

УДК 612.816

Полимеризация септинов замедляет рециклирование синаптических везикул в двигательном нервном окончании

П. Н. Григорьев, Г. А. Хисамиева, А. Л. Зефирова*

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: zefiroval@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.12.2018

Принята к печати 14.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-54-62

РЕФЕРАТ Септины – наименее изученный элемент цитоскелета, входят в состав консервативного, недавно открытого семейства GTP-связывающих белков. Септины экспрессируются нейронами и взаимодействуют с целым рядом белков, принимающих участие в процессах экзо-эндоцитоза синаптических везикул. Однако наши знания о роли септинов в механизмах синаптической передачи и пресинаптического везикулярного цикла недостаточны. В опытах на двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения постсинаптических сигналов, флуоресцентной конфокальной микроскопии и красителя FM 1-43 исследованы процессы секреции медиатора и экзо-эндоцитоза синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенурином. Обнаружено, что аппликация форхлорфенурина приводит к усилению депрессии секреции медиатора в процессе длительного высокочастотного раздражения (20 и 50 имп/с). Раздражение двумя короткими высокочастотными пачками импульсов показало, что форхлорфенурином вызывает снижение скорости восполнения запаса готового к освобождению медиатора. На фоне действия форхлорфенурина в нервном окончании увеличивалось количество везикул, захвативших краситель во время эндоцитоза, замедлялся темп выброса флуоресцентного красителя в предварительно загруженных FM 1-43 нервных окончаниях при экзоцитозе. Сделано заключение, что стимуляция полимеризации септинов форхлорфенурином приводит к замедлению рециклирования (повторного использования) синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях, связанного с нарушением процессов везикулярного транспорта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулярный цикл, двигательное нервное окончание, секреция медиатора, септины, форхлорфенурином.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПКП – потенциал концевой пластинки; ФХФ – форхлорфенурином.

ВВЕДЕНИЕ

Секреция медиатора в химическом синапсе осуществляется посредством экзоцитоза во время слияния мембраны синаптической везикулы, заполненной медиатором, с пресинаптической мембраной. Этот процесс происходит в области специализированных образований – активных зон при открытии Ca-каналов пресинаптической мембраны. Порция медиатора, освобождаемая во время экзоцитоза отдельной везикулы, носит название кванта. Источающийся в процессе секреции запас синаптических везикул восполняется в процессах эндоцитоза и транспорта везикул. Из пресинаптической мембраны образу-

ются новые везикулы, которые вновь заполняются медиатором, транспортируются к активным зонам и повторно используются в секреции (механизм рециклирования). Совокупность процессов экзоцитоза, эндоцитоза и транспорта синаптических везикул составляет везикулярный цикл – важный пресинаптический механизм, обеспечивающий эффективную секрецию медиатора нейроном в течение длительного времени. Известно, что синаптические везикулы в двигательных нервных окончаниях функционально разнородны, они составляют несколько везикулярных пулов. Пул везикул, готовых к освобождению медиатора (readily releasable pool), представлен

везикулами, расположенными в непосредственной близости к активной зоне. Этот пул, имеющий ограниченный размер, довольно быстро истощается и эффективно восполняется везикулами рециклирующего (мобилизационного) пула, которые образуются из пресинаптической мембраны за счет эндоцитоза (короткий путь). При длительной высокочастотной активности нейрона в процесс секреции могут вовлекаться синаптические везикулы, которые составляют большой резервный пул и формируются с поверхности эндосом нервного окончания (длинный путь) [1–3]. Большой научный интерес представляют механизмы, регулирующие работу пресинаптического везикулярного цикла и везикулярного транспорта. Одним из них может быть цитоскелет, включающий несколько динамично полимеризующихся/деполимеризующихся элементов: актиновые филаменты, промежуточные филаменты, микротрубочки, септины.

Септины, представляющие собой наименее изученный элемент цитоскелета, входят в состав консервативного, недавно открытого семейства GTP-связывающих белков [4]. Септины вовлечены в такие клеточные процессы, как деление, реорганизация других элементов цитоскелета, внутриклеточный транспорт. Служа специфическим барьером, септины могут отделять специализированные мембранные участки друг от друга [5]. У млекопитающих известно 13 видов септинов (обозначаемые SEPT1–SEPT12, SEPT14) [6], которые, объединяясь друг с другом, образуют гетероолигомерные комплексы, способные полимеризоваться в более сложные структуры (филаменты, кольца и сети). В зрелых нервных окончаниях выявлены SEPT3, SEPT5–7 и SEPT11 [7], однако их функции недостаточно изучены. Так, SEPT5 и SEPT7 вовлечены в рост аксонов [7] и дендритов [8, 9]. Обнаружена колокализация SEPT5, SEPT6, SEPT3 с синаптическими везикулами [7, 10, 11]. Также показано взаимодействие септинов с целым рядом белков, принимающих участие в процессах экзоцитоза: Munc-18-1, синапсином-2, VAMP2, синаптофизин, синаптотагмин-1, NSF, Hsc70 и др. Предполагается, что динамическая реорганизация септинов необходима для процессов экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора [12–15]. Еще меньше мы знаем о роли септинов в процессах эндоцитоза и транспорта синаптических везикул. Предпосылкой к возможному участию септинов в данных процессах служит обнаружение взаимодействия септинов с белками, участвующими в процессах эндоцитоза – клатрином, флотилином и динамином [12, 16], а также колокализация септинов и насыщенных фосфоинозитол-4,5-бисфосфатом участков цитоплазматической мембраны, необходимых для клатринзависимого эндоцитоза [17, 18].

