

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОФОРМ СУБЪЕДИНИЦЫ $\alpha 1$ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Ca^{2+} -КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВ Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 В ЗОНАХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2020 г. Л. Ф. Нуруллин^{1, 2, 3, *}, Е. М. Волков^{1, **}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, 420111 Россия

³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*E-mail: lenizn@yandex.ru

**E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2019 г.

После доработки 18.11.2019 г.

Принята к публикации 19.11.2019 г.

Методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris* идентифицированы следующие субъединицы $\alpha 1$ потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов: $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$ каналов типов $\text{Ca}_v1.1$ – 1.4 ; $\alpha 1A$ канала типа $\text{Ca}_v2.1$; $\alpha 1E$ канала типа $\text{Ca}_v2.3$ и $\alpha 1G$, $\alpha 1I$, $\alpha 1H$ канала типов $\text{Ca}_v3.1$ – 3.3 , а также определен белок экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул синаптофизин. Пресинаптическая мембрана холинергических синапсов содержит потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы типов $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$ (в состав которых входят субъединицы $\alpha 1S$ и $\alpha 1C$), $\text{Ca}_v2.1$ (с субъединицей $\alpha 1A$), $\text{Ca}_v2.3$ (с субъединицей $\alpha 1E$), $\text{Ca}_v3.2$ и $\text{Ca}_v3.3$ (с субъединицами $\alpha 1H$, $\alpha 1I$), тогда как Ca^{2+} -каналы $\text{Ca}_v1.3$ и $\text{Ca}_v1.4$ (имеющие субъединицы $\alpha 1D$, $\alpha 1F$) и каналы $\text{Ca}_v3.1$ (с субъединицей $\alpha 1G$) преимущественно входят в состав мышечных мембран.

Ключевые слова: потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, изоформы субъединицы $\alpha 1$, соматическая мышца, холинергические синапсы, аннелиды

DOI: 10.31857/S0041377120020042

Ключевым моментом в процессе запуска везикулярного цикла синаптических пузырьков, лежащего в основе секреции медиатора, является вход Ca^{2+} в двигательные нервные окончания через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы состоят из каналообразующей субъединицы $\alpha 1$, связанной с тремя вспомогательными субъединицами $\alpha 2/\delta$, β , и γ (Catterall, 2000). Субъединица $\alpha 1$ в составе ионного канала может быть представлена различными изоформами. Каждая подобная изоформа контролируется отдельным геном. В настоящее время известно, что геном как позвоночных, так и беспозвоночных животных может включать до 10 подобных генов (Catterall et al., 2005). Так, изоформы $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ и $\alpha 1F$ субъединицы $\alpha 1$ характерны для каналов $\text{Ca}_v1.1$ – 1.4 , субъединица $\alpha 1A$ – для

$\text{Ca}_v2.1$, $\alpha 1B$ – для $\text{Ca}_v2.2$, $\alpha 1E$ – для $\text{Ca}_v2.3$, $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ и $\alpha 1I$ – для $\text{Ca}_v3.1$ – 3.3 (Catterall et al., 2005).

Ca^{2+} -каналы, в состав которых входят разные изоформы субъединицы $\alpha 1$, имеют разную чувствительность к деполяризации и по этому критерию и ряду фармакологических отличий объединяются в ряд семейств, а именно: высокопороговые каналы $\text{Ca}_v1.1$ – 1.4 (L-типа), $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-типа), $\text{Ca}_v2.2$ (N-типа) и низкопороговые $\text{Ca}_v3.1$ – 3.3 (T-типа) (Catterall, 2000; Nurullin et al., 2011; Нуруллин и др., 2013). Между высокопороговыми и низкопороговыми каналами находятся каналы типа $\text{Ca}_v2.3$ (R-типа) (Pagdo et al., 2006; Wormuth et al., 2016). Характеристики экзо(эндо)везикулярного цикла, а именно синхронности вызванного и спонтанного выброса медиатора в нервно-мышечных синапсах в значительной степени определяются особенностями функционирования Ca^{2+} -каналов пресинаптической мембраны (Smith et al., 2012; Kaeser, Regehr, 2014). Установлено,

Принятые сокращения: АХ – ацетилхолин, ТМР-Б – тетраметилродамин- α -бунгаротоксин.

что соматическая мышца дождевого червя иннервируется холинергическими синапсами (Walker et al., 1993; Волков и др., 2012), везикулярный цикл в которых имеет ярко выраженную Ca^{2+} -зависимость (Волков, 2012). В пресинаптических образованиях выявляется ряд ключевых Ca^{2+} -сенсорных белков везикулярного цикла, а также Ca^{2+} -каналы типа $\text{Ca}_v2.2$ (Волков и др., 2012). Наличие же иных описанных выше типов Ca^{2+} -каналов в холинергических нервно-мышечных синапсах в эволюционно-первичной поперечно-исчерченной двигательной мускулатуре аннелид остается не известным.

Таким образом, в соответствии с целью настоящего исследования были сформулированы следующие задачи: 1) определение типов Ca^{2+} -каналов на основании иммунофлуоресценции и входящих в их состав изоформ $\alpha 1$ -субъединицы; 2) изучение особенностей локализации Ca^{2+} -каналов, входящих в состав разных семейств на пре- и постсинаптической мембранах холинергических двигательных нервно-мышечных синапсов соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделенные препараты фрагментов кожно-мускульного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris* закрепляли с помощью иглолок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древес-Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 трис, 167 сахараза, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Далее в течение 30 мин препараты фиксировали в 2% растворе *p*-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буфере. Мышцы последовательно инкубировали в 0.5% растворе тритона X-100 30 мин, в растворе, содержащем 5% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% тритона X-100 15 мин и еще 15 мин в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% тритона X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на фосфатном буфере.

