

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

## НАЛИЧИЕ БЕЛКОВ СЕПТИНОВ В ЗОНЕ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСОВ СОМАТИЧЕСКОЙ МЫШЦЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2024 г. Л.Ф. Нуруллин\*, \*\*, #, Е.М. Волков\*\*, ##

\*Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФИЦ  
«Казанский научный центр РАН», ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111, Россия

#E-mail: leniz2001@mail.ru

\*\*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

##E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Методами флуоресцентной конфокальной микроскопии показано присутствие в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris* семейства белков септинов типов 2, 3, 5, 7 и 9. У септинов типов 2 и 9 отсутствует их специфическая концентрация в зоне холинергического синапса, тогда как септины типов 3 и 5 и особенно типа 7 имеют количественно выраженную привязку по своей локализации к зоне двигательной концевой пластинки. Предполагается, что септины типов 3 и 5 и, прежде всего, типа 7 могут быть участниками в механизмах модуляции квантовой секреции медиатора.

**Ключевые слова:** нервно-мышечный синапс, соматическая мышца, кольчатые черви, септины.

**DOI:** 10.31857/S0006302924050088, **EDN:** MKFQWM

Высококонсервативные ГТФ-связывающие белки семейства септинов широко представлены в клеточных структурах, начиная с простейших одноклеточных организмов и заканчивая высшими позвоночными животными [1]. Являясь обязательными компонентами микротрубочкового цитоскелета, они участвуют в поддержании формы клеток, ее полярности, цитокинезе, внутриклеточных транспортных процессах [2]. Следует особо подчеркнуть участие белков данного семейства в синаптическом везикулярном транспорте [3]. Необходимо также отметить, что септины играют важную роль в регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза [4]. Последние оказывают модулирующее влияние на входящий кальциевый ток через депо-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, известные как  $\text{Orai}$ -каналы плазматической мембраны [5, 6]. Таким образом, показана роль септинов в механизмах везикулярного цикла квантовой секреции медиатора как в межнейрональных, так и периферических нервно-мышеч-

ных синапсах [7, 8]. Соматическая мышца дождевого червя содержит возбуждающие холинергические синапсы [9]. Квантовая секреция ацетилхолина осуществляется  $\text{Ca}^{2+}$ -управляемым механизмом синаптического везикулярного цикла [10]. В настоящее время отсутствуют данные о присутствии белков семейства септинов в нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя и, следовательно, неизвестна их возможная роль в процессах квантовой секреции медиатора. Важно подчеркнуть, что тип *Annelida*, к которому относится дождевой червь, является филогенетически древней группой животных [11]. У представителей этого типа впервые эволюционно возникали способности активного управления движением соматической мускулатуры при участии ГАМК- и холинергической иннервации [9, 12, 13]. Таким образом, целью настоящей работы стало определение методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии белков семейства септинов в зоне нервно-мышечных холинергических синапсов соматической мышцы дождевого червя.

**Сокращения:** АХР — ацетилхолиновые рецепторы, ТМР- $\alpha$ -Б — тетраметилродамин- $\alpha$ -бунгаротоксин.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления препарата дождевого червя *Lumbricus terrestris* разрезали сбоку по всей длине, отрезали головной и хвостовой концы, раскрывали, удаляли внутренние органы и перегородки между сегментами [14]. Далее фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иглол на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы–Пакса (состав в мМ: NaCl – 77, KCl – 4, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 43, CaCl<sub>2</sub> – 6, Трис – 2, сахароза – 167, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1°C). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-м растворе *p*-формальдегида и отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буфере. Препарат последовательно инкубировали в 0.5%-м 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.

Далее препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с поликлональными антителами к септинам 2, 3, 5, 7, 9 и синаптофизину (все в разведении 1 : 100). Антитела к септинам 2, 3, 5, 7, 9 и синаптофизину были выработаны в кролике и козе, что позволяло проводить двойное иммуномечение исследуемых белков. 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 : 200) в растворе А. Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля проводили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами. Мечение постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (АХР) проводили с помощью тетраметилпродамин- $\alpha$ -бунгаротоксина (ТМР- $\alpha$ -Б, 20 мкг/мл) в течение 50 мин.

