

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СИНАПТОТАГМИНА 1, СИНТАКСИНА 1, Ca²⁺-КАНАЛА N-ТИПА И Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ СОМАТИЧЕСКОЙ МЫШЦЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© М. Е. Волков,¹ Е. М. Волков,^{1,*} Л. Ф. Нуруллин²

¹ Казанский государственный медицинский университет МЗ и СР РФ

и ² Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН;

* e-mail: euroworm@mail.ru

Соматическая мышца дождевого червя содержит мионевральные синапсы, образующие скопления «синаптических бутонов», в которых идентифицируются белки синтаксин 1, синаптотагмин 1 и субъединица альфа-1В Ca²⁺-канала N-типа. Предполагается, что синаптические бутоны содержат ограниченное число активных зон, что обусловлено их малыми размерами (1—2 мкм) и характером распределения белков экзо-эндоцитозного цикла. Постсинаптическая мембрана холинергических синапсов содержит ацетилхолиновые рецепторы N-типа, способные связываться с альфа-бунгаротоксином. Зона расположения рецепторов на постсинаптической мембране строго ограничена зоной синаптического контакта.

Ключевые слова: мионевральный синапс, синтаксин, синаптотагмин, Ca²⁺-канал, ацетилхолиновый рецептор, дождевой червь.

В основе секреции медиатора в химических синапсах лежит процесс экзо-эндоцитоза синаптических везикул в активных зонах (АЗ) (Зефилов, Петров, 2010). Экзоцитоз синаптических везикул осуществляется при участии ряда белков, в том числе синтаксинов, которые играют ключевую роль (Sollner et al., 1993). В этом процессе синтаксины взаимодействуют с семейством белков синаптотагминов мембраны синаптических везикул (Sudhof, 2002). Синтаксины и синаптотагмины являются главными Ca²⁺-сенсорами экзо- и эндоцитоза (Sorensen et al., 2003; Yao et al., 2011), пространственно сопряженными с Ca²⁺-каналами (Seagar, Takahashi, 1998; Meir et al., 1999). В свою очередь проводящими путями Ca²⁺-тока в пресинаптической мембране являются Ca²⁺-каналы различных подтипов (Зефилов, Ситдикова, 2010). Белки семейства синтаксинов, синаптотагминов и Ca²⁺-каналов обладают высокой структурной и фармакологической вариабельностью в центральных и периферических синапсах различных типов. От дифференциальной экспрессии набора данных белков и пространственной структуры АЗ нервных окончаний зависят особенности Ca²⁺-чувствительности и синхронности вызванного и спонтанного выбросов медиатора.

Цель настоящей работы заключалась в идентификации ключевых белков везикулярного цикла и определении структурной организации АЗ на примере периферических холинергических синапсов филогенетически первичной соматической мускулатуры дождевого червя. Ранее такая идентификация не проводилась. Однако она принципиально важна для понимания возникновения принципов организации передачи возбуждения в двигательных периферических синапсах в ходе эволюции.

Материал и методика

Эксперименты проводили на соматической мышце внутренней стороны кожно-мышечного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Выделение фрагментов кожно-мышечного мешка длиной 10—15 сегментов производили в модифицированном растворе Древеца—Пакса (Волков и др., 2001) следующего ионного состава (моль/л): 16 Na⁺, 3 K⁺, 6 Ca²⁺, 93 Cl⁻, 43 SO₄²⁻, 2 Трис, рН 7.4 (основной раствор), при комнатной температуре.

Загрузка эндоцитозных маркеров. Использовали флуоресцентные красители FM1-43 и FM4-64 в концентрации 2—3 мкмоль/л (Волков и др., 2012). Указанные красители обратимо связываются с поверхностными мембранами и во время эндоцитоза оказываются внутри вновь образующихся везикул (загрузка) (Betz, Bewick, 1993; Зефилов и др., 2003). Загрузку красителя проводили в течение 3 мин в основном растворе с повышенным содержанием KCl (10 ммоль/л) при эквимолярном снижении NaCl соответственно. В целях уменьшения фонового свечения после загрузки красителя препарат отмывали в течение 10 мин в основном растворе без перфузии.