Затем препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с поликлональными антителами к субъединицам потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов $\alpha 1A$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1E$, $\alpha 1F$, $\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$, $\alpha 1S$ и синаптофизину (все в разведении 1 : 200). Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1 : 800) в растворе А. Окрашивание постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых (АХ) рецепторов производили с помощью тетраметилродамин- α -бунгаротоксин (ТМР-Б, 20 мкг/мл) в течении 30 мин. Для подтверждения специфичности связывания поликлональных антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для нега-

тивного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие окрашивания в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

После отмывки в фосфатном буфере препараты помещали в раствор фосфатного буфера с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия) с применением масляного иммерсионного объектива $63\times/1.4$. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся аргоновый и гелий-неоновый лазеры. Длины волн возбуждения: для флуорофоров Alexa 488 – 488 нм, тетраметилродамин – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Использовали следующие реактивы: *p*-формальдегид, трис, фосфатный буфер (137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na_2SO_4 , 1.4 KH_2PO_4 , pH 7.2), Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, бычий сывороточный альбумин, ТМР-Б, глицерин (Sigma-Aldrich, США); первичные поликлональные антитела и соответствующие им иммуногенные пептиды (Santa Cruz Biotechnologies, США); антитела вторичные Alexa 488 и Alexa 647 (Invitrogen, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве маркера двигательных нервных окончаний использовали белок синаптофизин, обязательный компонент молекулярной машины экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул (Valtorta et al., 2004; Kwon, Chapman, 2011). Для определения зоны постсинаптической мембраны холинергических синапсов применяли специфический блокатор никотинового АХ-рецептора – ТМР-Б (Krause, Wernig, 1985; Nurullin et al., 2011). Иммуногистохимическое окрашивание препарата кожно-мускульного мешка дождевого червя антителами на $\alpha 1S$ субъединицу потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $\text{Ca}_v1.1$ выявило иммунопозитивную реакцию на данную субъединицу (рис. 1а, е). При этом окрашивание на $\alpha 1S$ выявилось во всех зонах наблюдения (рис. 1а, е). Окрашивание субъединицы $\alpha 1S$ совпадало с окрашиванием антителами на белок синаптофизин (рис. 1а, б, г, е, ж, и, стрелки) и в некоторых местах с окрашиванием ТМР-Б АХ-рецепторов (рис. 1а, в, д, е, з, к, стрелки). Можно предположить, что число Ca^{2+} -каналов типа $\text{Ca}_v1.1$, имеющих в своем составе субъединицу $\alpha 1S$, возрастает в зоне двигательных нервных окончаний.

В структуру Ca^{2+} -каналов типа Ca_v1 входят также субъединицы $\alpha 1C$ ($\text{Ca}_v1.2$), $\alpha 1D$ ($\text{Ca}_v1.3$) и $\alpha 1F$