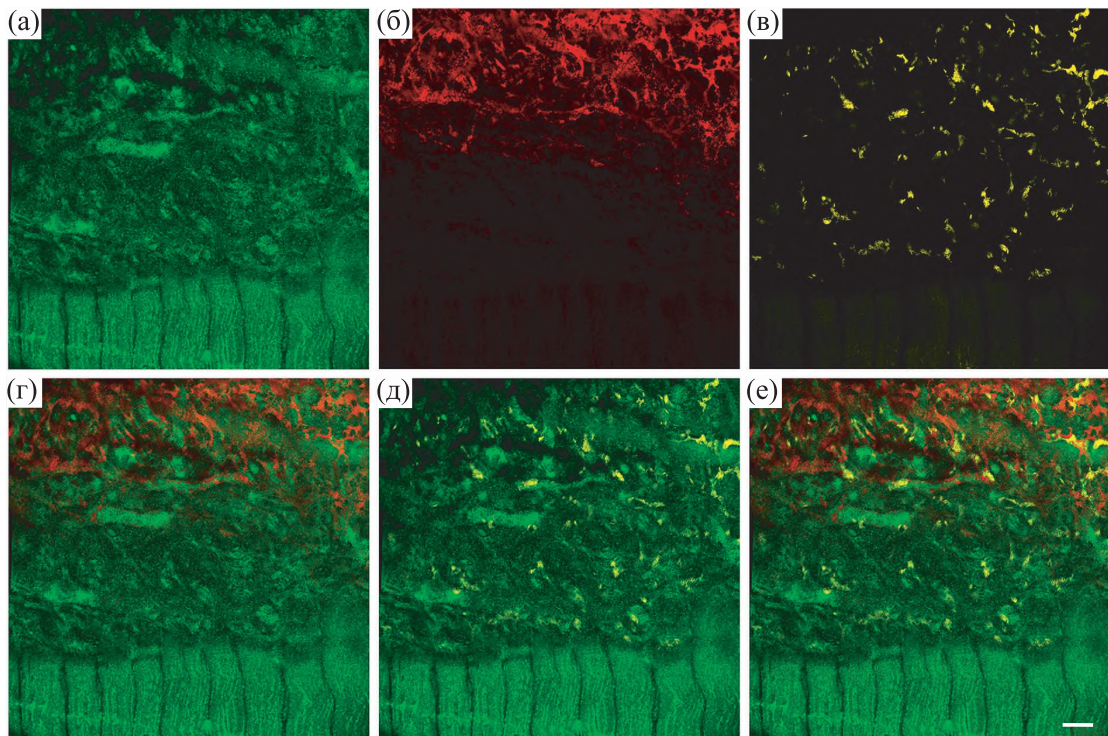
После отмывки в фосфатном буфере препараты помещали в раствор фосфатного буфера с гли-

церинном (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с применением масляно-иммерсионного объектива 63 $\times$ /1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся Ar- и He–Ne-лазеры. Длины волн возбуждения: для флуорофоров Alexa 488 – 488 нм, ТМР – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