С использованием комбинации электрофизиологического подхода и флуоресцентной конфокальной микроскопии оценены процессы рециклирования синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенураном (ФХФ). ФХФ селективно стимулирует полимеризацию септинов, не влияя на другие формы цитоскелета (микротрубочки и актиновые филаменты), и не обладает цитотоксичностью в концентрациях до 500 мкМ [19].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования, растворы

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши. Работа проведена в соответствии с международными правилами работ с использованием экспериментальных животных. После выделения препарат помещали в ванночку и постоянно перфузировали раствором для теплокровных следующего состава (в мМ): NaCl – 125, KCl – 2.5, NaH₂PO₄ – 1, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, глюкоза – 11, NaHCO₃ – 12. Значения pH поддерживали на уровне 7.3–7.4; температура 24°C. Перфузионный раствор постоянно насыщали карбогеном (95%O₂/5%CO₂). Все исследования проводили только на поверхностно расположенных синапсах. Раздражение двигательного нерва осуществляли прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.2–0.3 мс сверхпороговой силы с частотой 0.2 имп/с (редкое раздражение) или 20, 50 имп/с (высокочастотное раздражение). Для блокирования сокращений препарата использовали μ-котококсин GIIIB в концентрации 1–2 мкМ (фирма Peptide Institute, Inc, Япония). Полимеризацию септинов стимулировали, добавляя в перфузионный раствор форхлорфенуран (50 мкМ) на 40 мин. Все использованные вещества за исключением μ-котококсина GIIIB были фирмы Merck (Германия).

Электрофизиология

Регистрацию одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), возникающих спонтанно в покое, и многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) в ответ на раздражение двигательного нерва производили с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 8–10 МОм, заполненных 2.5 М раствором KCl. Микроэлектрод вводили в мышечное волокно в области нервного окончания под визуальным контролем. Уровень мембранного потенциала покоя контролировали при помощи милливольтметра. Эксперименты, в которых изменение мембранного потенциала

покоя превышало 5 мВ, не учитывали. Сигналы оцифровывали с помощью платы АЦП Ла-2USB. Перед подачей высокочастотного раздражения регистрировали 35–100 МПКП и 7–10 ПКП при редком раздражении. Для анализа количества квантов медиатора, освобожденных в ответ на каждое раздражение (квантовый состав ПКП), амплитуду каждого зарегистрированного ПКП и МПКП нормировали по уровню мембранного потенциала – 75 мВ; квантовый состав рассчитывался как отношение амплитуды ПКП на среднюю амплитуду МПКП с использованием коррекции на нелинейную сумму [20, 21].

Флуоресцентная микроскопия

Процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул изучали с использованием флуоресцентного красителя FM 1-43 (SynaptoGreen C4, Merck) в концентрации 6 мкМ. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза (после стимуляции экзоцитоза) оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в нервные окончания) [22, 23]. В этом случае в нервном окончании наблюдалось яркое свечение, отражающее процесс захвата красителя синаптическими везикулами, прошедшими экзоэндоцитоз [23]. Стимуляция экзоцитоза предварительно загруженных везикул вызывает освобождение («выгрузку») красителя из нервных окончаний. Флуоресценцию наблюдали с помощью моторизованного микроскопа VX51W1 (Olympus, Германия), оснащенного конфокальным сканирующим диском DSU, светодиодным осветителем CoolLed pE-1 (CoolLed, Великобритания) и CCD-камерой OrcaR2 (Hamamatsu, Япония), совмещенной с персональным компьютером через специализированный софт Olympus CellP. Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала набор светофильтров Olympus U-MNB2 и водно-иммерсионный объектив Olympus LUMPLFL60xw (1.0 NA). Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах (отн. ед.) как среднее свечение пикселей изображения нервного окончания за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50 × 50 пикселей в участке изображения без нервных окончаний [24].

Статистический анализ проводили с использованием программы Origin (Origin Lab Corp.). Количественные результаты исследования представлены в форме среднее значение ± стандартная ошибка, n – число независимых экспериментов. Статистическую значимость определяли с помощью критерия ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секреция медиатора в процессе длительного высокочастотного раздражения при действии форхлорфенурана

Обнаружено, что экспозиция ФХФ (40 мин) не вызывала значимых изменений мембранного потенциала покоя мышечных волокон (-73.0 ± 2.8 мВ, $n = 20$ и -71.7 ± 3.4 , $n = 20$ в контроле и опыте, $p > 0.05$). При редком раздражении отмечено недостоверное снижение квантового состава ПКП, составлявшего в контрольных и опытных препаратах 59.0 ± 5.8 кванта ($n = 18$) и 53.3 ± 4.7 кванта ($n = 15$) соответственно ($p > 0.05$).

В процессе длительного (3 мин) высокочастотного раздражения с частотой 20 имп/с в контроле наблюдалось трехфазное снижение (депрессия) квантового состава ПКП (рис. 1Аа). Первоначальный быстрый спад в течение 0.4 с раздражения до $64.7 \pm 4.1\%$ ($n = 9$) от исходной величины. После короткого состояния «плато» продолжительностью около 1.5–2 с отмечалась вторая фаза более медленного снижения (к 15 с раздражения до $54.2 \pm 5.5\%$ ($n = 9$)). Последующее, еще более медленное, снижение приводило к снижению квантового состава ПКП к 3 мин раздражения до $35.9 \pm 6.5\%$ ($n = 9$) от исходного уровня. Аналогичная трехфазная динамика снижения квантового состава наблюдалась и при раздражении двигательного нерва с более высокой частотой (50 имп/с, 2 мин), но депрессия секреции медиатора была более выражена (рис. 1Ба). Приблизительно к 0.16 с завершился первоначальный быстрый спад, достигавший $72.3 \pm 3.0\%$ ($n = 9$) от исходной. После короткой фазы плато, продолжавшейся 0.5–0.8 с, была заметна вторая фаза снижения, которая характеризовалась более медленной кинетикой спада, начиная с 5-й секунды раздражения отмечалась третья, еще более медленная фаза. К окончанию второй минуты раздражения квантовый состав составлял $22.7 \pm 7.0\%$ ($n = 9$) от исходной величины.