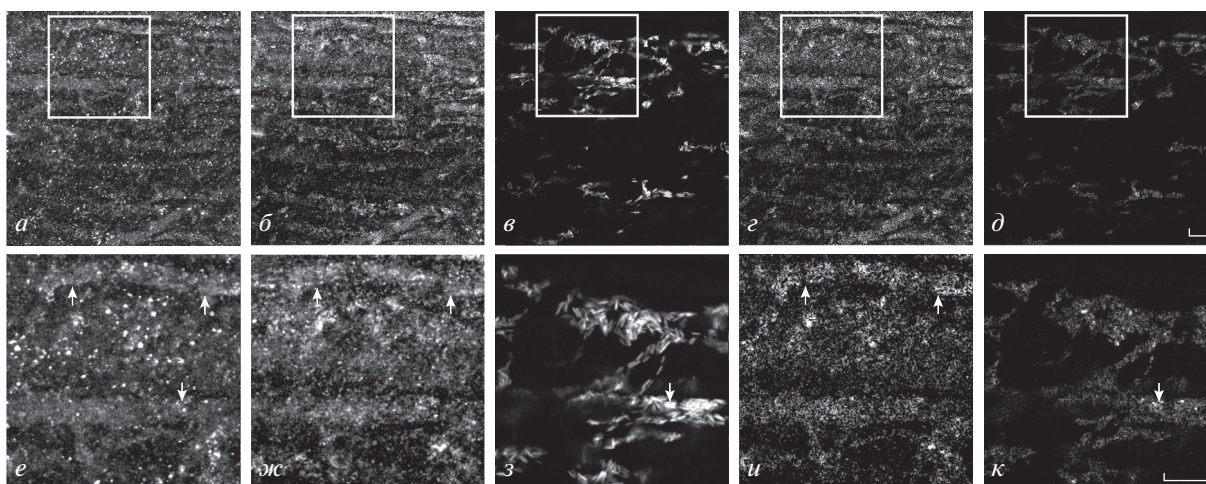


Рис. 1. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1S$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v1.1$; антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*); окрашивание тетраметилродамин- α -бунгаротоксином (ТМР-Б) никотиновых ацетилхолиновых (АХ) рецепторов (*в, з*). На всех рисунках (рис. 1–9): на *нижней панели* представлены увеличенные области, соответствующие *выделенным квадратам* на *верхней панели*; *г* – программно-обработанное изображение, полученное при совмещении изображений *a* и *б* (субъединица $\alpha 1$ и синаптофизин), демонстрирующее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели (*и* – увеличенная область изображения *г*); *д* – программно-обработанное изображение, полученное при совмещении изображений *a* и *в* ($\alpha 1$ субъединица и ТМР-Б), демонстрирующее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели (*к* – увеличенная область изображения *д*). При наложении двух изображений светлые пиксели, присутствующие только на одном из изображений, на итоговых изображениях не учитывались. Таким образом, можно увидеть места совпадения окрашивания на указанные маркеры. На нижних панелях *стрелки* указывают на места совпадения окрашивания на указанную субъединицу, синаптофизин и АХ-рецепторы. Масштабная линейка – 10 мкм.

($Ca_v1.4$). Дальнейшие исследования показали, что окрашивание на субъединицы $\alpha 1C$ и $\alpha 1D$ было неравномерным (рис. 2*a, e, 3a, e*). Участки окрашивания на $\alpha 1C$ совпадали с окрашиванием на АХ-рецепторы (рис. 2*a, в, д, e, з, к, стрелки*), но не совпадало с окрашиванием на синаптофизин (рис. 2*a, б, г, e, ж, и*). Окрашивание на $\alpha 1D$ не совпадало с окрашиванием на синаптофизин и АХ-рецепторы (рис. 3*a–к*). Весьма вероятно, что Ca^{2+} -каналы $Ca_v1.2$, имеющие в своем составе субъединицу $\alpha 1C$, в большей степени сосредоточены в зоне постсинаптической мембраны холинергических синапсов, тогда как каналы типа $Ca_v1.3$, имеющие субъединицу $\alpha 1D$, не имеют такой специфической концентрации в зоне пресинаптической и постсинаптической мембран нервно-мышечного синапса. Окрашивание на наличие $\alpha 1F$ субъединицы Ca^{2+} -канала ($Ca_v1.4$ типа) обнаруживалось во всех зонах наблюдения (рис. 4*a, e*) и не совпадало с одновременным окрашиванием на синаптофизин и АХ-рецепторы (рис. 4*a–к*). По всей видимости Ca^{2+} -каналы $Ca_v1.4$, имеющие в своем составе субъединицу $\alpha 1F$, сосредоточены преимущественно в мембранах клеток мышечной ткани.

Окрашивание препарата антителами на $\alpha 1A$ субъединицу Ca^{2+} -канала типа $Ca_v2.1$ имело неравномерный характер (рис. 5*a, e*). Наиболее интенсивные участки окрашивания на эту субъединицу совпадали с окрашиванием антителами на синаптофизин и с окрашиванием ТМР-Б АХ-рецепторов (рис. 5*a–к*,

стрелки). Можно предположить, что пресинаптическая мембрана холинергических нервно-мышечных синапсов соматической мышцы дождевого червя содержит Ca^{2+} -каналы типа $Ca_v2.1$.

Окрашивание препарата на $\alpha 1E$ -субъединицу Ca^{2+} -канала $Ca_v2.3$ также было неравномерным (рис. 6*a, e*). Однако при этом некоторые участки интенсивной окраски на $\alpha 1E$ субъединицу совпадали с окрашиванием на АХ-рецепторы (рис. 6*a, в, д, e, з, к, стрелки*), но не с окрашиванием на синаптофизин (рис. 6*a, б, г, e, ж, и*). Данное обстоятельство можно трактовать как наличие в зоне постсинаптической мембраны холинергических синапсов в соматической мышце дождевого червя Ca^{2+} -каналов типа $Ca_v2.3$.

Окрашивание препарата на $\alpha 1G$ субъединицу Ca^{2+} -канала ($Ca_v3.1$ типа) обнаруживалось во всех участках наблюдения (рис. 7*a, e*) и не совпадало с одновременным окрашиванием на синаптофизин и АХ-рецепторы (рис. 7*a–к*). Можно думать, что Ca^{2+} -каналы $Ca_v3.1$ распределяются по мембране клеток соматической мышцы дождевого червя. Известно, что этот тип Ca^{2+} -каналов участвует в спонтанной сократительной активности (Catterall, 2000). Также известно, что соматическая мышца дождевого червя обладает способностью к спонтанной сократительной активности по типу сердечной мышцы позвоночных (Давид, 1990). Весьма вероятно, что этот тип мы-

