из эндоплазматического ретикулума [28]. Можно предположить, что ионы кадмия проникают внутрь нервного окончания, где стимулируют увеличение цитозольного уровня Ca^{2+} за счет выброса его из депо [29].

Ранее нами было показано, что два буфера, связывающих внутриклеточные ионы Ca^{2+} – EGTA-AM и ВАРТА-AM (1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты тетраацетоксиметиловый эфир), – в одинаковой степени угнетают вызванное гиперкалиевым раствором увеличение частоты МТКП (угнетают увеличение частоты МТКП, вызванное раствором с повышенным содержанием ионов калия), что свидетельствует о схожей эффективности хелатирования ими цитозольного Ca^{2+} [30]. Для того чтобы убрать описанный

выше эффект Cd^{2+} , мы использовали EGTA-AM. Действительно, на фоне хелатирования внутриклеточного Ca^{2+} отсутствовал стимулирующий эффект ионов Cd^{2+} на частоту МТКП (рис. 1Б). В то же время на фоне действия EGTA-AM и блокирования входа Ca^{2+} из внеклеточной среды деполяризующий ток приводил к слабому, но статистически значимому увеличению частоты МТКП (рис. 1Б). В этих условиях с помощью флуоресцентной микроскопии также обнаружена эффективность постоянного тока (4 мкА) в стимулировании экзоцитоза синаптических везикул, что проявлялось в уменьшении свечения предварительно загруженных нервных окончаний (рис. 2В). Все эти наблюдения свидетельствуют о существовании наряду с классическим Са-зависимым экзоцитозом и не зависящего от внеклеточного Ca^{2+} экзоцитоза синаптических везикул. Гипотетически этот вариант экзоцитоза запускается, вероятно, деполяризацией мембраны во время пресинаптического потенциала действия и является частью вызванной секреции медиатора.

Са-независимый эндоцитоз

Процессы экзо- и эндоцитоза тесно связаны и происходят в соотношении один к одному, поэтому оценку интенсивности эндоцитоза нужно проводить при одинаковой интенсивности экзоцитоза. На основе полученных данных мы определили, что при деполяризации в течение 5 мин и силе тока 4 мкА в контроле из нервного окончания освобождается столько же квантов, как и за 30 мин деполяризации нервного окончания, предварительно обработанного EGTA-AM и при одновременном добавлении ионов Cd^{2+} в окружающую среду (рис. 1В). Это подтвердили результаты опытов с использованием маркера эндоцитоза FM1-43. В указанных условиях в нервных окончаниях

являлись светящиеся пятна примерно такой же интенсивности, как и в контроле (рис. 2А,Б). Можно предположить, что компенсаторный эндоцитоз может активироваться не только за счет увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при открытии потенциал-зависимых Са-каналов плазматической мембраны [12, 13], но и непосредственно деполяризацией мембраны нервного окончания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженная зависимость экзоцитоза и эндоцитоза от мембранного потенциала нервного окончания создает дополнительные возможности для регуляции секреции медиатора и синаптической передачи. Молекулярные мишени непосредственного воздействия деполяризации на экзо- и эндоцитоз синаптических везикул не установлены. Но в последних исследованиях потенциал-зависимость обнаруживается у многих сигнальных молекул (протеинкиназ А и С, фосфатазы фосфоинозитидов, сопряженных с G-белками пресинаптических ауторецепторов), воздействующих на механизм экзо- и эндоцитоза синаптических везикул [17, 31–33]. Не исключается также, что сенсором изменения мембранного потенциала являются непосредственно Са-каналы плазматической мембраны, которые могут передавать сигнал о деполяризации на SNARE-комплекс и белки эндоцитоза [14, 34]. ●