Иммунocyтoхимия. Выделенный препарат фиксировали в течение 10 мин в 3%-ном растворе параформальдегида в 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с последующей 3-разовой отмывкой в PBS по 10 мин каждая, далее инкубировали в 1%-ном растворе Тритона X-100 в PBS. Далее препарат инкубировали 12 ч с первичными поликлональными антителами к субъединице альфа-1В Ca²⁺-канала N-типа, синтаксину 1 и синаптотагмину 1 (все антитела фирмы Santa Cruz Biotechnolo-

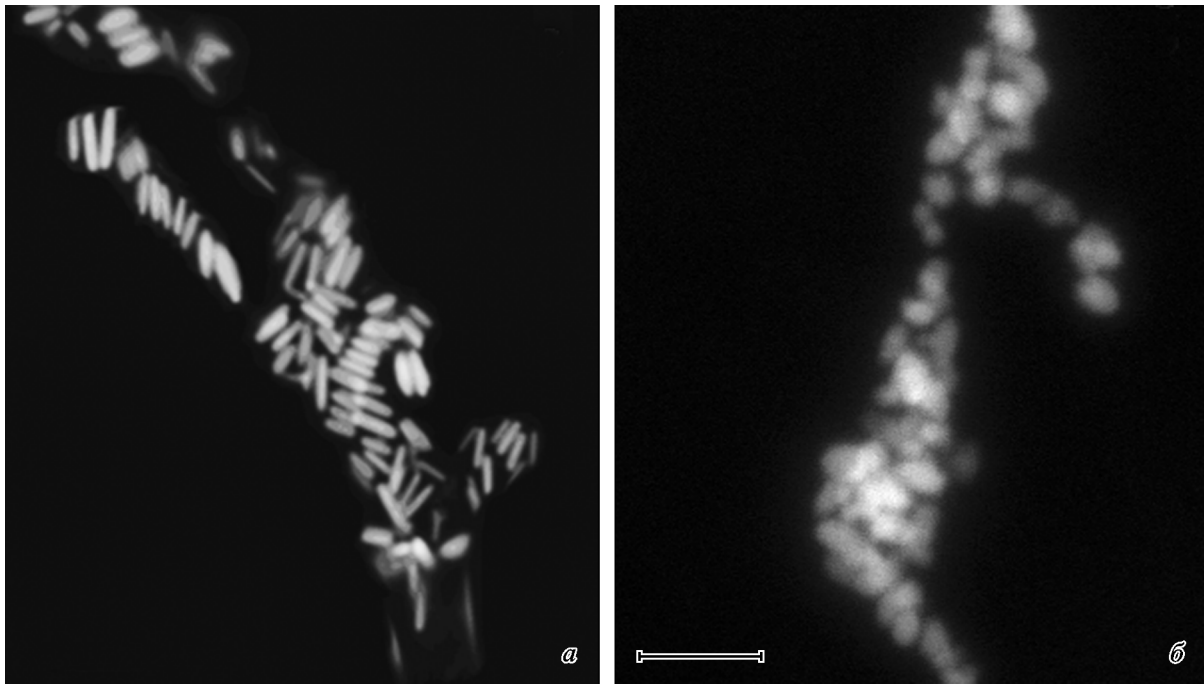


Рис. 1. Флуоресценция маркера FM1-43 (а) и TMR-альфа-бунгаротоксина (б) в мышечном препарате дождевого червя.
Масштабный отрезок — 5 мкм.

gies, США) в разведении 1 : 200 в 1%-ном Тритоне X-100 в PBS при 4 °С с последующей 3-кратной отмывкой в PBS по 10 мин каждая (Nurullin et al., 2011). Инкубацию с вторичными антителами (фирмы Invitrogen, США) производили в темноте в течение 1 ч в разведении 1 : 500 с последующей 3-разовой отмывкой в PBS по 10 мин каждая. Все процедуры проходили при комнатной температуре. Инкубацию препарата с TMR-(tetramethylrhodamin)-альфа-бунгаротоксином в концентрации 20 мкг/мл производили в течение 30 мин в темноте с последующей 3-кратной отмывкой в PBS по 10 мин при комнатной температуре (Краусе, Wernig, 1985; Nurullin et al., 2011).

Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили следующие контрольные эксперименты: препарат выдерживали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами (негативный контроль); препарат инкубировали с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, в ответ на который вырабатывались первичные антитела (позитивный контроль). Проведенные контрольные эксперименты показали специфичность связывания антител с соответствующими пептидами, о чем судили по отсутствию окрашивания препарата.

Готовые препараты помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и заключали в смесь глицерина с PBS в соотношении 1 : 1. Наблюдения проводили на лазерном конфокальном микроскопе LEICA SP5 II TCS MP. Использовали масляный иммерсионный объектив 63× и следующие эндоцитозные маркеры: FM1-43 с длинами волн возбуждения и эмиссии 488 и 577 нм соответственно (аргоновый лазер), FM4-64 с длинами волн возбуждения и эмиссии 514 и 640 нм соответственно (аргоновый лазер). Длины волн возбуждения и регистрации вторичных антител составляли 633 и 647 нм (гелий-неоновый лазер), а TMR-альфа-бунгаротоксина — 552 и 577 нм (аргоновый лазер) соответственно.