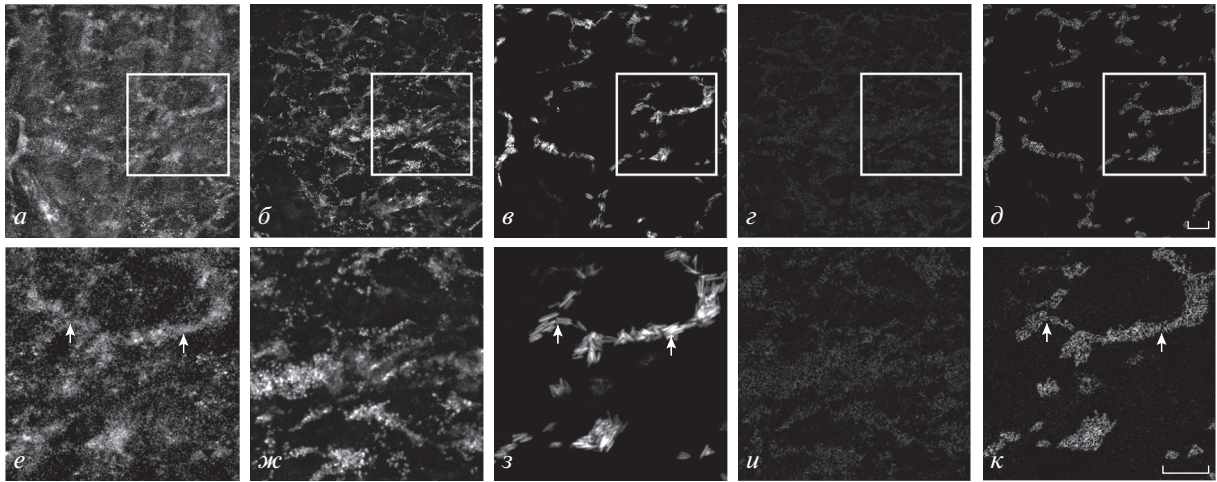


Рис. 2. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1C$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v1.2$, антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и красителем ТМР-Б рецепторов АХ (*в, з*). Здесь и на рис. 3–9: *г, д, и, к* – объяснения в подписи к рис. 1.

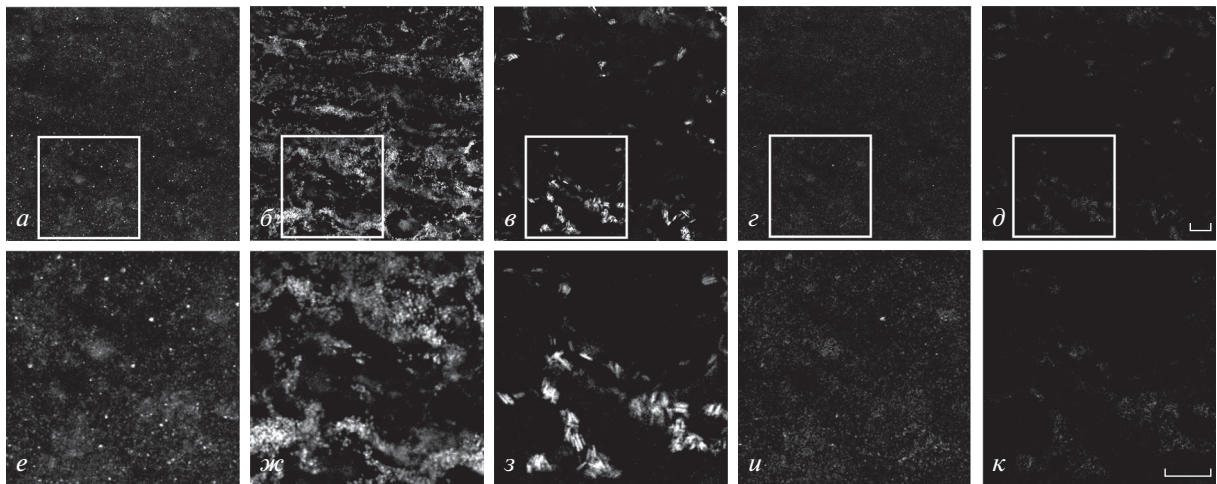


Рис. 3. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1D$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v1.3$, антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и красителем ТМР-Б рецепторов АХ (*в, з*).

печной активности в мышце аннелид связан с работой соответствующего типа Ca^{2+} -каналов. Окрашивание на $\alpha 1H$ субъединицу Ca^{2+} -канала $Ca_v3.2$ было неравномерным (рис. 8*a, e*), имело разную интенсивность и во многом совпадало с окрашиванием на АХ-рецепторы (рис. 8*a, в, д, e, з, к, стрелки*), а в некоторых местах совпадало с окрашиванием на синаптофизин (рис. 8*a, б, г, e, ж, и*). При этом окрашивание на синаптофизин было в виде тяжей (рис. 8*б, ж, стрелки*), которые визуальнo соединялись со свечением субъединицы $\alpha 1H$ (рис. 8*a, e*) и АХ-рецепторов (рис. 8*в, з*).

Окрашивание на $\alpha 1I$ -субъединицу Ca^{2+} -канала $Ca_v3.3$ было также неравномерным (рис. 9*a, e*), и в зонах, где интенсивность свечения была больше, окрашивание на $\alpha 1I$ -субъединицу практически пол-

ностью совпадало с окрашиванием на синаптофизин (рис. 9*a, б, г, e, ж, и, стрелки*), а в некоторых участках совпадало с окрашиванием и на АХ-рецепторы (рис. 9*a, в, e, д, e, з, к, стрелки*). Таким образом, есть основание полагать, что Ca^{2+} -каналы типа Ca_v3 , имеющие в своем составе субъединицы $\alpha 1H$ ($Ca_v3.2$) и $\alpha 1I$ ($Ca_v3.3$), могут присутствовать на мембране пресинаптических окончаний холинергических двигательных синапсов в мышце дождевого червя.