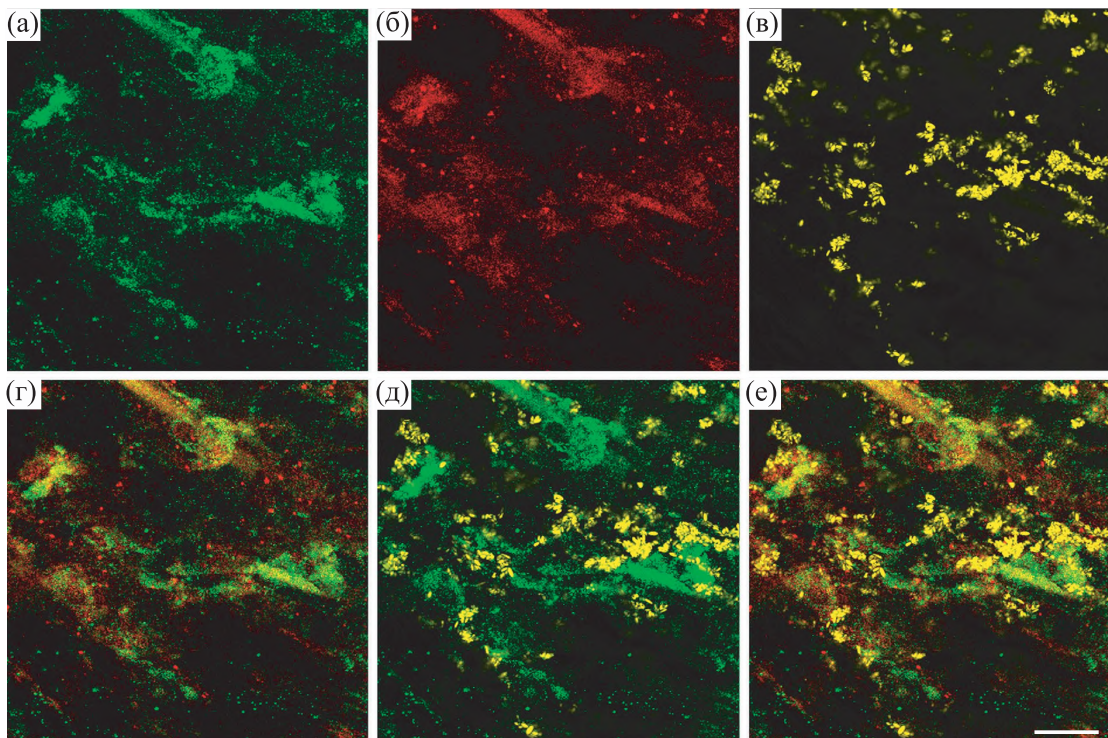
Использовали следующие реактивы: *p*-формальдегид, Трис, фосфатный буфер (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 4.3 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, бычий сывороточный альбумин, ТМР- $\alpha$ -Б, глицерин (Sigma-Aldrich, США); первичные кроличьи поликлональные антитела к септинам 2, 3, 5, 7, 9 (Cohesion Biosciences, Великобритания); первичные кроличьи поликлональные антитела к синаптофизину (Abcam, Великобритания); иммуногенные пептиды, соответствующие поликлональным антителам; антитела вторичные конъюгированные с Alexa 488 или Alexa 647 (Invitrogen, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мечение мышечного препарата иммуофлуоресцентными антителами против септина 2 типа показало диффузное присутствие данного белка как в синаптической, так и во внесинаптической зонах (рис. 1). Эти данные говорят об отсутствии значимой специфической концентрации септина 2 типа в зоне холинергического нервно-мышечного контакта. Выявление септина 3 типа показало иную картину. Так, мечение антителами препарата на данный вариант белка септина значительно перекрывалось с окрашиванием на нейрональный белок синаптофизин и АХР постсинаптической мембраны, хотя в последнем случае несколько в меньшей степени (рис. 2). Следовательно, септин 3 типа демонстрирует четко выраженную связь по своей локализации с зоной холинергического синапса, что может указывать на его возможную функциональную роль в механизмах нервно-мышечной передачи возбуждения. Эксперименты с антителами к белку септину 5 типа показали следующую картину. Как и в случае с септином 3 типа, окрашивание на септин 5 типа перекрывалось с окрашиванием на синаптофизин и АХР (рис. 3). Однако такое окрашивание было менее насыщенным. Более того, в некоторых участках оно не сопрягалось с метками,

