

## ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ -СЕНСОРНЫХ БЕЛКОВ В ДВИГАТЕЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин<sup>1, 2, \*</sup>, Н. Д. Алмазов<sup>2</sup>, Е. М. Волков<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

\* e-mail: lenizn@yandex.ru

\*\* e-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 01.06.2024 г.

Методом иммунофлуоресцентного мечения препаратов соматической мышцы дождевого червя показано присутствие в последних кальмодулина,  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 и типа 2, синаптотагмина типа 2 и типа 7 и кальциневрина А. Данные белки определяются как в синаптических, так и во внесинаптических регионах двигательной мышцы. Однако для синаптотагмина типа 2 и типа 7, кальциневрина А установлена их преимущественная локализация в зоне нервно-мышечных синапсов. При этом синаптическая локализация для синаптотагмина типа 7 и кальциневрина А выражена наиболее отчетливо.

**Ключевые слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорные белки, нервно-мышечный синапс, соматические мышечные клетки, дождевой червь

**DOI:** 10.31857/S0044452924040053, **EDN:** YQDYUI

### ВВЕДЕНИЕ

$\text{Ca}^{2+}$ -акцепторные белки участвуют в модуляции различных форм секреции медиатора и нейрональной пластичности как в центральных, так и периферических синапсах [1–7]. Фермент  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимая протеинкиназа типа 2 широко представлен в зоне нервно-мышечных синапсов мышцы, прежде всего в месте расположения никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) постсинаптической мембраны [8–10]. Установлено, что данный фермент имеет самое непосредственное отношение к процессу рециклизации и инкорпорированию нАХР в мышечную мембрану [8, 11]. Также установлено, что различные изоформы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ участвуют в нейрональной активности и синаптогенезе в NMDA-нейронах гиппокампа крысы [12], стимулируют рост нервных окончаний и новых нейрональных бутонов в нервно-мышечных синапсах мухи *Drosophila* [13]. Синаптотагмин типа 2 широко представлен в нервных терминалях ГАМКергических нейронов коры головного мозга мыши [14]. По-

следний является триггерным механизмом запуска быстрой секреции медиатора, в ответ на возбуждение [15]. Синаптотагмин типа 7 модулирует спонтанную активность в синапсах и вызывает депрессию постсинаптических токов в клетках Пуркинье мыши [16]. Известно, что фермент  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимая протеинфосфатаза 3 состоит из двух субъединиц, каталитической — кальциневрин А и регуляторной — кальциневрин В [17, 18]. Кальциневрин А обладает широким спектром действия, включая: активацию секреции медиатора, стимуляцию нейрональной пластичности, регуляцию генетической экспрессии на уровне транскрипции [18]. В соматической мышце дождевого червя присутствуют два типа синапсов: холинергические [19] и ГАМКергические [20]. Иммунофлуоресцентная идентификация  $\text{Ca}^{2+}$ -акцепторных белков в двигательной нервно-мышечной системе аннелид ранее не проводилась. Таким образом, остается неясной и их роль в модуляции экзо-эндовезикулярного цикла секреции медиатора, а также предположительное участие в нейрональной пластичности периферической нервно-мышечной иннервации. Необходимо подчеркнуть, что представители типа

**Сокращения:** НМ — нАХР — никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; ТМР- $\alpha$ -Б — тетраметилродамин- $\alpha$ -бунгаротоксин.

*Annelida* являются первыми животными в длинном филогенетическом ряду, у которых эволюционно сформировалась сложная система управления двигательной активностью соматической мускулатуры [21–24], что делает изучение подобных структур особенно актуальным. Таким образом, целью настоящего исследования стало иммунофлуоресцентное выявление и определение локализации ряда ключевых  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорных белков в двигательной мускулатуре аннелид на примере дождевого червя.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект и приготовление препаратов.** Для приготовления препарата, дождевой червь *Lumbricus terrestris* разрезался сбоку по всей длине, отрезались головной и хвостовой концы, раскрывался, удалялись внутренние органы и перегородки между сегментами [25]. Далее фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы-Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 6  $\text{CaCl}_2$ , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2% растворе *p*-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (состав в мМ: 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5% растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Triton X-100; 15 мин в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе фосфатно-солевого буфера.

**Иммуномечение препаратов.** Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$  в растворе А с моно- и поликлональными антителами. Использовали антитела к кальмодулину; ферментам  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы 1 и 2 типов; синаптотагмину 2 и 7; кальциневрину А; синаптофизину (все в разведении 1 : 100). Антитела к  $\text{Ca}^{2+}$ -акцепторным белкам и синаптофизину были выработаны в разных хозяевах (мышь, кролик, коза), 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 (ослиные против мыши, кролика или козы), конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1 : 200) в растворе А. Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контроль-

ные эксперименты. Для негативного 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 мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами. Мечение постсинаптических nAHP проводили с помощью тетраметилпродамин- $\alpha$ -бунгаротоксина (TMP- $\alpha$ -Б, 20 мкг/мл) в течение 50 мин. Всего в экспериментах по мечению антителами препаратов было использовано 48 образцов.

**Микроскопия.** После отмывки в фосфатно-солевом буфере, препараты помещали в раствор фосфатно-солевого буфера с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с использованием масляно-иммерсионного объектива  $63\times/1.4$ . Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся Ar и He-Ne лазеры. Применяли следующие длины волн лазеров: для антител, меченных флуорофорами Alexa 488 — 488 нм, Alexa 647 — 633 нм; для меченного полипептида TMP- $\alpha$ -Б — 543 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США; веб-сайт программы <https://imagej.net/ij/>).