Таким образом, в геноме дождевого червя *Lumbricus terrestris* имеются гены, кодирующие пептидные молекулы $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$ (субъединицы) Ca^{2+} -каналов типов $Ca_v1.1$ – 1.4 , субъединицу $\alpha 1A$ Ca^{2+} -канала типа $Ca_v2.1$, $\alpha 1E$ -субъединицу Ca^{2+} -канала

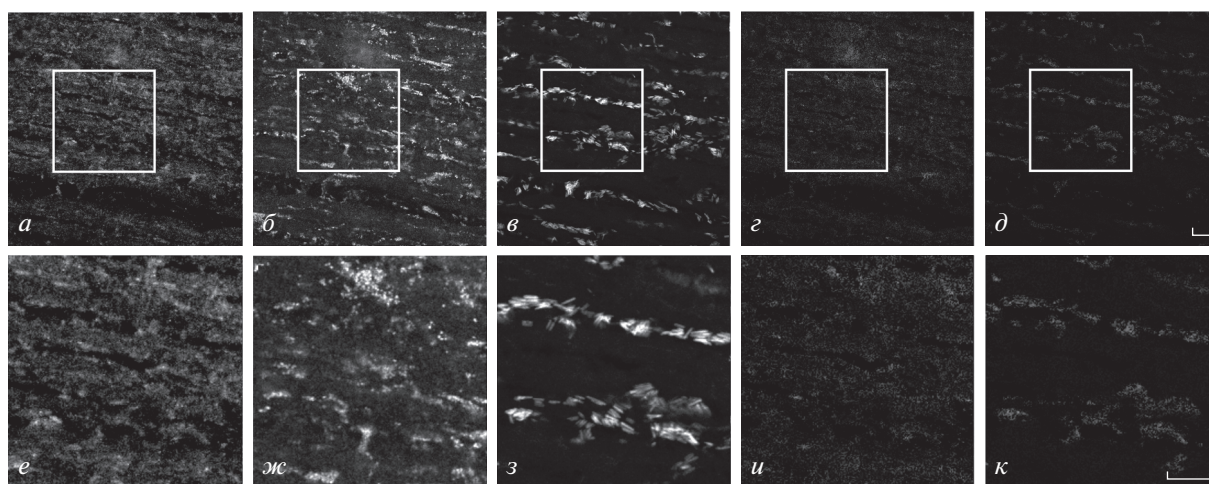


Рис. 4. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1F$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v1.4$, антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и красителем TMR-B рецепторов АХ (*в, з*).

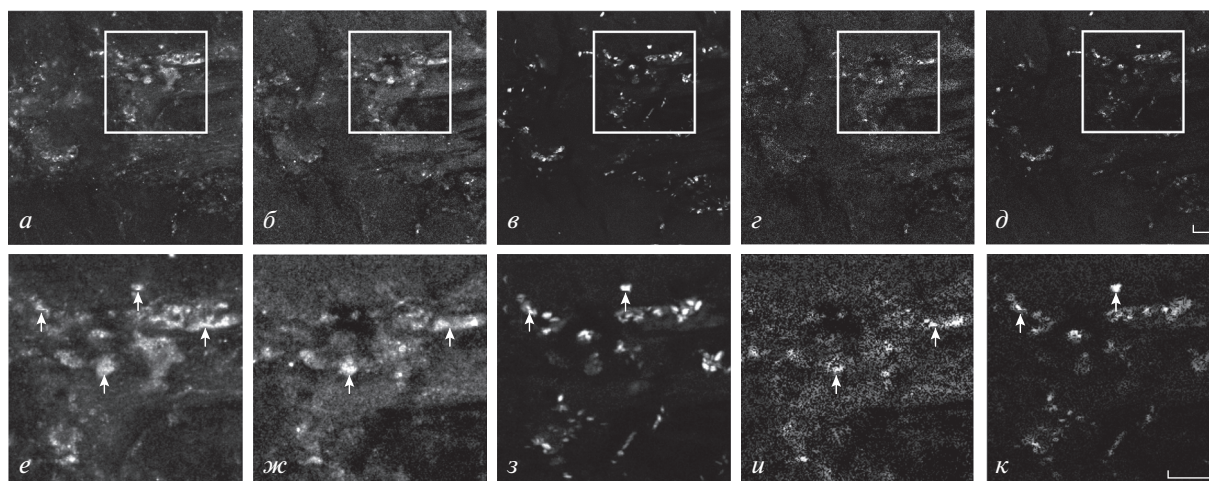


Рис. 5. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1A$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v2.1$, антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и TMR-B рецепторов АХ (*в, з*).

$Ca_v2.3$ и субъединицы $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ и $\alpha 1I$ Ca^{2+} -каналов типов $Ca_v3.1-3.3$.

Ранее в соматических мышечных волокнах дождевого червя нами была показана возможность экспрессии $\alpha 1B$ -субъединицы Ca^{2+} -канала типа $Ca_v2.2$ (Волков и др., 2012). Таким образом, в нервно-мышечных синапсах и клетках соматической мышцы аннелид имеются практически все известные типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, характерных как для позвоночных, так и беспозвоночных животных (Catterall, 2000; Jeziorski et al., 2000). Концентрация Ca^{2+} -каналов Ca_v1 , имеющих в своем составе субъединицы $\alpha 1S$ ($Ca_v1.1$) и $\alpha 1C$ ($Ca_v1.2$) выше в зоне холинергических нервно-мышечных двигательных