На фоне действия ФХФ динамика спада квантового состава ПКП качественно не изменялась (наблюдалось трехфазное снижение), однако глубина депрессии была значительно больше. В процессе высокочастотного раздражения (20 имп/с, рис. 1Аб) к 3-й мин раздражения квантовый состав ПКП снижался до $20.2 \pm 6.8\%$ ($n = 7$) от исходного уровня. При раздражении с частотой 50 имп/с снижение квантового состава ПКП также было более выраженным (рис. 1Бб). К окончанию второй минуты раздражения в опытных препаратах квантовый состав снижался до $6.2 \pm 3.6\%$ ($n = 9$) от исходной.

Построение кумулятивных кривых количества освобожденных квантов медиатора выявило статисти-

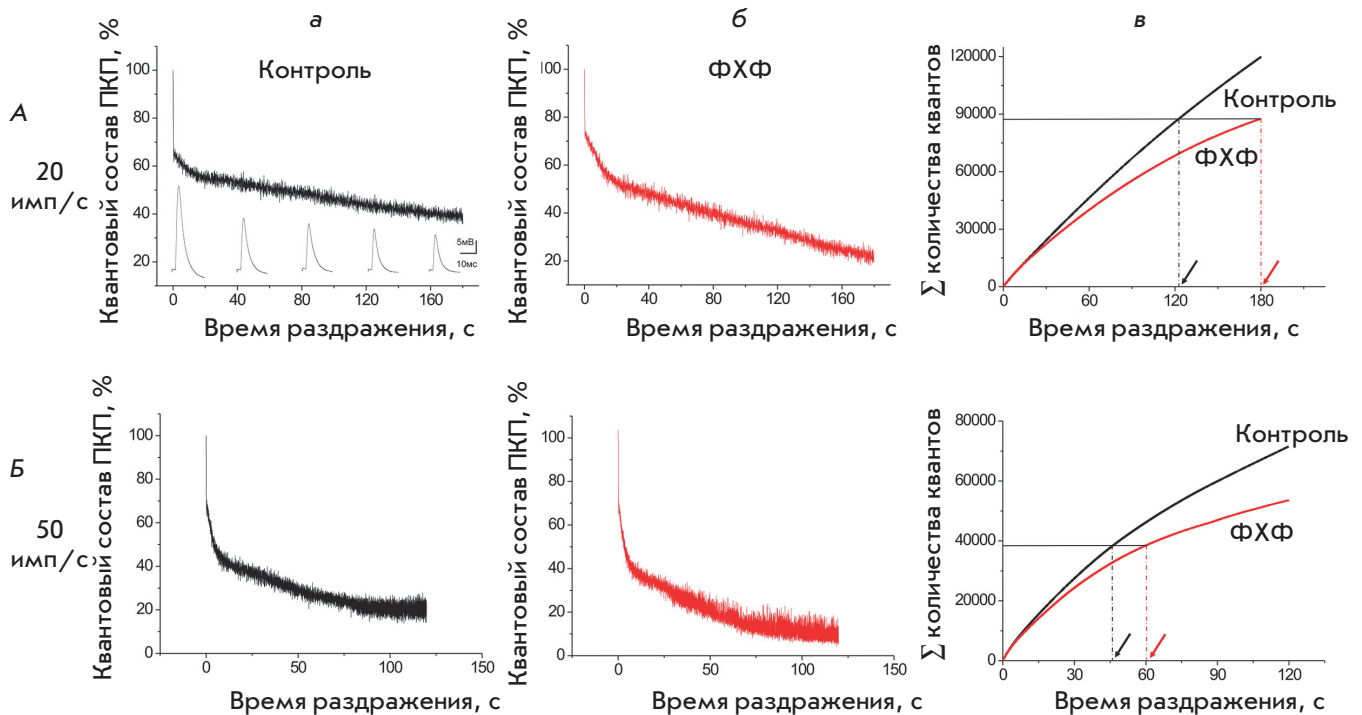


Рис. 1. Секретия медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана. А – динамика спада квантового состава ПКП в процессе длительного высокочастотного раздражения (20 имп/с) в контроле (а) и на фоне действия ФХФ (б). Квантовый состав первого ПКП принят за 100%. Представлены усредненные данные по всем экспериментам (см. текст). Б – аналогичные кривые при частоте раздражения 50 имп/с. Ав и Бв – кумулятивные кривые количества освобожденных квантов медиатора в процессе высокочастотного раздражения. Пунктирные линии указывают время, за которое при раздражении в контроле и в присутствии ФХФ освобождается одинаковое количество квантов

чески значимое снижение интенсивности секреции медиатора в присутствии ФХФ. Трехминутное раздражение с частотой 20 имп/с в контрольных препаратах приводило к высвобождению 119796 ± 8161 квантов ($n = 9$), тогда как на фоне действия ФХФ оно было на 27% меньше – 87611 ± 9025 квантов ($n = 7$), $p < 0.05$ (рис. 1Ав). Двухминутное раздражение с частотой 50 имп/с приводило к высвобождению 71505 ± 5543 квантов ($n = 9$) в контроле, в присутствии ФХФ высвобождение было на 25% меньше – 53553 ± 8904 квантов ($n = 9$), $p < 0.05$ (рис. 1Бв).

Углубление депрессии секреции медиатора при высокочастотном раздражении в условиях стимуляции полимеризации септинов ФХФ может быть связано с замедлением мобилизации – темпа восполнения запаса готового к освобождению медиатора.