Использовали следующие реактивы: параформальдегид; polyoxymethylene, $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, Тритон X-100; 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol *t*-octylphenoxy polyethoxyethanol polyethylene glycol *tert*-octylphenyl ether, $t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$, $x = 9\text{--}10$; 0.1 моль/л PBS (137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na_2SO_4 и 1.4 KH_2PO_4 , pH 7.2); альфа-бунгаротоксин, меченный TMR (tetramethylrhodamine) (все от Sigma, США); антитела первичные кроличьи поликлональные от фирмы Santa Cruz Biotechnologies (США); антитела вторичные ослиные антикроличьи Alexa 647; зонд FM4-64 (*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM(r) 4-64)); зонд FM1-43 (*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide (FM® 1-43)) (Invitrogen, США).

Результаты и обсуждение

Применение флуоресцентного красителя FM1-43 выявляет скопления светящихся пятен в мышечной стенке дождевого червя. Данные скопления напоминают грозди винограда (Волков и др., 2011). При этом отдельная гроздь состоит из нескольких десятков пятен овальной формы диаметром 1—2 мкм (рис. 1, а). Можно думать, что выявляемые нами «грозди винограда» являются кластерами «синаптических бутонов», где отдельное пятно соответствует одному нервному окончанию (Shimizu et al., 1999; Волков и др., 2011). Это согласуется с ультраструктурными исследованиями (Farnesi, Vagnetti, 1975) и данными по оптическому выявлению синаптических структур с применением флуоресцентных эндоцитозных маркеров (Shimizu et al., 1999; Mizutani et al., 2003). Эксперименты с мембранным зондом DiLL, который переносится аксонным транспортом из сомы нейронов в нервные окончания, и эндоцитозным маркером FM4-64 дают основание утверждать, что окрашиваемые флуоресцент-

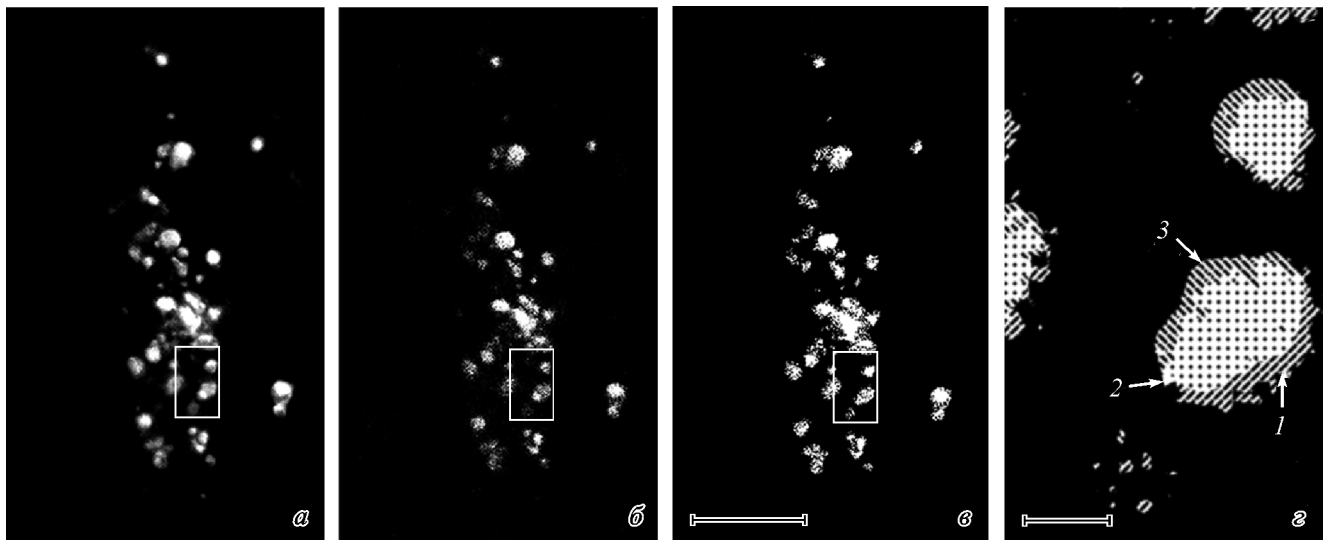


Рис. 2. Флуоресценция маркера FM4-64 (а) и TMR-альфа-бунгаротоксина (б) в мышечном препарате дождевого червя. в — двойное окрашивание FM4-64 и TMR-альфа-бунгаротоксином (колоколизация светящихся пятен); г — увеличенная область, заключенная в рамку на а—в: 1 — TMR-альфа-бунгаротоксин, 2 — колоколизация флуоресценции FM4-64 и TMR-альфа-бунгаротоксина, 3 — FM4-64; здесь и на рис. 3—5 цвета флуоресценции заменены точками и штрихами. Масштабные отрезки — 10 (а—в) и 1 (г) мкм.