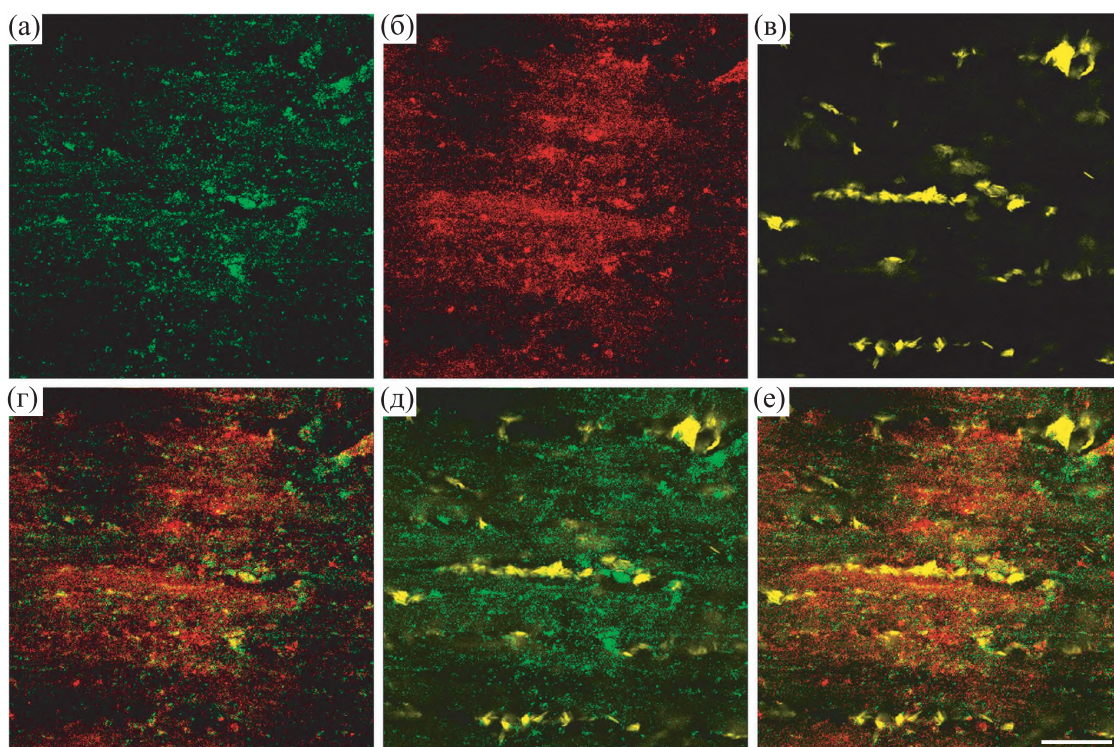


**Рис. 1.** Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris*. (а) — Окрашивание антителами септина 2 (зеленый цвет); (б) — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) — окрашивание ТМР- $\alpha$ -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) — наложение изображений (а) и (б); (д) — наложение изображений (а) и (в); (е) — наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