**Реактивы.** Использовали следующие реактивы: формалин (#HT5011, Sigma-Aldrich, США); Tris (#9210-OP, Sigma-Aldrich); фосфатно-солевой буфер (#P4417, Sigma-Aldrich); Triton X-100 (#T8787, Sigma-Aldrich); нормальная ослиная сыворотка (#D9663, Sigma-Aldrich); бычий сывороточный альбумин (#BSAV-RO, Sigma-Aldrich); TMP- $\alpha$ -Б (#T0195, Sigma-Aldrich); глицерин (#G5516, Sigma-Aldrich); моноклональные мышинные антитела к кальмодулину (#ab2860, RRID:AB\_303362, Abcam, Великобритания); поликлональные кроличьи антитела к  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназе 1 (#LS-C354567, LSBio, США); поликлональные кроличьи антитела к  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназе 2 (#MBS541139, MyBioSource, США); поликлональные козы к синаптотагмину 2 (#LS-C139718, RRID:AB\_10943434, LSBio); поликлональные кроличьи к синаптотагмину 7 (#ab106618, Abcam); поликлональные кроличьи антитела к кальциневрину А (#ab137335, Abcam); антитела к синаптофизину поликлональные кроличьи (#ANR-013, RRID:AB\_2341004, Alomone Labs, Израиль) и поликлональные козы (#sc-7569, RRID:AB\_2199010, Santa Cruz Biotechnology,

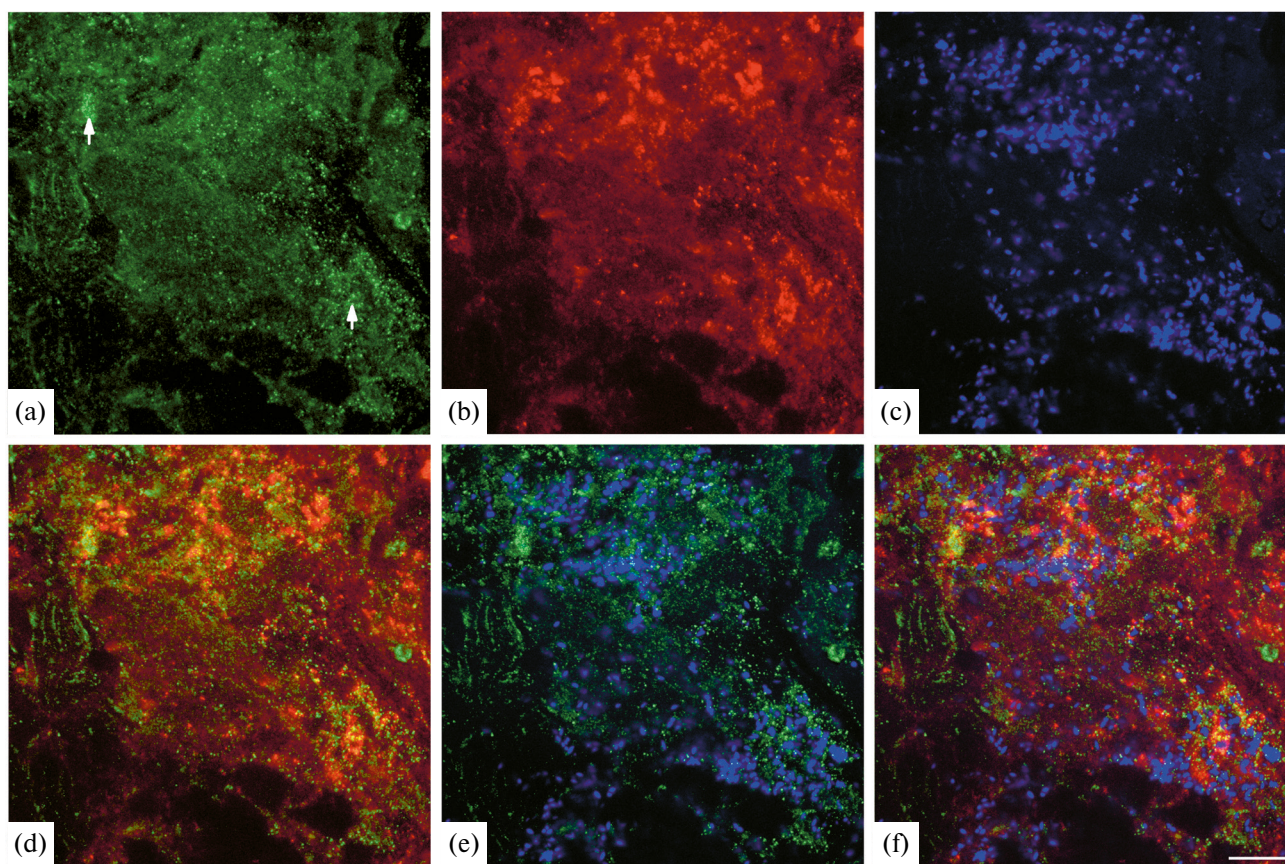
США); иммуногенные пептиды, соответствующие моно- и поликлональным антителам; вторичные антитела ослиные против кролика конъюгированные с Alexa 488 (#A-21206, RRID:AB\_2535792, Thermo Fisher Scientific, США); вторичные антитела ослиные против козы конъюгированные с Alexa 647 (#A-21447, RRID:AB\_2535864, Thermo Fisher Scientific); вторичные антитела ослиные против мыши конъюгированные с Alexa 488 (#A-21202, RRID:AB\_141607, Thermo Fisher Scientific).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Двигательные нервные окончания выявляли мечением антителами на синаптофизин — интегральный мембранный гликопротеин синаптических везикул [26, 27]. Маркирование нАХР постсинаптической мембраны проводилось окрашиванием TMP- $\alpha$ -Б [28].