ными красителями синаптические бутоны связаны с нервными элементами брюшной нервной цепочки и являются нервно-мышечными синапсами соматической мускулатуры (Волков и др., 2011).

Ранее нами было установлено, что Н-холиномиметики дозависимо деполяризуют мембрану соматических клеток дождевого червя (Волков и др., 2001). Методом оптического определения была установлена концентрация ацетилхолина (АХ) в мышце, которая зависит от уровня деполяризации пресинаптических мембран и концентрации K^+ и Ca^{2+} во внешнем растворе (Волков, 2012). Таким образом, есть основание считать, что в соматической мускулатуре дождевого червя АХ является главным претендентом на роль основного возбуждающего медиатора, с одной стороны, а постсинаптическая мембрана соматических клеток содержит АХ-рецепторы Н-типа — с другой. В этой связи для идентификации постсинаптических АХ-рецепторов нами был выбран общепринятый метод связывания этих рецепторов с альфа-бунгаротоксином (Nurullin et al., 2011).

Проведенные нами эксперименты по оптическому выявлению мест связывания меченого альфа-бунгаротоксина с постсинаптической мембраной соматических клеток показали следующее. Как и в случае применения эндоцитозного маркера FM1-43, в опытах с альфа-бунгаротоксином были выявлены скопления светящихся пятен, также напоминающих собой грозди винограда (рис. 1, б). Это дает нам основание считать, что холинергические нервные терминалы формируют кластеры синаптических бутонов, при этом постсинаптическая мембрана соответствующего синапса имеет протяженность всего несколько микрометров (рис. 1, б). Для подтверждения этого предположения мы провели эксперименты по одновременному выявлению (методом двойного окрашивания) как пресинаптической, так и постсинаптической областей мионевральных синапсов. В качестве маркеров, имеющих разные спектры свечения, выбрали эндоцитозный краситель FM4-64 (рис. 2, а), с одной стороны, и TMR-альфа-бунгаротоксин (метку для АХ-рецептора) — с другой (рис. 2, б). На фотографии (рис. 2, в, г) представлены

светящиеся пятна, образующие единую структуру при колоколизации светящихся пятен. Это является доказательством выявления синаптических бутонов холинергической природы в мышце дождевого червя.

Известно, что кластеры АХ-рецепторов на постсинаптической мембране скелетных мышечных волокон холоднокровных и теплокровных формируются исключительно в месте контакта с нервным окончанием, при этом плотность АХ-рецепторов наибольшая на постсинаптических складках непосредственно напротив АЗ нервных окончаний (Волков, 1989). Денервация мышцы снимает данный запрет (нейротрофический контроль), и АХ-рецепторы распространяются по всей поверхности мышечной мембраны, при этом АХ-рецепторы имеют большее время открытого состояния связанного с ними ионного канала и ряд других фармакологических особенностей (Волков, 1989). Присутствие АХ-рецепторов исключительно на локальном участке мышечной мембраны, находящейся в непосредственном контакте с синаптическими бутонами, дает основание считать, что процесс кластеризации АХ-рецепторов исключительно на постсинаптической мембране, так же как и у позвоночных, находится под нейротрофическим контролем (Волков, 1989).

Ранее нами было установлено, что в зоне одного синаптического контакта локально регистрируются одновременно как минимум 2 популяции миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (МВПСТ), различающихся на порядок временем открытого состояния ионного канала АХ-рецептора — 1—2 и 8—10 мс (Волков, Нуруллин, 2003; Volkov et al., 2007). Амплитудно-временные характеристики МВПСТ не изменяются под действием Н- и М-холиноблокаторов и антихолинэстеразных веществ (Волков, Нуруллин, 2005). При этом Н- или М-холиноблокаторы не препятствуют АХ-индуцированной деполяризации мышечной мембраны (Волков и др., 2001; Volkov et al., 2011). Можно предложить гипотезу, согласно которой наличие разных фармакологических и функциональных особенностей предположительно разных типов канально-рецепторных комплексов АХР вызвано недостаточностью или особенностями нейротрофи-