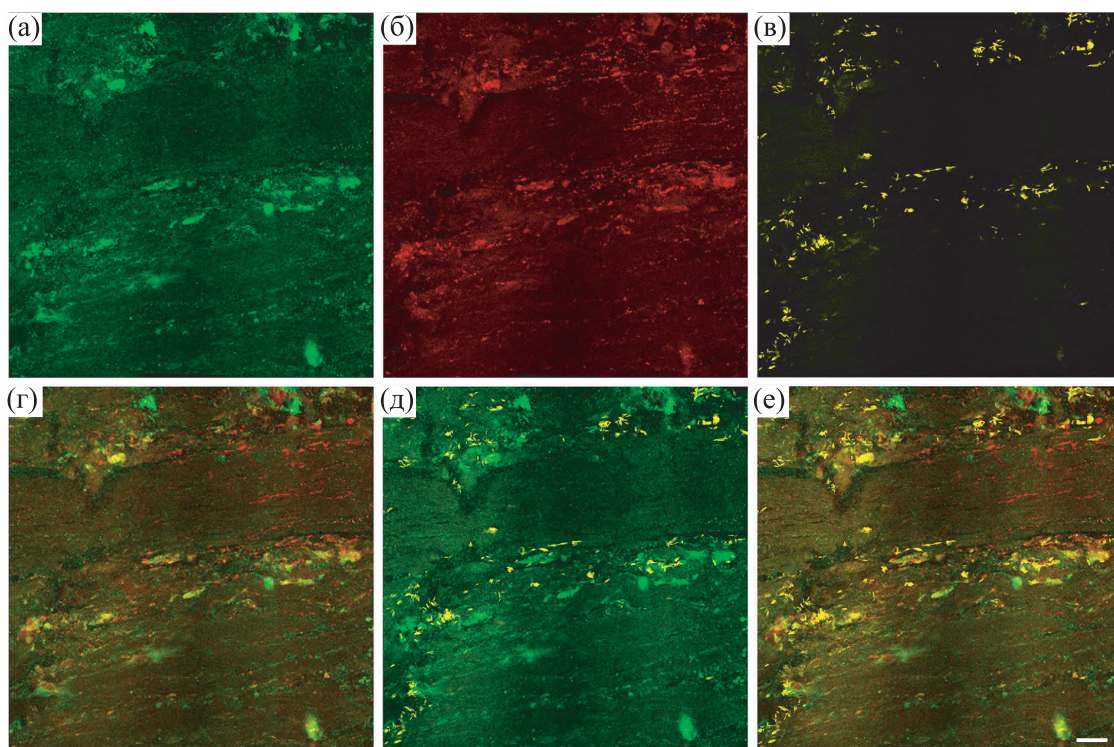


**Рис. 2.** Выявление септина 3 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) — Окрашивание антителами септина 3 (зеленый цвет); (б) — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) — окрашивание постсинаптических никотиновых АХР при помощи ТМР- $\alpha$ -Б (желтый цвет); (г) — наложение изображений (а) и (б); (д) — наложение изображений (а) и (в); (е) — наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.