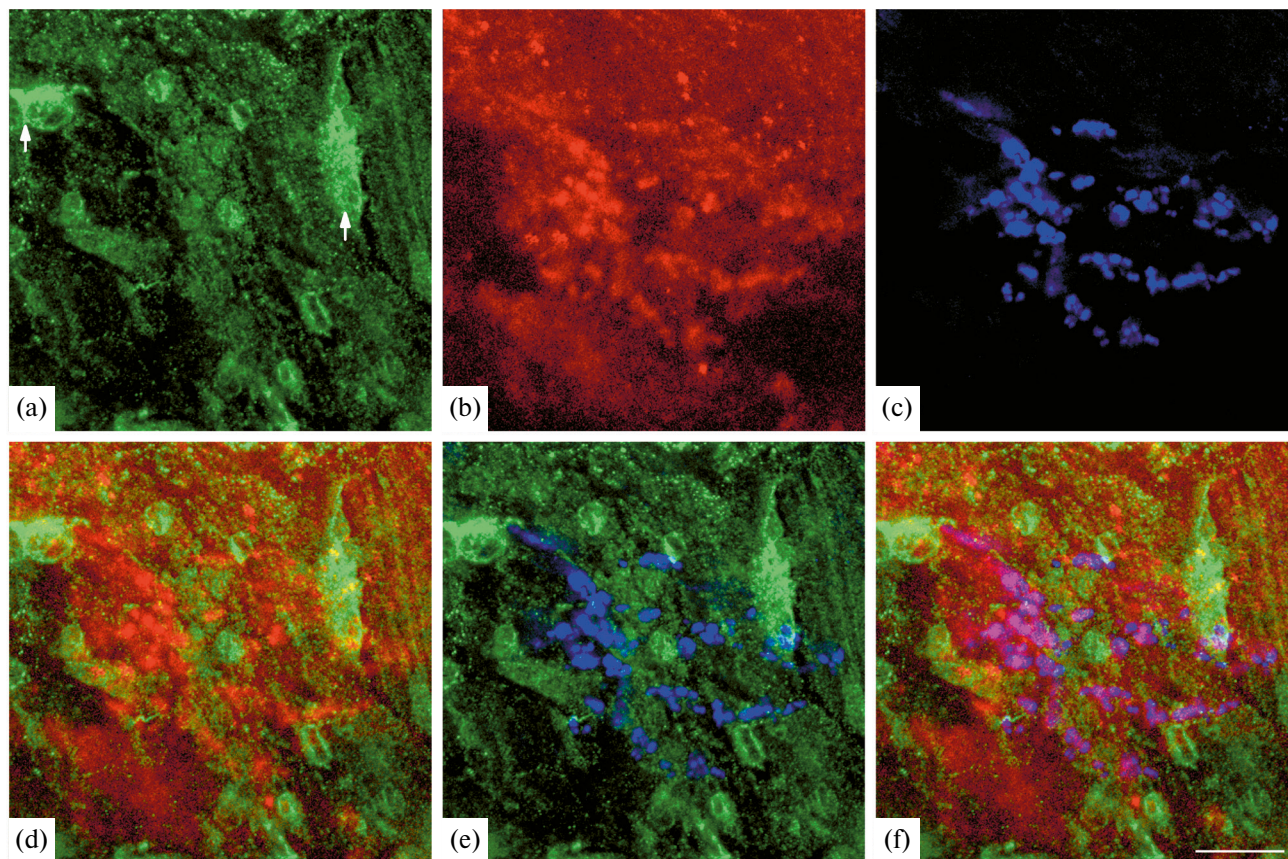
Иммуногистохимическое мечение фрагментов соматической мускулатуры дождевого червя с целью обнаружения белка кальмодулина показало следующие результаты. Иммунофлуоресценция носит точечный характер, встречаясь по всей поверхности мембран соматических мышечных клеток (рис. 1a), сочетаясь с наличием ограниченных мест более интенсивного мечения (рис. 1a, стрелки). Необходимо отметить, что данные зоны частично перекрываются с районами свечения, маркированными на присутствие белка синаптофизина (рис. 1a, b, d, f) и с мечением TMP- $\alpha$ -Б нАХР (рис. 1a, c, e, f). Полученные данные позволяют считать, что белок кальмодулин присутствует как в синаптических, так и во внесинаптических зонах мембран соматических мышечных клеток и его локализация не демонстрирует выраженной привязки к районам нервно-мышечных контактов.

Выявление антителами наличия фермента Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин зависимой протеинкиназы типа I показало неоднородное мечение всей поверхности



**Рис. 1.** Флуоресцентное тройное мечение препарата соматических мышечных клеток дождевого червя *Lumbricus terrestris*. (a) — Иммуномечение антителами к кальмодулину (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного мечения; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение TMP- $\alpha$ -Б постсинаптических нАХР (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20  $\mu$ m.