Скорость восполнения готового к освобождению запаса медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана

Для оценки темпа восполнения готового к освобождению запаса медиатора мы подавали раздраже-

ние короткими (1 с) пачками импульсов с частотой 50 имп/с с различными интервалами времени между ними (0,5, 3 и 60 с) в норме и на фоне действия ФХФ [25]. В ответ на первую пачку в течение первых 6–8 импульсов происходило резкое снижение квантового состава ПКП, которое сменялось состоянием плато (квантовый состав оставался на одинаковом уровне) (рис. 2Б,В). Суммирование количества освобожденных квантов показало, что как в контроле, так и на фоне действия ФХФ на первую пачку импульсов освобождалось одинаковое количество квантов (2214 ± 192 ($n = 12$) и 2205 ± 194 квантов ($n = 12$), $p > 0.05$). Следовательно, первая пачка раздражения вовлекала в секрецию весь готовый к освобождению запас медиатора, составляющий в двигательных нервных окончаниях мыши около 1700 квантов [25, 26], и практически не затрагивала запас мобилизационного (рециклирующего) пула, составляющего около 80000 квантов [27]. На вторую пачку, поданную через 0,5 и 3,0 с после первой, отмечался более низкий уровень секреции (рис. 2Б,В) вследствие неполного восстановления готового к освобождению запаса ме-

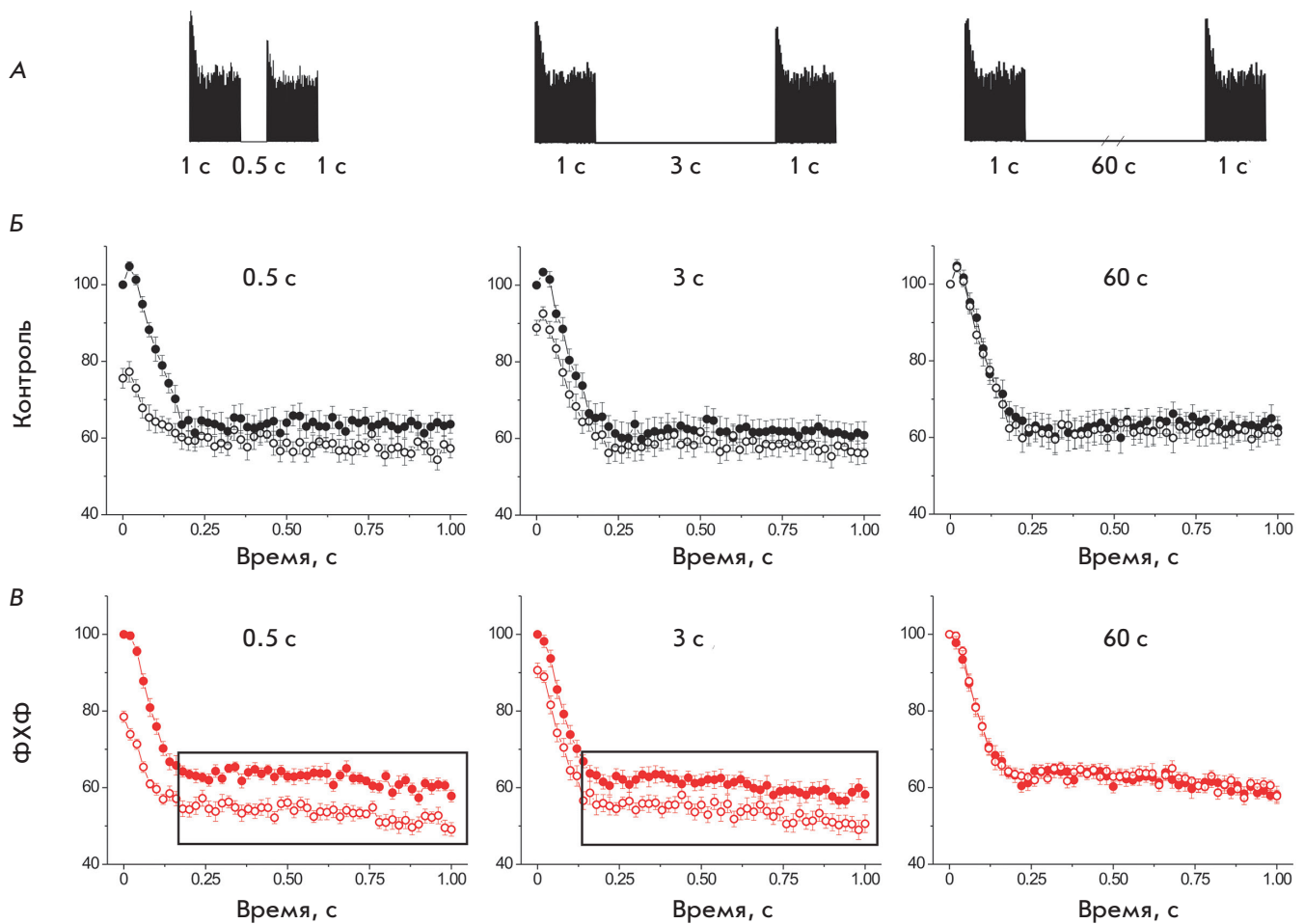


Рис. 2. Восполнение готового к освобождению запаса медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана. А – схема эксперимента. Раздражение двумя короткими (1 с) пачками импульсов с частотой (50 имп/с), интервал времени между пачками 0.5, 3 и 60 с. Б, В – динамика секреции медиатора во время первой (темные кружки) и второй пачки (белые кружки) импульсов в контроле и при действии ФХФ. В каждом эксперименте квантовый состав первого ПКП в первой пачке принят за 100%. Видно, что при действии ФХФ глубина депрессии квантового состава ПКП на вторую пачку раздражения при интервалах 0.5 и 3.0 с увеличивается