Работа поддержана РФФИ
(гранты № 11-04-00568_а, 12-04-31550_мол_а,
12-04-33195_мол_а_вед), Минобрнауки РФ
(ИШ-4670.2012.4, МК-108.2013.4)
и государственным контрактом
Минобрнауки РФ (ФЦП).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зефилов А.Л., Петров А.М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо-эндоцитозный везикулярный цикл). Казань: Арт-кафе, 2010. 356 с.
2. Heuser J.E., Reese T.S. // *J. Cell Biol.* 1973. V. 57. № 2. P. 315–344.
3. Зефилов А.Л., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2005. Т. 91. № 7. С. 821–831.
4. Ceccarelli B., Hurlbut W.P. // *J. Cell Biol.* 1980. V. 87. № 1. P. 297–303.
5. Ramaswami M., Krishnan K.S., Kelly R.B. // *Neuron.* 1994. V. 13. № 2. P. 363–375.
6. Pang Z.P., Sudhof T.C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. V. 22. P. 496–505.
7. Xu J., Pang Z.P., Shin O.H., Südhof T.C. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 6. P. 759–766.
8. Groffen A.J., Martens S., Díez Arazola R., Cornelisse L.N., Lozovaya N., de Jong A.P., Goriounova N.A., Habets R.L., Takai Y., Borst J.G., et al. // *Science.* 2010. V. 327. P. 1614–1618.
9. Cousin M.A., Robinson P.J. // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. P. 659–665.
10. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
11. Balaji J., Armbruster M., Ryan T.A. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 6742–6749.
12. Wu X.S., McNeil B.D., Xu J., Fan J., Xue L., Melicoff E., Adachi R., Bai L., Wu L.G. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. P. 1003–1010.
13. Yao J., Kwon S.E., Gaffaney J.D., Dunning F.M., Chapman E.R. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 15. P. 243–249.
14. Parnas H., Segel L., Dudel J., Parnas I. // *Trends Neurosci.* 2000. V. 23. № 2. P. 60–68.
15. Silinsky E.M., Watanabe M., Redman R.S., Qiu R., Hirsh J.K., Hunt J.M., Solsona C.S., Alford S., MacDonald R.C. // *J. Physiol.* 1995. V. 1. № 482. P. 511–520.
16. Zhang C., Zhou Z. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 5. P. 425–430.
17. Zhang C., Xiong W., Zheng H., Wang L., Lu B., Zhou Z. // *Neuron.* 2004. V. 42. № 2. P. 225–236.

18. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron*. 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
19. Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., Giniatullin A.R., Urazaev A.K., Zefirov A.L. // *Neuroscience*. 2011. V. 186. P. 1–12.
20. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология*. 2003. Т. 45. № 12. С. 1163–1171.
21. Ramirez D.M., Kavalali E.T. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. № 2. P. 275–282.
22. Зефирова А.Л., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н., Петров А.М. // *Цитология*. 2006. Т. 48. № 1. С. 34–41.
23. Angleson J.K., Betz W.J. // *J. Neurophysiol.* 2001. V. 85. № 1. P. 287–294.
24. Зефирова А.Л., Мухамедзянов Р.Д., Минлебаев М.Г., Черанов С.Ю., Абдрахманов М.М., Григорьев П.Н. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2002. Т. 88. С. 191–204.
25. Zheng N., Raman I.M. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 31. P. 9826–9838.
26. Нуруллин Л.Ф., Ценцевицкий А.Н., Маломуж А.И., Никольский Е.Е. // *ДАН*. 2013. Т. 449. № 3. С. 360–363.
27. van der Kloot W., Molgó J. // *Physiol. Rev.* 1994. V. 74. № 4. P. 899–991.
28. Vyleta N.P., Smith S.M. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 12. P. 4593–4606.
29. Braga M.F., Rowan E.G. // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. № 8. P. 1729–1739.
30. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н. // *Бюл. экп. биол. и мед.* 2008. Т. 146. № 12. С. 608–612.
31. Chen X., Zhang X., Jia C., Xu J., Gao H., Zhang G., Du X., Zhang H. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 46. P. 39760–39767.
32. Dekel N., Priest M.F., Parnas H., Parnas I., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 1. P. 285–290.
33. Murata Y., Okamura Y. // *J. Physiol.* 2007. V. 583. P. 875–989.
34. Zheng H., Fan J., Xiong W., Zhang C., Wang X., Liu T., Liu H., Sun L., Wang Y., Zheng L., et al. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. P. 2449–2456.