**Рис. 2.** Выявление  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназе типа 1 (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного мечения; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение TMR- $\alpha$ -B постсинаптических nAHP (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

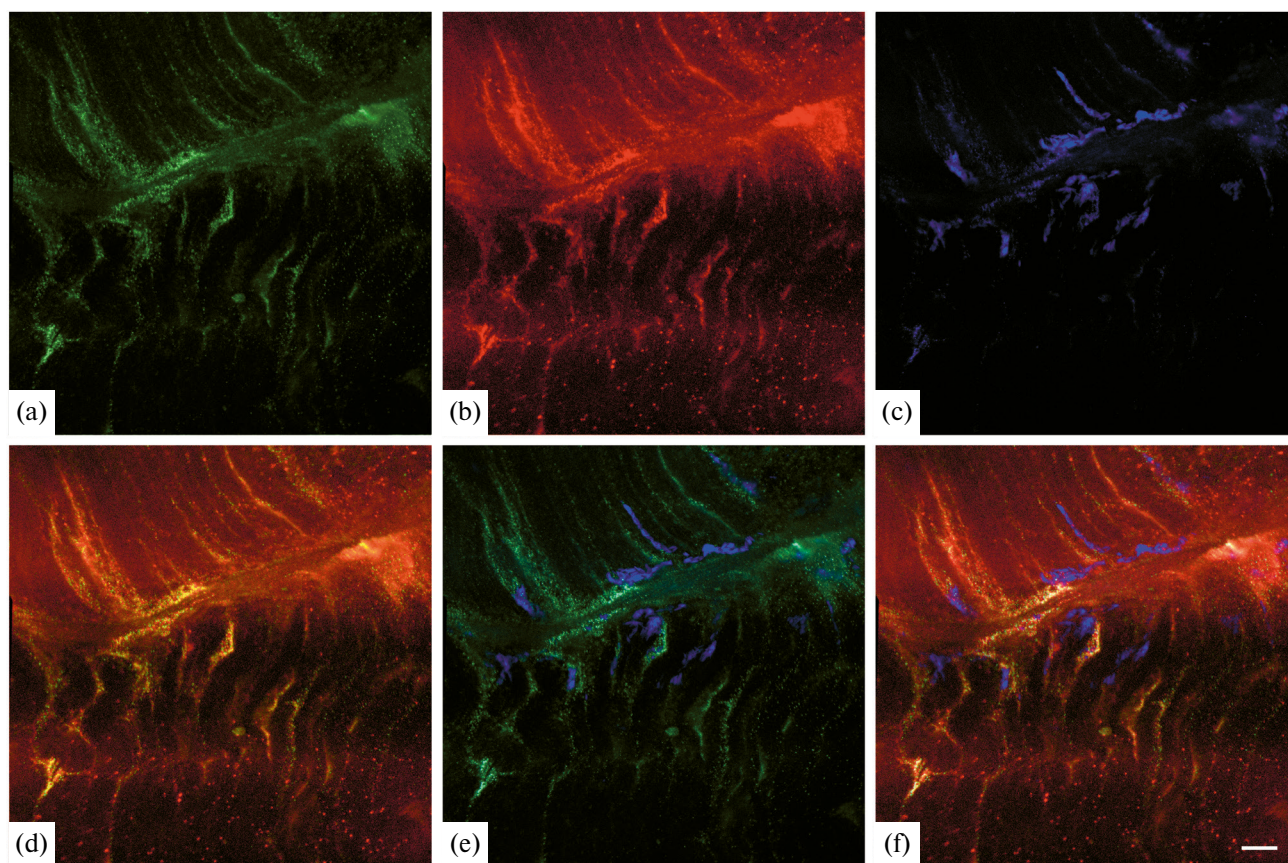
мембран соматических мышечных клеток (рис. 2a), которое сочеталось с наличием ограниченных мест более интенсивного иммуномечения (рис. 2a, стрелки). При этом участки интенсивного мечения на данный фермент мало совпадали с мечением на синаптофизин (рис. 2a, b, d, f) и постсинаптические никотиновые nAHP (рис. 2a, c, e, f). Полученные результаты демонстрируют наличие в соматических мышечных клетках фермента  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы типа 1, причем последний присутствует в большей концентрации во внесинаптических зонах и, в меньшей, в синаптических.

Иммуногистохимическая реакция, поставленная с целью идентификации  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 показала неравномерную флуоресценцию мышечных клеток (рис. 3a). Иммуномечение на данный фермент практически полностью перекрывалось с зонами выявления белка синаптофизина (рис. 3a, b, d, f), а также постсинаптических nAHP (рис. 3a, c, e, f).

Таким образом, полученные результаты указывают на присутствие  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 как в синаптических, так и во внесинаптических регионах мышечной мембраны. Нельзя исключить, что данный фермент может присутствовать как в двигательных нервных окончаниях, так и в концевой пластинке постсинаптической мембраны, что может указывать на его предположительное участие в процессах рециклирования nAHP [8].