синапсов, тогда как Ca^{2+} -каналы данного типа, имеющие в своей структуре субъединицы $\alpha 1D$ ($Ca_v1.3$) и $\alpha 1F$ ($Ca_v1.4$) такой локальной концентрации не имеют и распределены по всем мембранам мышечных клеток. Ca^{2+} -каналы $Ca_v2.1$, имеющие в своем составе субъединицу $\alpha 1A$, сосредоточены в области нервно-мышечных синапсов. Ca^{2+} -каналы типа $Ca_v2.3$, имеющие в своем составе субъединицу $\alpha 1E$, так же, хотя и в меньшей степени, сосредоточены в зоне холинергических синапсов. И, наконец, Ca^{2+} -каналы Ca_v3 , имеющие в своем составе субъединицы $\alpha 1H$ ($Ca_v3.2$) и $\alpha 1I$ ($Ca_v3.3$), также сосредоточены почти исключительно в зоне двигательных нервных окон-

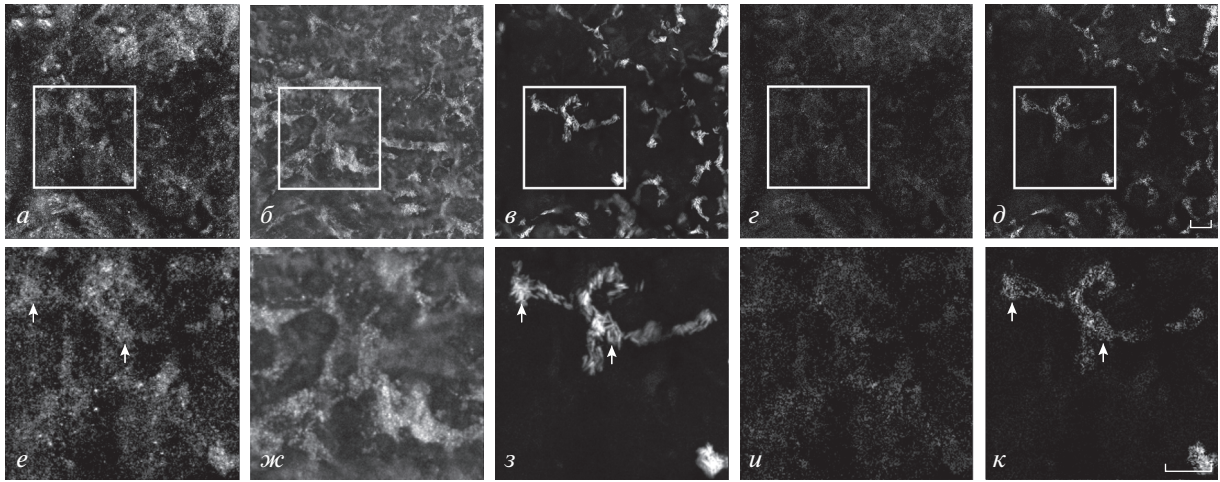


Рис. 6. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1E$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v2.3$ антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и красителем TRP-Б рецепторов АХ (*в, з*).

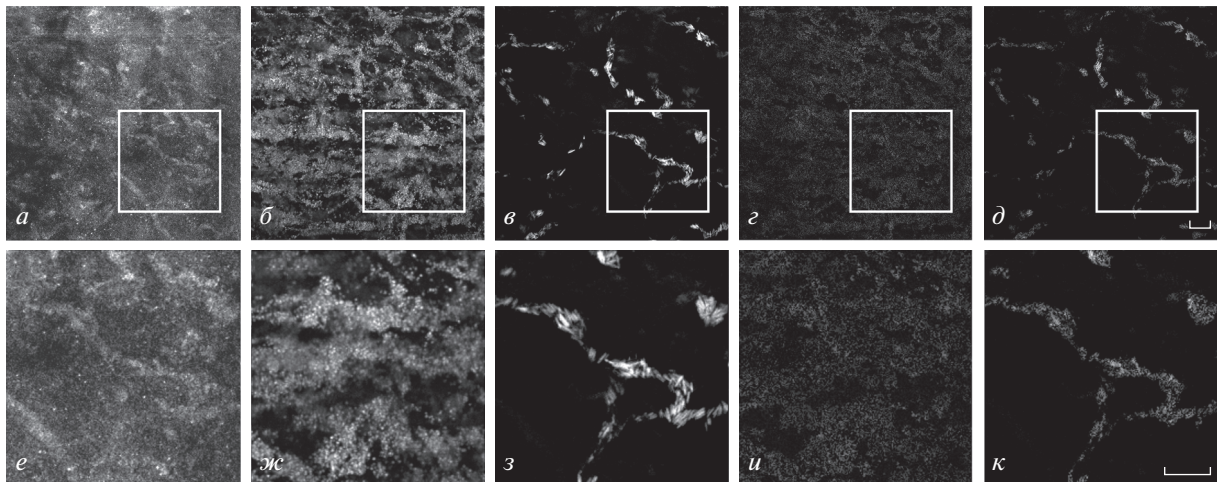


Рис. 7. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1G$ (*a, e*) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v3.1$ антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (*б, ж*) и TRP-Б рецепторов АХ (*в, з*).

чений, тогда как Ca^{2+} -каналы $Ca_v3.1$ с субъединицей $\alpha 1G$ – на мембранах мышечных клеток.

Кроме того, в ходе проведенных экспериментов впервые определен белок молекулярной машины везикулярного цикла нервных окончаний синаптофизин, который дополняет семейство ранее выявленных подобных белков, таких как синаптотагмин 1 и синтаксин 1 в нервно-мышечных синапсах дождевого червя (Волков и др., 2012).