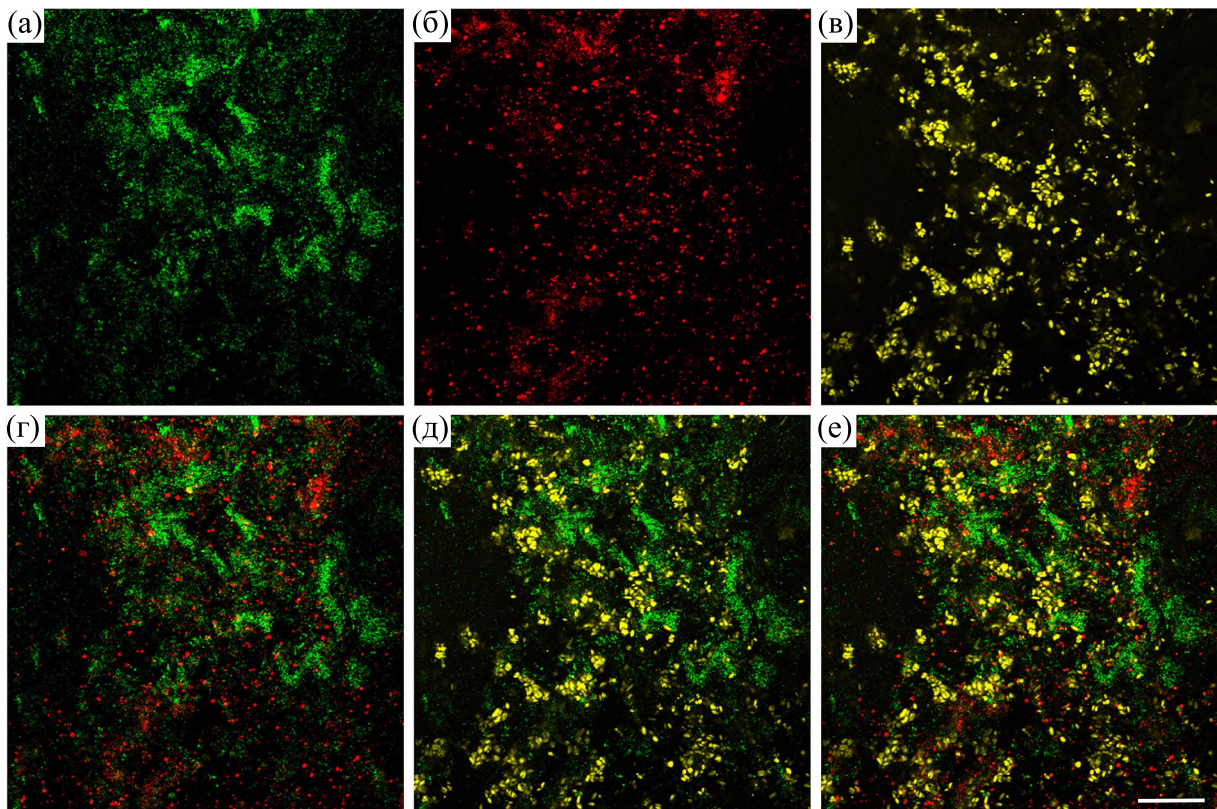


**Рис. 3.** Наличие септина 5 при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) — Окрашивание антителами септина 5 (зеленый цвет); (б) — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) — окрашивание TMR- $\alpha$ -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) — наложение изображений (а) и (б); (д) — наложение изображений (а) и (в); (е) — наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.



**Рис. 4.** Обнаружение септина 7 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) — Окрашивание антителами септина 7 (зеленый цвет); (б) — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) — окрашивание TMR- $\alpha$ -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) — наложение изображений (а) и (б); (д) — наложение изображений (а) и (в); (е) — наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.





**Рис. 5.** Выявление септина 9 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) — Окрашивание антителами септина 9 (зеленый цвет); (б) — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) — окрашивание ТМР- $\alpha$ -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) — наложение изображений (а) и (б); (д) — наложение изображений (а) и (в); (е) — наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

привязанными к зоне нервно-мышечного контакта. Таким образом, картина локализации белка септина 5 типа не столь однозначна, как в случае с септином 3 типа. Наибольшую связь по своей локализации с зоной холинергического синапса показало мечение антителами на белок септин 7 типа, поскольку оно полностью повторяло окрашивание на синаптофизин и АХР мышечной мембраны (рис. 4). Выявление белка септина 9 типа показало прямо противоположную картину в сравнении с септином 7 типа. Свечение на септин 9 типа не перекрывалось с мечением на синаптофизин и АХР концевой пластинки (рис. 5).

Проведенные эксперименты позволяют утверждать следующее. В мышечном препарате соматической мышцы дождевого червя методами конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии выявляются белки семейства септинов 2, 3, 5, 7 и 9 типов. Окрашивание септинов 2 и 9 типов не выявило их специфического присутствия в зоне холинергического синапса. Таким образом, нельзя говорить об их возможной существенной роли

в процессах передачи возбуждающего сигнала на двигательную мышцу дождевого червя. С другой стороны, септины 3, 5 и 7 типов имеют количественно выраженную привязку по своей локализации к зоне концевой пластинки холинергического синапса. Наиболее выраженную такую связь имеет септин 7 типа, наименьшую — септин 5 типа. Можно выдвинуть гипотезу, что септины 3 и 5 типов и особенно 7 типа могут участвовать в модуляции входящих  $\text{Ca}^{2+}$  токов [4–6], а также иных процессах везикулярного цикла в двигательных синапсах аннелид, как это показано для животных других видов [8, 15–18]. Полученные данные существенно дополняют картину структурно-функциональной организации холинергического нервно-мышечного синапса соматической мышцы кольчатых червей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования «Коллективного спектро-аналитического центра физико-химических исследований

строения, свойств и состава веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН».