Иммуногистохимическое выявление мышечных препаратов с целью обнаружения белка синаптотагмина типа 2 показало неравномерное мечение мембран соматических мышечных клеток (рис. 4a). Необходимо отметить, что иммуномечение на синаптотагмин типа 2 полностью повторяло мечение на белок синаптофизин (рис. 4a, b, d, f) и постсинаптические nAHP (рис. 4a, c, e, f). Полученные данные позволяют считать с высокой вероятностью, что белок синаптотагмин 2 присутствует





**Рис. 3.** Наличие  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 при тройном флуоресцентном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназе типа 2 (зеленый цвет); (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение НАХР при помощи ТМР- $\alpha$ -Б (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

как на пре-, так и на постсинаптических мембранах соматических мышечных клеток дождевого червя.

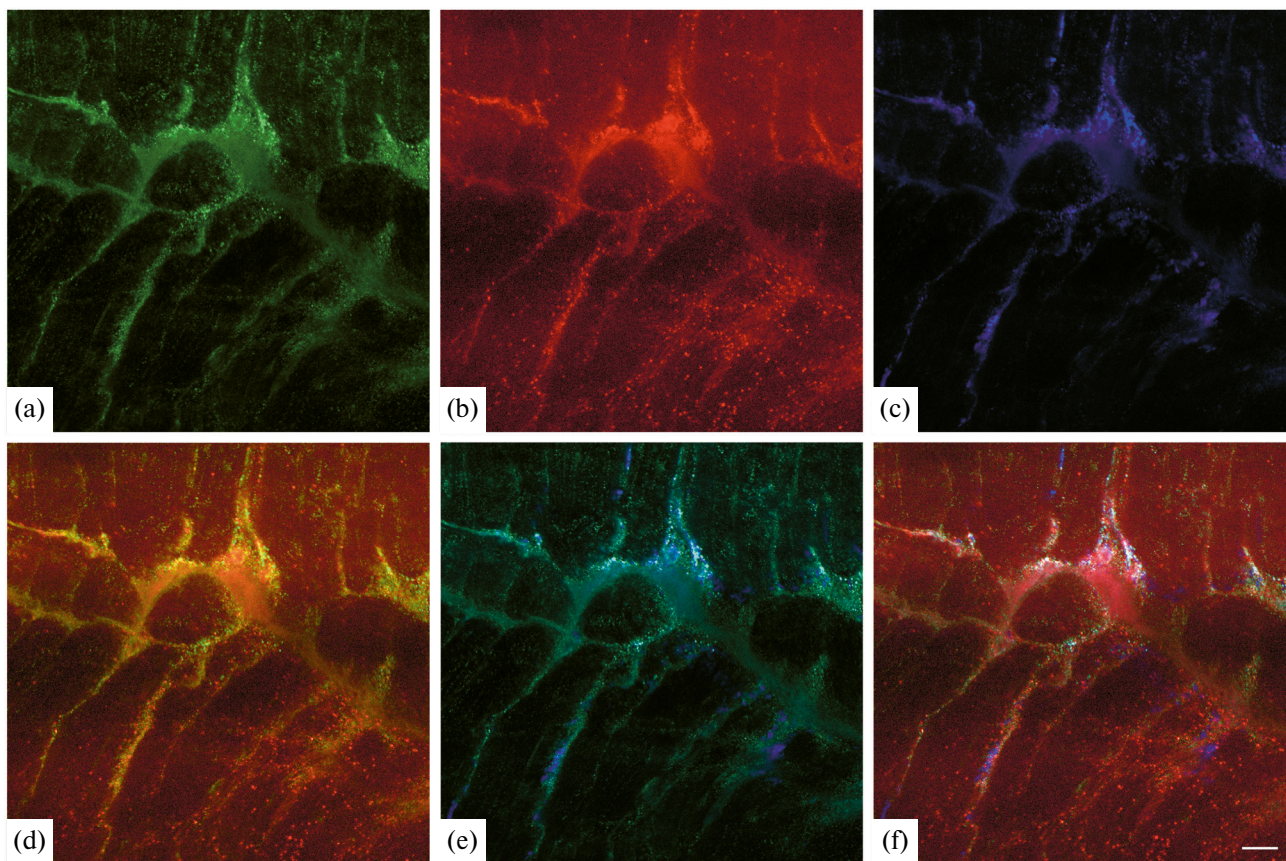
Мечение антителами мышечных препаратов на белок синаптотагмин типа 7 выявило неравномерное иммуномечение препарата, которое в некоторых участках имело более интенсивное свечение (рис. 5a, стрелки). Эти участки более яркого свечения совпадали с мечением на синаптофизин (рис. 5a, b, d, f) и НАХР (рис. 5a, c, e, f). Таким образом, синаптотагмин типа 7 в большей степени локализуется на пре- и постсинаптических мембранах мышечных клеток, и меньшей степени представлен вне зон нервно-мышечных синапсов.

Иммуногистохимическая реакция на определение белка кальциневрина А показала неравномерное мечение мышечных клетках (рис. 6a). При этом мечение антителами на белок кальциневрин А в большей степени повторяло маркирование на НАХР (рис. 6a, c, e, f), чем мечение на синаптофизин (рис. 6a, b, d, f). Полученные результаты позво-

ляют считать, что белок кальциневрин А в большей степени концентрируется в зоне нервно-мышечных синапсов. Более того, возможно он тесно связан с канально-рецепторной организацией концевых пластинок нервно-мышечных синапсов.