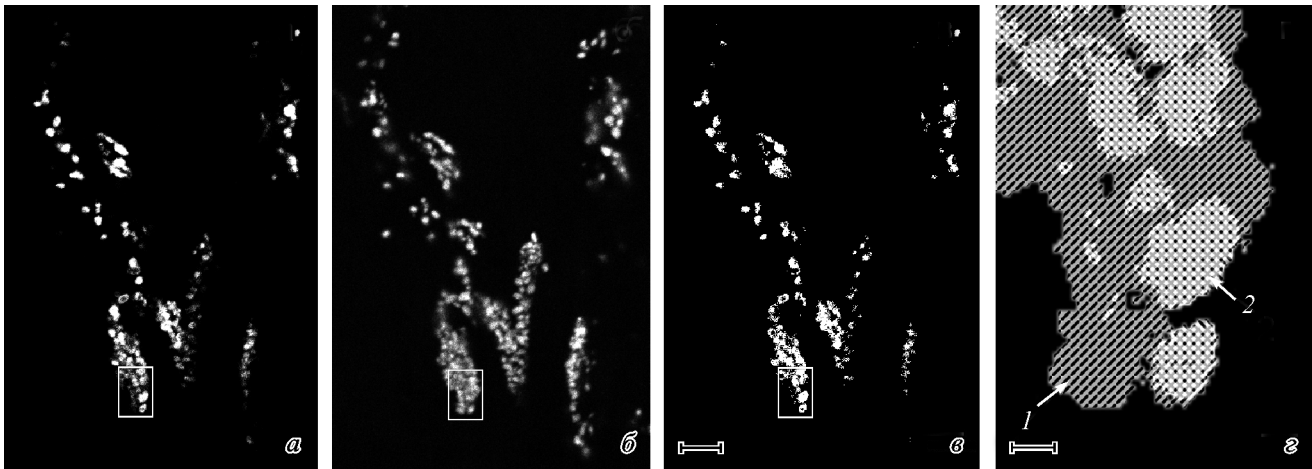


Рис. 3. Флуоресценция маркера синтаксина (а) и TMR-альфа-бунгаротоксина (б) в мышечном препарате дождевого червя. в — двойное свечение синтаксина и TMR-альфа-бунгаротоксина (колоколизация светящихся пятен); г — увеличенная область, заключенная в рамку на а—в: 1 — TMR-альфа-бунгаротоксин, 2 — колоколизация флуоресценции синтаксина 1 и TMR-альфа-бунгаротоксина. Масштабные отрезки — 10 (а—в) и 1 (г) мкм.

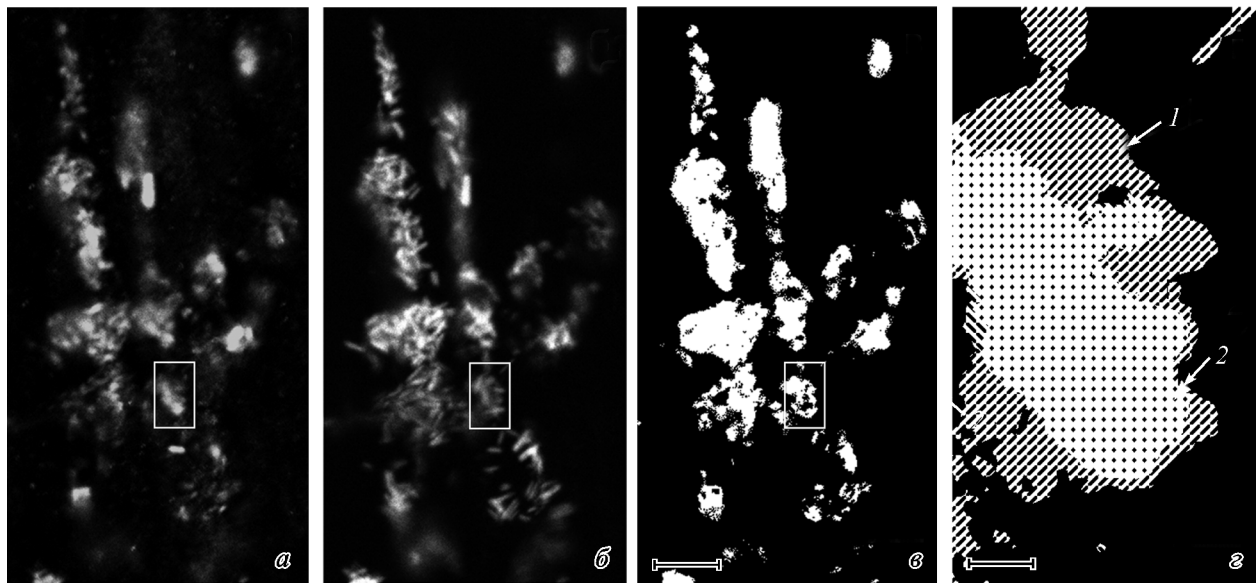


Рис. 4. Флуоресценция синаптоагмина 1 (а) и TMR-альфа-бунгаротоксина (б) в мышечном препарате дождевого червя. в — колоколизация светящихся пятен синаптоагмина 1 и TMR-альфа-бунгаротоксина; г — увеличенная область, заключенная в рамку на а—в: 1 — TMR-альфа-бунгаротоксин, 2 — колоколизация флуоресценции синаптоагмина 1 и TMR-альфа-бунгаротоксина. Масштабные отрезки — 10 (а—в) и 1 (г) мкм.