Проведенные эксперименты и их обсуждение позволяют предположить, что пресинаптическая мембрана холинергических синапсов соматической мышцы дождевого червя содержит следующие типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (в соответствии с идентифицированными изоформами субъедини-

цы $\alpha 1$): $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$ (с субъединицами $\alpha 1S$, $\alpha 1C$), $Ca_v2.1$ ($\alpha 1A$), $Ca_v2.3$ ($\alpha 1E$), $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ ($\alpha 1H$, $\alpha 1I$), а также Ca^{2+} -канала $Ca_v2.2$ ($\alpha 1B$) (Волков и др., 2012). Тогда как Ca^{2+} -каналы $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$ (с субъединицами $\alpha 1D$, $\alpha 1F$) и каналы $Ca_v3.1$ ($\alpha 1G$) преимущественно входят в состав мышечных мембран.

Таким образом в нервно-мышечных синапсах и клетках соматической мышцы аннелид имеются практически все известные типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, характерных как для позвоночных (Catterall, 2000), так и беспозвоночных животных (Jeziorski et al., 2000), но имеющих свою специфику распределения по возбудимым мембранам нервных и мышечных клеток.

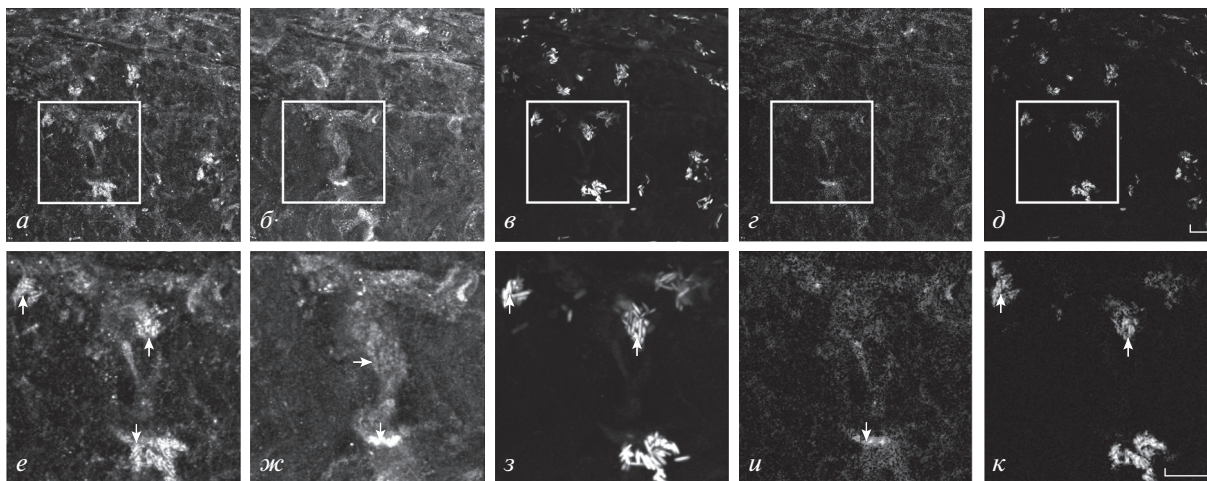


Рис. 8. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1N$ (а, е) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v3.2$ антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (б, ж) и ТМР-Б рецепторов АХ (в, з).

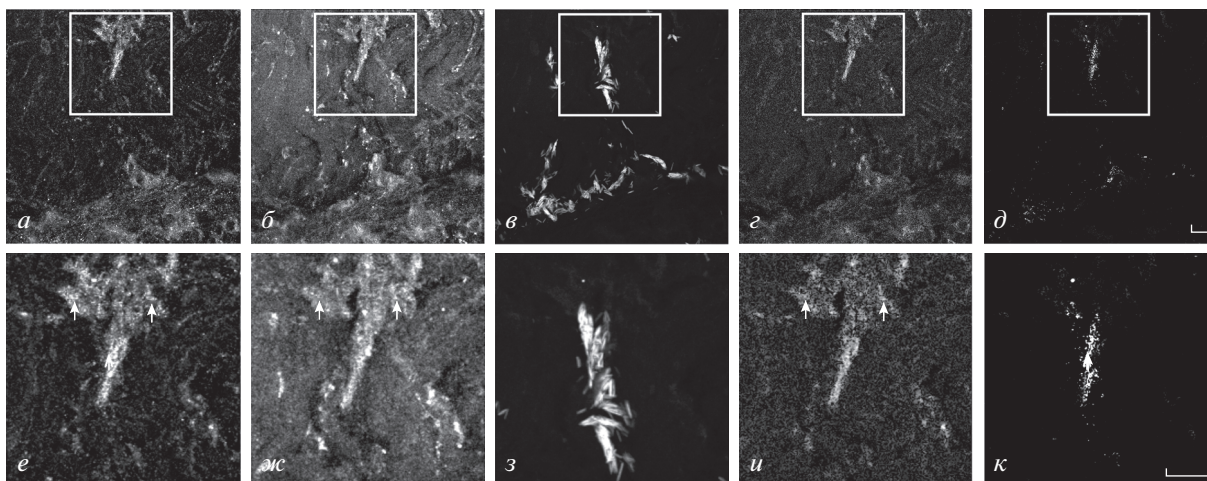


Рис. 9. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя антителами к субъединице $\alpha 1I$ (а, е) потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала типа $Ca_v3.3$, антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (б, ж) и окрашивание ТМР-Б рецепторов АХ (в, з).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы исследований Казанского государственного медицинского университета, а также в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что все манипуляции с животными соответствовали нормам российского законодательства, а также рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волков М.Е.* 2012. Прижизненная окраска нервных образований флуоресцентными красителями и оптическое определение ацетилхолина в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Бюл. эксперим. биол. мед. Т. 54. № 7. С. 112. (*Volkov M.E.* 2012. Vital staining of nerve structures with fluorescent dyes and optical determination of acetylcholine in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Bull. Exper. Biol. Med. V. 154. № 1. P. 100.)
- Волков М.Е., Волков Е.М., Нуруллин Л.Ф.* 2012. Иммуноцитохимическая идентификация синаптогамина 1,