Подводя итог полученным результатам, можно прийти к следующему заключению. Методом иммунофлуоресцентного мечения препаратов соматической мышцы дождевого червя показано присутствие в последних ряда ключевых  $\text{Ca}^{2+}$ -акцепторных белков, а именно: кальмодулина,  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 и типа 2, синаптотагмина типа 2 и типа 7 и кальциневрина А. Некоторые из данных белков, такие как кальмодулин и  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимая протеинкиназа типа 1 определяются как в синаптических, так и внесинаптических областях мышечных препаратов, без выраженной привязки своей локализации к зонам нервно-мышечных контактов. В тоже время такие белки как  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимая протеинкиназа 2,





**Рис. 4.** Обнаружение синаптотагмина типа 2 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к синаптотагмину 2 (зеленый цвет); (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение nAChR при помощи TMR- $\alpha$ -Б (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20  $\mu$ m.

синаптотагмин 2, синаптотагмин 7 и кальциневрин А хотя представлены и во внесинаптических регионах соматической мышцы, отчетливо демонстрируют свое присутствие именно в зонах концевых пластинок мионевральных синапсов. При этом для синаптотагмина типа 7 и кальциневрина А это присутствие выражено наиболее отчетливо. Основываясь на данных литературы [1, 11, 18] можно думать, что данные белки играют существенную роль как в процессах квантовой секреции медиатора, рециклировании постсинаптических канально-рецепторных комплексов, так и нейрональной пластичности двигательных нервно-мышечных синапсов.

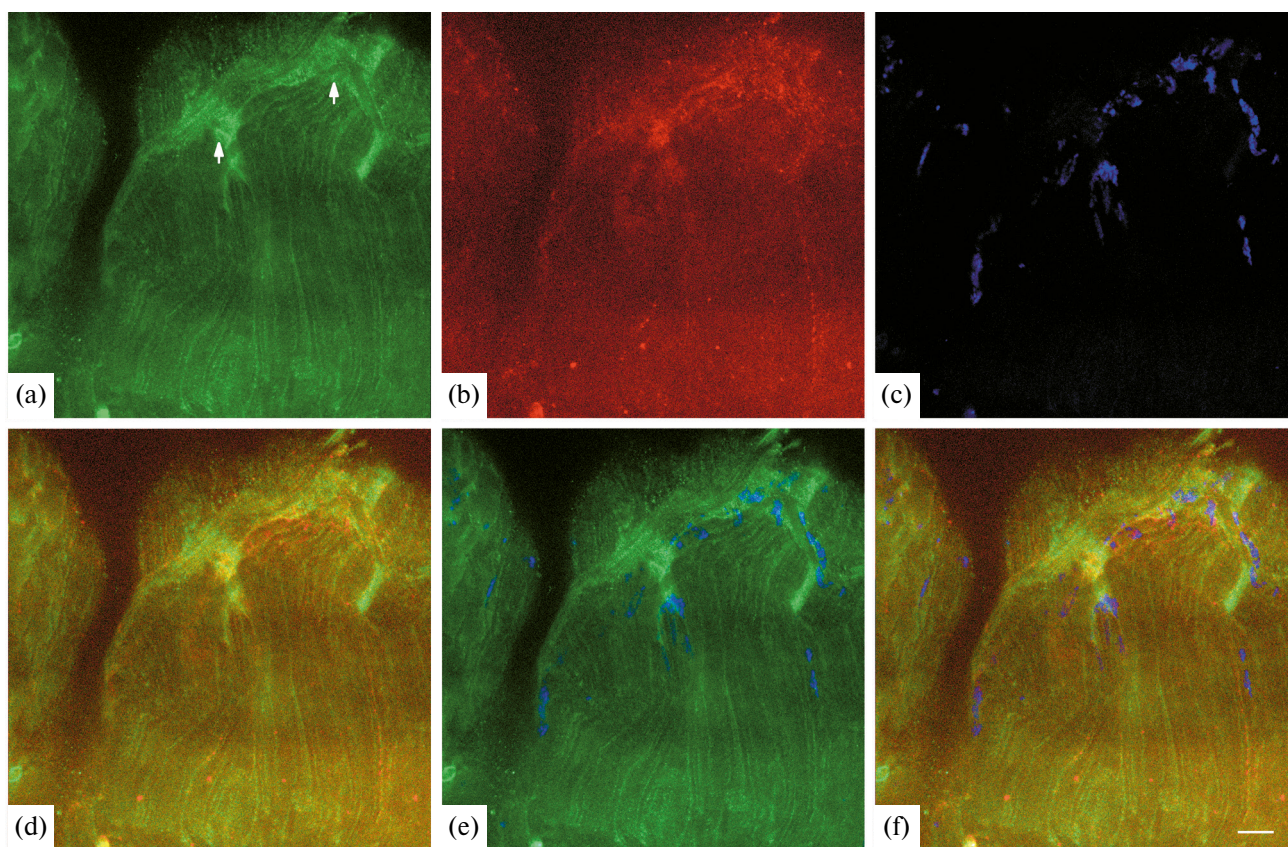
Дождевой червь, который относится к типу Аннелиды, имеет характеристики свойственные для последнего общего предка билатеральных животных [29]. Кольчатые черви являются первыми целомическими сегментированными животными в филогенетическом ряду, которые обладают соматической мускулатурой и способны к сложным

управляемым локомоциям [23]. Нами получены сведения о наличии кальций-сенсорных белков в синапсах эволюционно-первичной двигательной мускулатуры. Аналогичные белки имеются в нервно-мышечном аппарате более высокоорганизованных животных, в том числе у различных классов типов Моллюски, Членистоногие и Хордовые, включая Млекопитающих [2–8]. Таким образом, можно утверждать, что система кальцевой регуляции квантовой секреции медиатора с помощью изученных нами кальций-акцепторных белков обладает высокой генетической консервативностью и сформировалась на самых ранних этапах эволюции нервно-мышечной регуляции двигательной активности у животных.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.Ф.Н. и Е.М.В.), сбор данных (Н.Д.А.), обработка данных (Л.Ф.Н., Н.Д.А.), написание и редактирование манускрипта (Л.Ф.Н., Е.М.В.).