диатора. Так, в контроле и на фоне действия ФХФ при интервале времени между пачками 0.5 с сумма квантов, освобожденных за вторую пачку раздражений, составила $88.3 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) и $83.9 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) от количества квантов, освобожденных за первую пачку ($p < 0.01$); а при интервале между пачками 3 с – $93.0 \pm 0.8\%$ ($n = 13$) и $88.5 \pm 1.2\%$ соответственно ($n = 13$), $p < 0.01$. Следовательно, на фоне действия ФХФ секреция медиатора восстанавливалась значительно слабее, чем в контроле, а особенно сильные изменения отмечены в фазе плато (рис. 2В,В). При большем интервале между пачками (60 с) наблюдалось полное восстановление секреции – $100.1 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) в норме и $98.9 \pm 0.7\%$ ($n = 12$) на фоне действия ФХФ. Учитывая, что среднее время рецикли-

рования синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях мышцы составляет около 50 с [27], можно предполагать, что восполнение готового к освобождению медиатора во время короткой паузы между пачками (0.5 и 3 с) происходит только за счет запаса мобилизационного пула, но не эндоцитоза синаптических везикул. Таким образом, использование ФХФ не изменяет запас готового к освобождению медиатора, однако замедляет темп его восполнения за счет мобилизационного пула.

Загрузка FM 1-43 в нервные окончания на фоне действия форхлорфенурана

Углубление депрессии секреции медиатора при длительном высокочастотном раздражении на фоне

действия форхлорфенурана (рис. 1) также может быть связано и с нарушением процессов эндоцитоза синаптических везикул. Мы попытались проверить это предположение в опытах с флуоресцентным красителем FM 1-43. Известно, что процессы эндоцитоза синаптических везикул следуют за процессами экзоцитоза и осуществляются в соотношении 1 : 1. Поэтому для оценки эндоцитоза необходимо подобрать такие экспериментальные условия, при которых уровень секреции медиатора одинаков в контрольной и опытной (действие ФХФ) сериях, и происходит экзоцитоз одинакового количества везикул. Анализ кумулятивных кривых секреции медиатора (рис. 1Ав) показал, что раздражение контрольных и опытных препаратов с частотой 20 имп/с и продолжительностью 2 и 3 мин соответственно приводит к освобождению примерно одинакового количества квантов медиатора. Такие времена раздражения использованы при изучении загрузки FM 1-43. Если процессы эндоцитоза не страдают, то можно ожидать одинаковой загрузки красителя и одинаковой интенсивности свечения. Однако интенсивность свечения в нервных окончаниях при действии ФХФ оказалась значительно больше, чем в контрольных препаратах: 71.6 ± 2.7 отн. ед. ($n = 123$) и 54.1 ± 2.3 отн. ед. ($n = 123$) соответственно, $p < 0.01$ (рис. 3А). В случае более высокой частоты раздражения, 50 имп/с, продолжительностью 45 с в контрольной и 1 мин в опытной сериях (в данных условиях также освобождается одинаковое количество квантов (рис. 1Бв)) обнаружена статистически значимо более высокая интенсивность флуоресценции при действии ФХФ – 42.9 ± 2.1 отн. ед. ($n = 125$) по сравнению с контролем – 37.0 ± 1.7 отн. ед. ($n = 125$), $p < 0.05$ (рис. 3А). Таким образом, стимуляция полимеризации септинов ФХФ увеличивала количество везикул в нервном окончании, захвативших краситель.

Выгрузка FM 1-43 из нервных окончаний на фоне действия форхлорфенурана

В данной серии экспериментов оценено влияние ФХФ на процессы экзоцитоза синаптических везикул. На первом этапе все препараты загружали FM 1-43. С этой целью проводили длительное раздражение двигательного нерва с частотой 20 имп/с в течение 3 мин в растворе с FM 1-43 [28]. Далее препараты контрольной группы перфузировали стандартным раствором, а опытной – раствором с ФХФ. Спустя 40 мин проводили длительное высокочастотное раздражение (рис. 3Б). При этом наблюдали эффективное снижение интенсивности свечения нервных окончаний вследствие выброса флуоресцентного красителя вместе с медиатором при экзоцитозе синаптических везикул. Обнаружено, что на фоне действия ФХФ

температура выгрузки красителя уменьшался. К окончанию 1-й минуты раздражения с частотой 20 имп/с интенсивность свечения в контрольных и опытных препаратах снижалась до 78.9 ± 1.0 % ($n = 8$) и 77.3 ± 1.3 % ($n = 10$) ($p > 0.05$), а через 10 мин – до 22.7 ± 2.2 % ($n = 8$) и 36.0 ± 3.5 % ($n = 10$) ($p < 0.05$) от исходной величины соответственно (рис. 3Б). При раздражении с частотой 50 имп/с через 1 мин в контрольных и опытных препаратах интенсивность свечения составляла 63.2 ± 2.3 % ($n = 11$) и 68.2 ± 1.8 % ($n = 11$) ($p > 0.05$), а через 10 мин снижалась до 28.3 ± 1.8 % ($n = 11$) и 34.7 ± 2.3 % ($n = 11$) ($p < 0.05$) от исходной величины соответственно (рис. 3Б). Заметно, что статистически значимые отличия контрольной и опытной кривых при использовании раздражения 20 и 50 имп/с отмечались только с 1.5–2.5 мин. Замедление выгрузки указывает на снижение темпа передвижения синаптических везикул рециклирующего и, возможно, резервного пула к местам секреции в активных зонах при действии ФХФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Септины, как и другие элементы цитоскелета, присутствуют в клетке в полимеризованной и деполимеризованной формах. Полимеризованные формы септинов формируются около цитоплазматической мембраны [29], поэтому можно ожидать, что они принимают непосредственное участие в регуляции процессов везикулярного цикла, протекающих около пресинаптической мембраны. Один из наиболее валидных и удобных инструментов при изучении функции септинов – использование форхлорфенурана. Эффекты ФХФ и других способов нарушения работы септинов (использование малых интерферирующих РНК и трансгенных животных) оказались идентичными при изучении самых разнообразных клеточных механизмов [12, 30–34].