- синтаксина 1, Ca²⁺-канала N-типа и H-холинорецептора в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Цитология. Т. 54. № 11. С. 847. (Volkov M.E., Volkov E.M., Nurullin L.F. 2012. Immunocytochemical identification of synaptotagmin 1, syntaxin 1, N-type Ca(2+)-channel and nicotinic cholinoreceptor in motor neuromuscular junctions of earthworm somatic muscle *Lumbricus terrestris*. Tsitologiya. V. 54. № 11. P. 847.)
- Давид О.Ф. 1990. Морфофизиологические основы локомоции аннелид. Л.: Наука. (David O.F. 1990. Morphophysiological basis of annelid locomotion. L.: Science.)
- Нуруллин Л.Ф., Ценцевичский А.Н., Маломуж А.И., Никольский Е.Е. 2013. Обнаружение низкопороговых кальциевых каналов Т-типа (CaV3) в нервно-мышечном синапсе лягушки Доклады Академии наук. Т. 449 № 3. С. 360. (Nurullin L.F., Tsentsevitsky A.N., Malomouzh A.I., Nikolsky E.E. 2013. Revealing of T-type low-voltage activated calcium channels (CaV3) in frog neuromuscular junctions. Dokl. Biol. Sci. V. 449. № 3. P. 73.)
- Catterall W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. V. 16. P. 521.
- Catterall W.A., Perez-Reyes E., Snutch T.P., Striessnig J. 2005. International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol. Rev. V. 57. P. 411.
- Jeziorski M.C., Greenberg R.M., Anderson P.A. 2000. The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca(2+) channels. J. Exp. Biol. V. 203. P. 841.
- Kaesler P.S., Regehr W.G. 2014. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. Annu. Rev. Physiol. V. 76. P. 333.
- Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. J. Neurocytol. V. 14. P. 765.
- Kwon S.E., Chapman E.R. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Neuron. V. 70. P. 847.
- Nurullin L.F., Mukhitov A.R., Tsentsevitsky A.N., Petrova N.V., Samigullin D.V., Malomouzh A.I., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog: Neuromuscular junction. Physiol. Res. V. 60. P. 815.
- Pardo N.E., Hajela R.K., Atchison W.D. 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) Ca²⁺ channels. J. Pharmacol. Exp. Ther. V. 319. P. 1009.
- Smith S.M., Chen W., Vyleta N.P., Williams C., Lee C.H., Phillips C., Andresen M.C. 2012. Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release. Cell Calcium. V. 52. P. 226.
- Valtorta F., Pennuto M., Bonanomi D., Benfenati F. 2004. Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? Bioessays. V. 26. P. 445.
- Walker R.J., Holden-Dye L., Franks C.J. 1993. Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. Comp. Biochem. Physiol. C. V. 106. P. 49.
- Wormuth C., Lundt A., Henseler C., Müller R., Broich K., Papazoglou A., Weiergräber M. 2016. Review: Cav2.3 R-type voltage-gated Ca²⁺ channels – functional implications in convulsive and non-convulsive seizure activity. Open Neurol. J. V. 10. P. 99.

IMMUNOFLUORESCENT IDENTIFICATION OF ISOFORMS SUBUNIT $\alpha 1$ VOLTAGE-GATED Ca²⁺ CHANNELS Ca_v1, Ca_v2 AND Ca_v3 IN CHOLINERGIC SYNAPSES ZONES OF SOMATIC MUSCLES EARTHWORM *LUMBRICUS TERRESTRIS*

L. F. Nurullin^{a, b, c, *} and E. M. Volkov^{a, **}

^aKazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia

^bKazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420111 Russia

^cKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: lenizn@yandex.ru

**e-mail: euroworm@mail.ru

Using fluorescence and confocal microscopy, in somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris* identified $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$ subunits of Ca_v1.1-1.4 types, $\alpha 1A$ subunit of Ca_v2.1 type, $\alpha 1E$ subunit of Ca_v2.3 type and $\alpha 1G$, $\alpha 1I$, $\alpha 1H$ subunits of Ca_v3.1-3.3 types, as well as protein of exo-endocytotic cycle of synaptic vesicles, synaptophysin. The presynaptic membrane of cholinergic synapses contains voltage-gated Ca²⁺ channels of Ca_v1.1 and Ca_v1.2 types, which include subunits $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, Ca_v2.1 type ($\alpha 1A$ subunit), Ca_v2.3 type ($\alpha 1E$) and Ca_v3.2, Ca_v3.3 types ($\alpha 1H$, $\alpha 1I$), while Ca²⁺ channels Ca_v1.3 and Ca_v1.4 types having subunits $\alpha 1D$, $\alpha 1F$ and Ca_v3.1 type ($\alpha 1G$) are predominantly part of muscle membranes.

Keywords: voltage-gated Ca²⁺-channels, isoforms of subunit $\alpha 1$, somatic muscle, cholinergic synapses, annelids