**Рис. 5.** Выявление синаптотагмина типа 7 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к синаптотагмину 7 (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного окрашивания; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение нАХР при помощи ТМР-α-Б (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол №23/5 от 12.05.2023 г.).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-24-00239, <https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

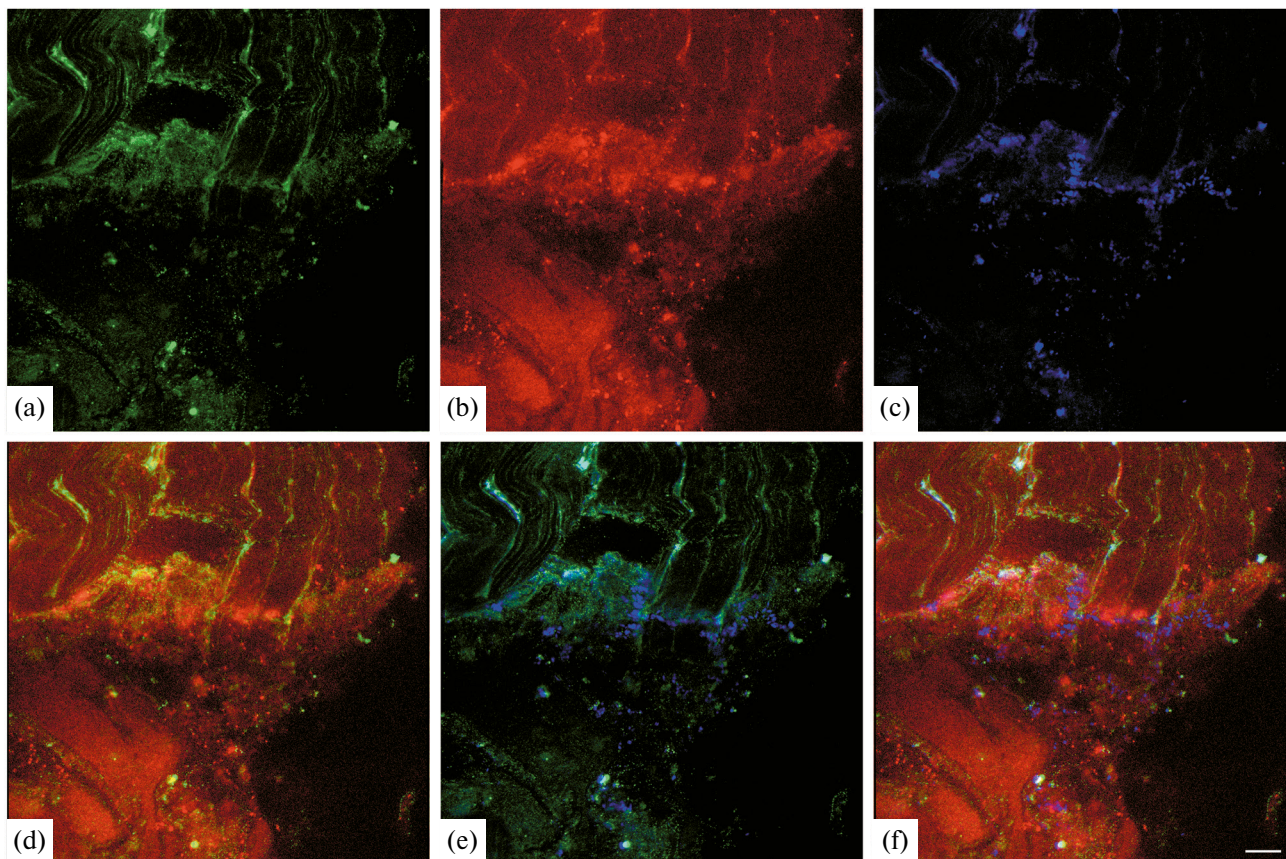
#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Südhof TC* (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011353. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353>
2. *DeLorenzo RJ* (1982) Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc* 41: 2265–2272.
3. *Xue R, Meng H, Yin J, Xia J, Hu Z, Liu H* (2021) The Role of Calmodulin vs. Synaptotagmin in Exocytosis. *Front Mol Neurosci* 14: 691363. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.691363>
4. *Sakaba T, Neher E* (2001) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32: 1119–1131. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00543-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00543-8)
5. *Liu Q, Chen B, Ge Q, Wang ZW* (2007) Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II modulates neurotransmitter release by activating BK channels at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *J Neurosci* 27: 10404–10413. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5634-06.2007>
6. *Fujii T, Sakurai A, Littleton JT, Yoshihara M* (2021) Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission. *Sci Rep* 11: 4059. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83397-5>
7. *Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF, Lin W, Adachi R, Südhof TC* (2006) Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to  $\text{Ca}^{2+}$  triggering