Септины в процессах секреции медиатора и экзоцитоза синаптических везикул

Роль септинов в регуляции процессов экзоцитоза и секреции медиатора весьма противоречива. Так, предполагается, что SEPT8 способствует процессам экзоцитоза, разобцая комплекс везикулярных белков VAMP2/синаптофизина, что приводит к последующему их взаимодействию с SNAP25 и сборке комплекса SNARE [14]. В то же время обнаружено, что полимеризованный SEPT5 может образовывать физический барьер в области активных зон, препятствующий процессам экзоцитоза синаптических везикул, а также способен влиять на расстояние между Ca-каналом и синаптической везикулой [10]. У мышей, утративших в результате нокаута возможность экспрессии SEPT4, обнаружено снижение

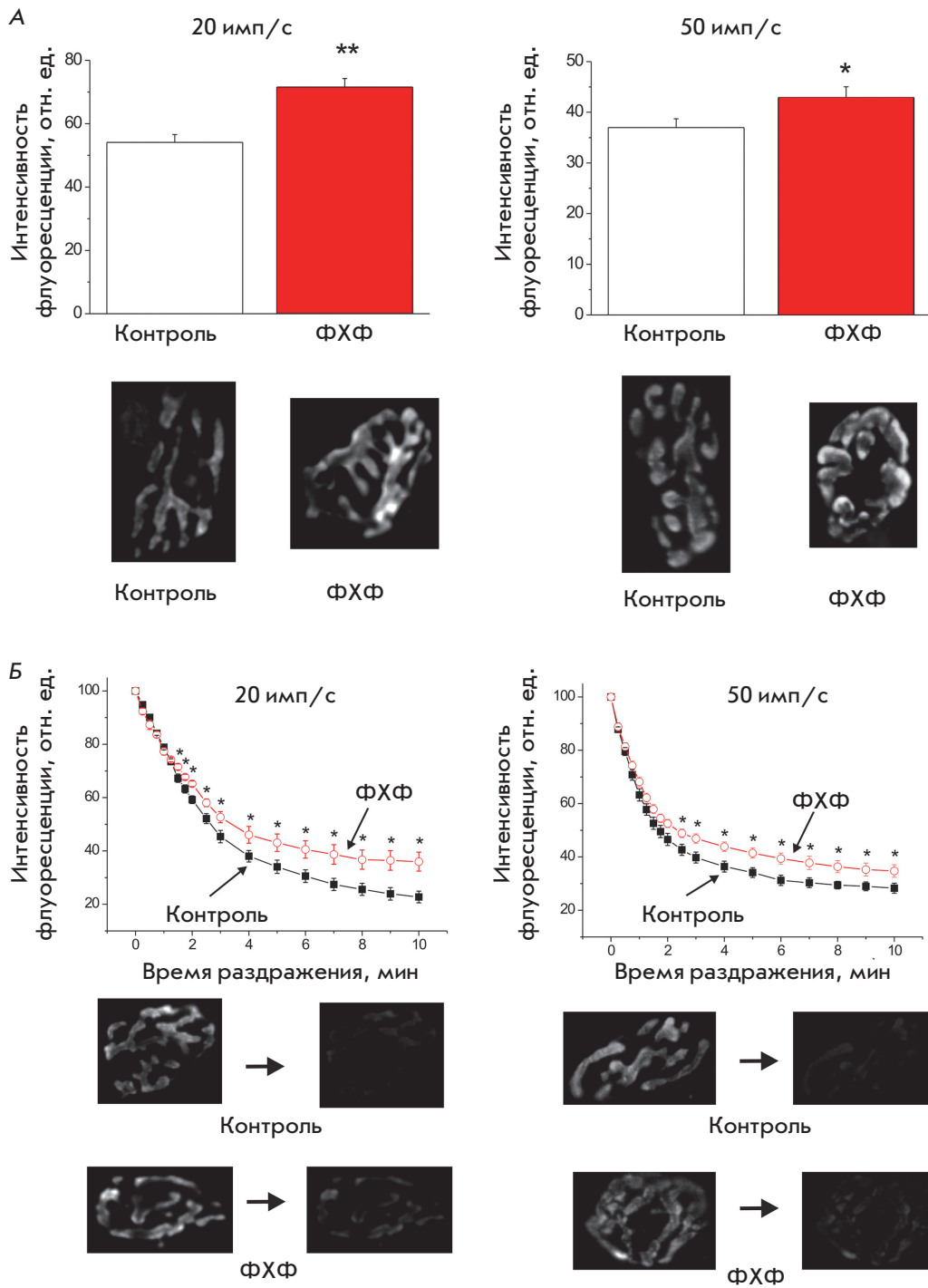


Рис. 3. Загрузка и выгрузка FM 1-43 при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенуона. А – интенсивность флуоресценции нервных окончаний загруженных FM 1-43 при частоте раздражения 20 или 50 имп/с в контроле и на фоне действия ФХФ при одинаковом уровне секреции медиатора (подробнее в тексте). Ниже представлены картины флуоресценции в отдельных экспериментах. Б – динамика спада интенсивности флуоресценции (выгрузка красителя) при высокочастотном раздражении 20 и 50 имп/с предварительно загруженных нервных окончаний в контроле (черные квадраты) и в присутствии ФХФ (белые кружки), в % от первоначальной величины. Ниже приведены картины флуоресценции в начале и в конце высокочастотного раздражения