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00239, <https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, выполнены с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и были одобрены комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол №23/5 от 12.05.2023 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grupp B. and Gronemeyer T. A biochemical view on the septins, a less known component of the cytoskeleton. *Biol. Chem.*, **404** (1), 1–13 (2022). DOI: 10.1515/hsz-2022-0263
- Cavini I. A., Leonardo D. A., Rosa H. V. D., Castro D. K. S. V., D'Muniz Pereira H., Valadares N. F., Araujo A. P. U., and Garratt R. C. The structural biology of septins and their filaments: an update. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 765085 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2021.765085
- Kartmann B. and Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J. Cell. Sci.*, **114** (Pt 5), 839–844 (2001). DOI: 10.1242/jcs.114.5.839
- Deb B. K. and Hasan G. Regulation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry by septins. *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 142 (2016). DOI: 10.3389/fcell.2016.00142
- Deb B. K. and Hasan G. SEPT7-mediated regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through Orai channels requires other septin subunits. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **76** (1), 104–114 (2019). DOI: 10.1002/cm.21476
- Deb B. K., Chakraborty P., Gopurappilly R., and Hasan G. SEPT7 regulates  $\text{Ca}^{2+}$  entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons. *Cell Calcium*, **90**, 102252 (2020). DOI: 10.1016/j.ceca.2020.102252
- Werner B. and Yadav S. Phosphoregulation of the septin cytoskeleton in neuronal development and disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **80** (7–8), 275–289 (2023). DOI: 10.1002/cm.21728
- Nurullin L. F., Khuzakhmetova V. F., Khaziev E. F., Samigullin D. V., Tsentsevitsky A. N., Skorinkin A. I., Bukharaeva E. A., and Vagin O. Reorganization of septins modulates synaptic transmission at neuromuscular junctions. *Neuroscience*, **404**, 91–101 (2019). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.060
- Volkov E. M. and Nurullin L. F. Effects of cholinergic receptor agonists and antagonists on miniature stimulatory postsynaptic ionic currents in somatic muscle cells of *lumbricus terrestris*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **139** (3), 360–362 (2005). DOI: 10.1007/s10517-005-0294-2
- Bennett M. R., Farnell L., and Gibson W. G. The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone. *Biophys. J.*, **78** (5), 2201–2221 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76769-5
- Parry L., Tanner A., and Vinther J. The origin of annelids. *Front. Palaeontol.*, **57** (6), 1091–1103 (2014). DOI: 10.1111/pala.12129
- Purschke G. and Müller M. C. Evolution of body wall musculature. *Integr. Comp. Biol.*, **46** (4), 497–507 (2006). DOI: 10.1093/icb/ici053
- Nurullin L. F., Almazov N. D., and Volkov E. M. Immunofluorescent identification of GABAergic structures in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A Membr. Cell. Biol.*, **17** (3), 208–213 (2023). DOI: 10.1134/S1990747823040074, EDN: GMIYPL
- Volkov E. M., Nurullin L. F., Svandová I., and Vyskocil F. Participation of electrogenic  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol. Res.*, **49** (4), 481–484 (2000). EDN: LGGZWJ
- Grigoryev P. N., Khisamieva G. A., and Zefirov A. L. Septin polymerization slows synaptic vesicle recycling in motor nerve endings. *Acta Naturae.*, **11** (2), 54–62 (2019). DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-54-62, EDN: UWFOQK
- Beites C. L., Campbell K. A., and Trimble W. S. The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem. J.*, **385** (Pt 2), 347–353 (2005). DOI: 10.1042/BJ20041090
- Ito H., Atsuzawa K., Morishita R., Usuda N., Sudo K., Iwamoto I., Mizutani K., Katoh-Semba R., Nozawa Y., Asano T., and Nagata K. Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J. Neurochem.*, **108** (4), 867–880 (2009). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05849.x
- Maimaitiyiming M., Kobayashi Y., Kumanogoh H., Nakamura S., Morita M., and Maekawa S. Identification of dynamin as a septin-binding protein. *Neurosci. Lett.*, **534**, 322–326 (2013). DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.002

## The Presence of Septin Proteins in the Neuromuscular Junction of Somatic Muscle in the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L.F. Nurullin\*, \*\* and E.M. Volkov\*\*

\*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

\*\*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

Using fluorescent confocal microscopy it has been shown that proteins belonging to the septin family such as Septin 2, 3, 5, 7, and 9 are present in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Septins 2 and 9 are associated with the lack of their specific concentrations in a cholinergic synapse, while septins 3, 5, and especially 7 levels correlate with quantitatively expressed binding in their localization to the motor end plate. It is assumed that Septins 3, 5 and, mostly, 7 can be involved in the mechanisms of modulation of quantal release of neurotransmitters.

*Keywords: neuromuscular junction, somatic muscle, annelids, septins*