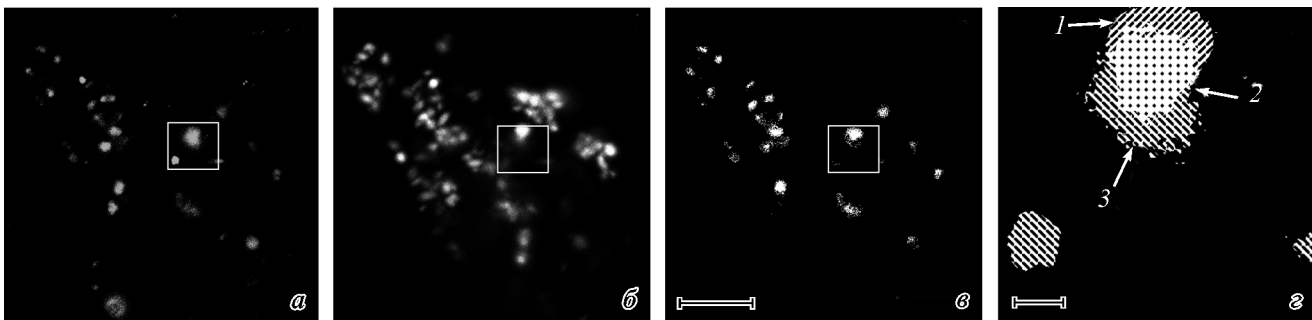


Рис. 5. Флуоресценция субъединицы альфа-1В Ca^{2+} -канала N-типа (а) и TMR-альфа-бунгаротоксина (б) в мышечном препарате дождевого червя. в — колоколизация светящихся пятен субъединицы альфа-1В Ca^{2+} -канала N-типа и TMR-альфа-бунгаротоксина; г — увеличенная область, заключенная в рамку на а—в: 1 — TMR-альфа-бунгаротоксин, 2 — колоколизация флуоресценции субъединицы альфа-1В и TMR-альфа-бунгаротоксина, 3 — субъединица альфа-1В Ca^{2+} -канала N-типа. Масштабные отрезки — 10 (а—в) и 1 (г) мкм.

ческого контроля над экспрессией соответствующего семейства генов субъединиц АХ-рецептора на уровне транскрипции или созревания (альтернативного сплайсинга) мРНК (Волков, 1989). В то же время имеющегося нейротрофического влияния достаточно для удержания АХ-рецептора исключительно в зоне синаптического контакта.

Окрашивание нервных окончаний на наличие синтаксина 1 выявило свечение в виде группы пятен (рис. 3, а). Даная группа светящихся пятен сходна с кластерами синаптических бутонов, выявляемых с помощью эндоцитозного маркера FM1-43 или FM4-64. Для маркировки холинергических синапсов использовали TMR-альфа-бунгаротоксин. Картина окрашивания оказалась сходной (рис. 3, б). Методом двойного окрашивания выявлены биполярные светящиеся пятна (синтаксин 1 и Н-АХ-рецепторы). На фотографиях (рис. 3, в, г) представлены пятна, имеющие только двойное окрашивание. Похожие результаты получены и в экспериментах с выявлением белка синаптоагмина 1. Светящиеся пятна — синаптоагмин 1 (рис. 4, а) и Н-АХ-рецепторы (рис. 4, б). Наконец, метод двойного окрашивания выявил светящиеся пятна с двойным совмещенным окрашиванием (рис. 4, в, г). Проведенные эксперименты позволяют сделать однозначный вывод о наличии в синаптических бутонах важнейших белков, контролирующих эндо-экзоцитозный везикулярный цикл, таких как синтаксин 1 (Acuado et al., 1999) и синаптоагмин 1 (Cooper et al., 1995).

В следующих экспериментах выявляли в нервных окончаниях субъединицу альфа-1В Ca²⁺-канала N-типа (Nurullin et al., 2011). Применение специфических антител привело к появлению светящихся пятен на препарате мышцы дождевого червя. Светящиеся пятна образовывали группу, сходную с той, что мы получили при выявлении белков синтаксина и синаптоагмина нервных окончаний (рис. 5, а). Окраска на наличие Н-АХ-рецептора показана на рис. 5, б. Двойное окрашивание выявило структуры с биполярным свечением (рис. 5, в). На фотографии (рис. 5, г) представлены пятна, имеющие двойное окрашивание. Проведенные эксперименты показывают наличие экспрессии субъединицы альфа-1В Ca²⁺-канала в холинергических синапсах соматической мышцы дождевого червя. Известно, что комплекс белков, обеспечивающих экзо-эндоцитозный цикл при секреции медиатора, включающий в себя синтаксины, синаптоагмины и Ca²⁺-каналы, располагается в областях АЗ.