**Рис. 6.** Наличие кальциневрина А при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (а) – Иммуномечение антителами к кальциневрину А (зеленый цвет); (б) – иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (с) – мечение НАХР при помощи ТМР-α-Б (синий цвет); (d) – наложение изображений (а) и (b); (e) – наложение изображений (а) и (с); (f) – наложение изображений (а), (b) и (с). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

- of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 26: 13493–13504. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3519-06.2006>
8. *Martinez-Pena y Valenzuela I, Mouslim C, Akaaboune M* (2010) Calcium/calmodulin kinase II-dependent acetylcholine receptor cycling at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 30: 12455–12465. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3309-10.2010>
  9. *Schworer CM, Rothblum LI, Thekkumkara TJ, Singer HA* (1993) Identification of novel isoforms of the delta subunit of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. Differential expression in rat brain and aorta. *J Biol Chem* 268: 14443–14449. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85259-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85259-6)
  10. *Bayer KU, Harbers K, Schulman H* (1998)  $\alpha\text{KAP}$  is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle. *EMBO J* 17: 5598–5605. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5598>
  11. *Martinez-Pena y Valenzuela I, Akaaboune M* (2021) The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction. *Cells* 10: 358. <https://doi.org/10.3390/cells10020358>
  12. *Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR* (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron* 57: 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.016>
  13. *Nesler KR, Starke EL, Boin NG, Ritz M, Barbee SA* (2016) Presynaptic CamKII regulates activity-dependent axon terminal growth. *Mol Cell Neurosci* 76: 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.08.007>
  14. *Chen C, Arai I, Satterfield R, Young SM Jr, Jonas P* (2017) Synaptotagmin 2 Is the Fast  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor at a Central Inhibitory Synapse. *Cell Rep* 18: 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.067>
  15. *Xu J, Mashimo T, Südhof TC* (2007) Synaptotagmin-1, -2, and -9:  $\text{Ca}^{2+}$  sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54: 567–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004>
  16. *Weyrer C, Turecek J, Harrison B, Regehr WG* (2021) Introduction of synaptotagmin 7 promotes facilitation at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *Cell Rep* 36: 109719. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109719>
  17. *Yakel JL* (1997) Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and



- gene transcription. *Trends Pharmacol Sci* 18: 124–134. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)01046-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01046-8)
18. Creamer TP (2020) Calcineurin. *Cell Commun Signal* 18: 137. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
  19. Volkov EM, Nurullin LF (2005) 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: 360–362. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0294-2>
  20. Nurullin LF, Almazov ND, Volkov EM (2023) Immunofluorescent Identification of GABAergic Structures in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 17: 208–213. <https://doi.org/10.1134/S1990747823040074>
  21. Parry L, Tanner A, Vinther J (2014) The origin of annelids. *Front Palaeontology* 57: 1091–1103. <https://doi.org/10.1111/pala.12129>
  22. Purschke G, Müller MCM (2006) Evolution of body wall musculature. *Integr Comp Biol* 46: 497–507. <https://doi.org/10.1093/icb/icj053>
  23. Allentoft-Larsen MC, Gonzalez BC, Daniels J, Katija K, Osborn K, Worsaae K (2021) Muscular adaptations in swimming scale worms (Polynoidae, Annelida). *R Soc Open Sci* 8: 210541. <https://doi.org/10.1098/rsos.210541>
  24. Denes AS, Jékely G, Steinmetz PR, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DE, Balavoine G, Arendt D (2007) Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129: 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.040>
  25. Volkov EM, Nurullin LF, Nikolsky EE, Švandová I, Vyskočil F (2000) Participation of electrogenic Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol Res* 49: 481–484. [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49\\_481.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf)
  26. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445–453. <https://doi.org/10.1002/bies.20012>
  27. Kwon SE, Chapman ER (2011) Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70: 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
  28. 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. <https://doi.org/10.1007/bf01170827>
  29. Christodoulou F, Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, Snyman H, Hannon GJ, Bork P, Arendt D (2010) Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 463: 1084–1088. <https://doi.org/10.1038/nature08744>

## IMMUNOFLUORESCENT LOCALIZATION OF CA<sup>2+</sup>-SENSOR PROTEINS IN THE SOMATIC MOTOR MUSCLES OF THE EARTHWORM *LUMBRICUS TERRESTRIS*

L. F. Nurullin<sup>a, b, #</sup>, N. D. Almazov<sup>b</sup> and E. M. Volkov<sup>b, ##</sup>

<sup>a</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

<sup>b</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>#</sup> e-mail: lenizn@yandex.ru

<sup>##</sup> e-mail: euroworm@mail.ru

The method of immunofluorescent staining of earthworm somatic muscle samples showed the presence of calmodulin, Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinases type 1 and type 2, synaptotagmin type 2 and type 7 and calcineurin A. These proteins are detected in both synaptic and extrasynaptic regions of the motor muscle. However, for synaptotagmin type 2 and type 7, calcineurin A, their predominant localization in the area of neuromuscular synapses has been established. Besides, synaptic localization for synaptotagmin 7 and calcineurin A is most clearly expressed.

**Keywords:** Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins, neuromuscular junction, somatic muscle cells, earthworm