интенсивности секреции медиатора [35]. Нарушение работы повсеместно экспрессируемого варианта септина SEPT2 выявило изменения процессов экзоцитоза [12]. В то же время не выявлено значимых нарушений секреции медиатора у мышей, не способных экспрессировать SEPT5 и SEPT3 [36]. Показано снижение интенсивности вызванной синхронной и асинхронной, а также спонтанной секреции медиатора

в нервно-мышечном синапсе мышцы при стимуляции полимеризации септинов ФХФ [12]. Мы также обнаружили менее выраженное, но недостоверное снижение уровня квантового состава при действии ФХФ. Полученные различия, вероятно, связаны с использованием разного времени экспозиции ФХФ и неодинаковыми внеклеточными концентрациями кальция. Известно, что действие форхлорфенуона

усиливается при увеличении концентрации или времени экспозиции [19]. Мы использовали экспозицию 40 мин, тогда как в работе [12] экспозиция была более продолжительной – 1 ч. В связи с этим мы могли получить более слабый эффект стимуляции полимеризации септинов на работу белков SNARE-комплекса.

Септины и процессы эндоцитоза синаптических везикул

Интенсивность загрузки флуоресцентного красителя и свечения нервных окончаний на фоне действия ФХФ при одинаковой интенсивности секреции медиатора (одинаковом экзоцитозе) оказалась значительно больше, чем в контрольных препаратах (рис. 3А), т.е. наблюдалось увеличение количества окрашенных везикул в нервном окончании. Эти данные можно было интерпретировать как усиление процессов эндоцитоза синаптических везикул. Однако такое заключение возможно только в том случае, если загруженные красителем везикулы повторно вовлекаются в секрецию медиатора с одинаковой скоростью. Анализ кривых выгрузки красителя (рис. 3Б) показал, что при раздражении с частотой как 20, так и 50 имп/с снижается темп выброса предварительно загруженного флуоресцентного красителя FM 1-43. Это свидетельствует не об усилении эндоцитоза, а о замедлении поступления везикул, захвативших краситель, к местам секреции. В то же время расхождение кривых динамики выгрузки в первые минуты регистрации было не столь значительным, чтобы самостоятельно вызывать снижение на 25–27% количества секретиромых квантов медиатора в условиях действия ФХФ. Поэтому в качестве другого объяснения снижения секреции медиатора в условиях полимеризации септинов можно рассматривать нарушение процессов транспорта и повторного использования синаптических везикул, образованных путем эндоцитоза непосредственно во время высокочастотного раздражения. На это и может указывать обнаруженное усиление захвата флуоресцентного красителя FM 1-43 (рис. 3А). Так, если при высокочастотном раздражении в контроле определенная популяция везикул успевает повторно участвовать в экзоцитозе, освобождая вместе с медиатором FM 1-43, то количество содержащих краситель синаптических везикул в нервном окончании становится меньше ожидаемого. В условиях действия ФХФ вследствие нарушения транспорта синаптических везикул, вновь образованных путем эндоцитоза, уменьшается доля везикул, которая подвергается повторному участию в секреции. В результате количество синаптических везикул, содержащих флуоресцентный краситель, в опыте оказывается выше, чем в контроле, что обуславливает более яркую окра-

ску FM 1-43 в присутствии ФХФ (рис. 3А). В то же время в присутствии ФХФ параллельно может нарушаться сам механизм эндоцитоза, что может вызывать замедление процесса. На возможность участия септинов в процессах эндоцитоза синаптических везикул указывают результаты иммуногистохимических исследований, которые показали выраженную колокализацию SEPT3 с динамином [37]. Также обнаружено взаимодействие с динамином других септинов – SEPT5 и SEPT9 [16].

Септины и процессы транспорта синаптических везикул

В начале длительного высокочастотного раздражения в секреции медиатора принимают участие везикулы пула, готового к освобождению, и рециклирующего пула. Позже (через несколько десятков секунд) в секрецию повторно вовлекаются вновь образованные везикулы. Для этого новая синаптическая везикула должна образоваться посредством эндоцитоза, заполниться медиатором и поступить в рециклирующий пул, а затем посредством мобилизации восполнить пул везикул, готовых к освобождению в активной зоне. Другими словами, существуют две части везикулярного транспортного пути: рециклирующий пул – пул, готовый к освобождению, и эндоцитоз – рециклирующий пул. По всей видимости, септины обеспечивают функционирование обеих этих частей. О снижении эффективности транспорта везикул к активным зонам в условиях полимеризации септинов свидетельствуют электрофизиологические данные о замедленной динамике восстановления готового к освобождению медиатора пула после высокочастотного раздражения (рис. 2). На угнетение транспорта везикул от мест эндоцитоза указывают данные об усилении загрузки и замедлении выгрузки FM 1-43 (рис. 3А,Б).

В качестве механизма участия септинов в транспорте синаптических везикул можно рассматривать обеспечение ими работы актомиозинового мотора. Обнаружено, что септины способны взаимодействовать с актином [38], а также с немышечным миозином II [39], которые участвуют в транспорте синаптических везикул [40–42]. Одним из механизмов, объясняющих нарушение внутриклеточного транспорта, может быть способность полимеризованных септинов образовывать преграды, затрудняющие движение синаптических везикул [5, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что септины принимают участие в процессах везикулярного цикла и повторного использования синаптических везикул в секреции медиатора