АЗ нервных окончаний представляют собой специализированные участки, приспособленные для многофакторного регулирования высвобождения медиатора посредством экзоцитоза (Зефилов, Петров, 2010). Так, в нервных окончаниях лягушки территория АЗ имеет 0.1 мкм в ширину и 1—2 мкм в длину (складка АЗ идет поперек нервной веточки), а расстояние между соседними АЗ составляет около 1—2 мкм (Harlow et al., 2001; Зефилов и др., 2003; Evans, Zamponi, 2006). Нервные терминалы мышцы имеют выпячивания (синаптические бутоны) шириной 2—3 мкм и содержат 10—20 АЗ (Slater, 2008; Nagwaney et al., 2009). Свечение белков синтаксина, синаптоагмина и Ca²⁺-каналов занимает примерно такую же площадь, как и синаптические бутоны нервных окончаний, выявляемые с помощью эндоцитозного красителя FM1-43 или FM4-64. Принимая во внимание малые размеры синаптических бутонов, можно предположить, что пресинаптическая мембрана содержит ограниченное число АЗ. Ca²⁺-сенсор в нервно-мышечных синапсах дождевого червя работает по принципу «все или ничего» (Вол-

ков и др., 2011). Данное обстоятельство может указывать на тесную пространственную связь между Ca²⁺-каналами, Ca²⁺-сенсорными белками и сайтами экзоцитоза в АЗ (Meir et al., 1999).

Проведенные эксперименты позволяют прийти к следующему заключению. В мотонейронах, иннервирующих соматические мышечные клетки дождевого червя, экспрессируются белки синтаксин 1, синаптоагмин 1 и субъединица альфа-1В Ca²⁺-канала N-типа. Все они входят в состав АЗ синаптических бутонов. Число АЗ в синаптических бутонах резко ограничено ввиду их малых размеров (1—2 мкм). Постсинаптическая мембрана холинергических синапсов содержит АХ-рецепторы N-типа, которые способны связываться с альфа-бунгаротоксином. Локализация АХ-рецептора строго ограничена зоной синаптического контакта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

Список литературы

- Волков Е. М. 1989. Факторы нейротрофического контроля холинорецепции скелетных мышц. Успехи физиол. наук. 20 (2) : 26—45.
- Волков Е. М., Нуруллин Л. Ф. 2003. Две популяции миниатюрных возбуждающих синаптических ионных токов в соматических мышечных клетках дождевого червя. Бюл. эксперим. биол. мед. 136 (11) : 567—570.
- Волков Е. М., Нуруллин Л. Ф. 2005. Влияние холиномиметиков и холинолитиков на миниатюрные возбуждающие постсинаптические ионные токи соматических мышечных клеток стенки дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Бюл. эксперим. биол. мед. 139 (3) : 392—396.
- Волков Е. М., Нуруллин Л. Ф., Никольский Е. Е. 2001. Влияние натриевого насоса и котранспорта Na⁺, K⁺, Cl⁻ на мембранный потенциал покоя соматических мышечных клеток дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 87 (9) : 1153—1160.
- Волков Е. М., Нуруллин Л. Ф., Фросин В. Н. 2001. Влияние холиномиметиков на мембранный потенциал покоя мышечных клеток кожно-мышечного мешка дождевого червя. Бюл. эксперим. биол. мед. 134 (4) : 469—471.
- Волков М. Е. 2012. Прижизненная окраска нервных образований флуоресцентными красителями и оптическое определение апетилхолина в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Бюл. эксперим. биол. мед. 54 (7) : 112—115.
- Волков М. Е., Петров А. М., Волков Е. М., Зефилов А. Л. 2011. Изучение везикулярного цикла в нервных образованиях соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Цитология. 53 (10) : 37—43.
- Зефилов А. Л., Григорьев П. Н., Петров А. М., Минлебаев М. Г., Ситдикова Г. Ф. 2003. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM1-43. Цитология. 45 (12) : 1163—1167.
- Зефилов А. Л., Петров А. М. 2010. Синаптическая везикула и механизмы освобождения медиатора. Казань: Изд-во Арт-кафе. 324 с.
- Зефилов А. Л., Ситдикова Г. Ф. 2010. Ионные каналы возбуждаемой клетки. Казань: Изд-во Арт-кафе. 270 с.
- Acuado F., Majo G., Ruiz-Montasell D., Orens J. L., Marshall J., Blast J. 1999. Syntaxin I A and I B display distinct distribution patterns in the rat peripheral nervous system. Neuroscience. 88 : 437—445.
- Betz W. J., Bewick G. 1993. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. J. Physiol. (London). 460 : 287—309.