при длительной высокочастотной активности нервно-мышечного синапса. ●

*Работа поддержана грантом
РФФИ № 17-04-01870-а, а также грантом*

*Российского научного фонда № 14-15-00847-
П (в части реализации научно-методических
аспектов экспериментального моделирования
нарушений процессов рециклирования
синаптических везикул).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gan Q., Watanabe S. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. V. 12. Article 171.
2. Зефирова А.Л. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2007. Т. 93. № 5. С. 544–562.
3. Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. V. 6. № 1. P. 57–69.
4. Byers B., Goetsch L. // *J. Cell. Biol.* 1976. V. 69. P. 717–721.
5. Mostowy S., Cossart P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 13. № 3. P. 183–194.
6. Hall P.A., Russell S.E. // *J. Pathol.* 2004. V. 204. P. 489–505.
7. Tsang C.W., Estey M.P., DiCiccio J.E., Xie H., Patterson D., Trimble W.S. // *Biol. Chem.* 2011. V. 392. № 8–9. P. 739–749.
8. Tada T., Simonetta A., Batterton M., Kinoshita M., Edbauer D., Sheng M. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. 1752–1758.
9. Xie Y., Vessey J.P., Konecna A., Dahm R., Macchi P., Kiebler M.A. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. 1746–1751.
10. Yang Y.M., Fedchyshyn M.J., Grande G., Aitoubah J., Tsang C.W., Xie H., Ackerley C.A., Trimble W.S., Wang L.Y. // *Neuron.* 2010. V. 67. P. 100–115.
11. Kinoshita A., Noda M., Kinoshita M. // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 428. № 2. P. 223–239.
12. Tokhtaeva E., Capri J., Marcus E.A., Whitelegge J.P., Khuzakhmetova V., Bukharaeva E., Deiss-Yehiely N., Dada L.A., Sachs G., Fernandez-Salas E., et al. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 9. P. 5280–5297.
13. Beites C.L., Campbell K.A., Trimble W.S. // *Biochem. J.* 2005. V. 385. Pt 2. P. 347–353.
14. Ito H., Atsuzawa K., Morishita R., Usuda N., Sudo K., Iwamoto I., Mizutani K., Katoh-Semba R., Nozawa Y., Asano T., Nagata K. // *J. Neurochem.* 2009. V. 108. № 4. P. 867–880.
15. Khuzakhmetova V., Nurullin L., Bukharaeva E. // *Bio-NanoSci.* 2016. V. 6. P. 249–251.
16. Maimaitiyiming M., Kobayashi Y., Kumanogoh H., Nakamura S., Morita M., Maekawa S. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 534. P. 322–326.
17. Zhang J., Kong C., Xie H., McPherson P.S., Grinstein S., Trimble W.S. // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. P. 1458–1467.
18. Krauss M., Haucke V. // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 161. P. 45–66.
19. Hu Q., Nelson W.J., Spiliotis E.T. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 43. P. 29563–29571.
20. del Castillo J., Katz B. // *J. Physiol.* 1954. V. 124. P. 560–573.
21. McLachlan E.M., Martin A.R. // *J. Physiol.* 1981. V. 311. P. 307–324.
22. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron.* 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
23. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология.* 2003. Т. 45. № 12. С. 34–41.
24. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
25. Ruiz R., Cano R., Casanas J.J., Gaffield M.A., Betz W.J., Tabares L. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 6. P. 2000–2008.
26. Zefirov A.L. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1985. V. 98. № 5. P. 1462–1465.
27. Зефирова А.Л., Захаров А.В., Мухаметзянов Р.Д., Петров А.М., Ситдикова Г.Ф. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2008. Т. 94. № 2. С. 129–141.
28. Grigoryev P.N., Zefirov A.L. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 3. P. 81–88.
29. Bridges A.A., Zhang H., Mehta S.B., Occhipinti P., Tani T., Gladfelter A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 6. P. 2146–2151.
30. Vagin O., Tokhtaeva E., Garay P. E., Souda P., Bassilian S., Whitelegge J.P., Lewis R., Sachs G., Wheeler L., Aoki R., et al. // *J. Cell. Sci.* 2014. V. 127. P. 3294–3308.
31. Wasik A.A., Polianskyte-Prause Z., Dong M.Q., Shaw A.S., Yates J.R. 3rd, Farquhar M. G., Lehtonen S. // *Mol. Biol. Cell.* 2012. V. 23. P. 3370–3379.
32. Ghossoub R., Hu Q., Failler M., Rouyez M.C., Spitzbarth B., Mostowy S., Wolfrum U., Saunier S., Cossart P., Jamesnelson W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. P. 2583–2594.
33. Kim S.K., Shindo A., Park T.J., Oh E.C., Ghosh S., Gray R.S., Lewis R.A., Johnson C.A., Attie-Bittach T., Katsanis N., et al. // *Science.* 2010. V. 329. P. 1337–1340.
34. Mostowy S., Danckaert A., Tham T.N., Machu C., Guadagnini S., Pizarro-Cerdá J., Cossart P. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 11613–11621.
35. Ihara M., Yamasaki N., Hagiwara A., Tanigaki A., Kitano A., Hikawa R., Tomimoto H., Noda M., Takashi M., Mori H., et al. // *Neuron.* 2007. V. 53. № 4. P. 519–533.
36. Tsang C.W., Fedchyshyn M., Harrison J., Xie H., Xue J., Robinson P.J., Wang L.Y., Trimble W.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 23. P. 7012–7029.
37. Xue J., Tsang C.W., Gai W.P., Malladi C.S., Trimble W.S., Rostas J.A., Robinson P.J. // *J. Neurochem.* 2004. V. 91. № 3. P. 579–590.
38. Kinoshita M., Field C.M., Coughlin M.L., Straight A.F., Mitchison T.J. // *Dev. Cell.* 2002. V. 3. № 6. P. 791–802.
39. Joo E., Surka M.C., Trimble W.S. // *Dev. Cell.* 2007. V. 13. № 5. P. 677–690.
40. Miki T., Malagon G., Pulido C., Llano I., Neher E., Marty A. // *Neuron.* 2016. V. 91. № 4. P. 808–823.
41. Grigoryev P.N., Zefirov A.L. // *Dokl. Biol. Sci.* 2016. V. 470. № 1. P. 217–219.
42. Hayashida M., Tanifuji S., Ma H., Murakami N., Mochida S. // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 23. P. 8901–8913.