- Cooper R. L., Hampson D. R., Atwood H. L. 1995. Synaptotagmin-like expression in the motor nerve terminals of crayfish. *Brain Res.* 703 : 214—216.
- Evans R. M., Zamponi G. W. 2006. Presynaptic Ca-channels — integration centers for neuronal signaling pathway. *Trends Neurosci.* 29 : 617—624.
- Farnesi R. M., Vagnetti D. 1975. The fine structure of the myoneural junctions in the body wall muscles in *Branchiobdeella pentodonta* Whit. (Annelida Oligocheeta). *Anat. Res.* 182 : 91—101.
- Harlow L. H., Ress D., Stoschek A. 2001. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature.* 409 : 479—484.
- Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. *J. Neurocytol.* 14 : 765—780.
- Meir A., Ginsburg S., Butkevich A., Kachalsky S. G., Kaiserman I., Ahdut A., Demigoren S., Rahamimoff R. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79 : 1019—1088.
- Mizutani K., Shimoi T., Kitamura Y., Ogawa H., Oka K. 2003. Identification of two types of synaptic activity in the earthworm nervous system during locomotion. *Neuroscience.* 121 : 473—478.
- Nagwaney S., Harlow M. L., Jung J. M., Szule J. A., Ress D., Xui J., Marshall R. M., McMahan U. J. 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.
- Nurullin L. F., Mukhitov A. R., Tsentsevitsky A. N., Petrova N. V., Samigullin D. G., Malomouzh A. L., Bukharaeva E. A., Vyskocil F., Nikolsky E. E. 2011. Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog neuromuscular junction. *Physiol. Res.* 60 : 815—823.
- Seagar M., Takahashi M. 1998. Interaction between presynaptic calcium channels and proteins implicated in synaptic trafficking and exocytosis. *J. Bioen. Biomem.* 30 : 347—356.
- Shimizu R., Oka K., Ogawa H., Suzuki K., Mizutani K., Tani-shita K. 1999. Optical monitoring of the neuronal activity evoked by mechanical stimulation in the earthworm nervous system with fluorescent dye, FM1-43. *Neurosci. Lett.* 268 : 159—162.
- Slater C. R. 2008. Structural factors influencing the efficacy of neuromuscular transmission. *Ann. New York. Acad. Sci.* 1132 : 1—12.
- Sollner T. A., Bennet M. K., Whiterheart S. W. 1993. Protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 75 : 409—418.
- Sorensen J. B., Chacon F. R., Sudhof T. C., Neher E. 2003. Examining Synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.* 122 : 165—276.
- Sudhof T. C. 2002. Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277 : 7629.
- Volkov E. M., Nurullin L. F., Nikolsky E. E., Vyskocil F. 2007. Miniature excitatory synaptic currents in the earthworm *Lumbricus terrestris* body wall muscles. *Physiol. Res.* 56 : 655—658.
- Volkov E. M., Nurullin L. F., Volkov M. E., Nikolsky E. E., Vyskocil F. 2011. Mechanism of carbacholine and GABA action on resting membrane potential and Na/K-ATPase of *Lumbricus terrestris* body wall muscle. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 158 : 520—524.
- Yao J., Kwon S. E., Gaffaney J. D., Dunning F. M., Chapman E. 2011. Uncoupling the roles of synaptotagmin 1 during endo-exocytosis of synaptic vesicles. *Nature Neurosci.* 15 : 243—249.

Поступила 16 IV 2012

IMMUNOCYTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF SYNAPTOTAGMIN 1, SYNTAXIN 1,
N-TYPE Ca²⁺-CHANNEL AND NICOTINIC CHOLINORECEPTOR IN MOTOR NEUROMUSCULAR
JUNCTIONS OF EARTHWORM SOMATIC MUSCLE *LUMBRICUS TERRESTRIS*

M. E. Volkov,¹ E. M. Volkov,^{1,*} L. F. Nurullin²

¹ Kazan Medical State University
and ² Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Center of RAS;
* e-mail: euroworm@mail.ru

The somatic muscle of earthworm contains myoneural synapses forming clusters of «synaptic buttons». In these «buttons», the proteins syntaxin 1, synaptotagmin 1 and alpha 1B subunit of the Ca²⁺-channel of N-type were identified. We suppose that «synaptic buttons» contain a limited number of active zones due to their small size (1—2 μm) and the pattern of distribution of proteins of exo-endocytotic cycle. The postsynaptic membrane of cholinergic synapses contains nicotinic acetylcholine receptors capable to bind alpha-bungarotoxin. The area of location of receptors on postsynaptic membrane is strictly limited to the region of synaptic contact.

Key words: myoneural synapses, syntaxin, synaptotagmin, Ca²⁺-channel, receptor to acetylcholine, earthworm.