

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.25; 577.352.336; 577.352.332; 616.8

ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЗЕРВНОГО ПУЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ С УДАЛЕННЫМИ КОМПОНЕНТАМИ БЕЛКОВОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ

© 2024 г. Н. В. Нифантова^а, А. Г. Шишков^а, О. М. Коренькова^а, Е. С. Сопова^{а, б},
Л. Бродин^б, О. В. Шупляков^{а, б, *}

^а Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины,
лаборатория биологии синапсов, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^б Отдел нейронаук, Каролинский институт, Стокгольм, 17177 Швеция

*e-mail: oleg.shupliakov@ki.se

Поступила в редакцию 02.10.2023

После доработки 05.11.2023

Принята к публикации 08.11.2023

Белок эндофилин А, который в геноме млекопитающих кодируется тремя генами — эндофилин А1, А2 и А3, участвует в регуляции синаптического цикла на стадиях экзо- и эндоцитоза и присутствует в резервном пуле синаптических везикул (СВ), где его функция не ясна. Эксперименты, проведенные *in vitro*, позволяют предполагать, что посредством SH3-домен-опосредованных взаимодействий эндофилин А обеспечивает вхождение ряда белков в состав жидкой белковой фазы, организующей СВ в резервном пуле. Мы исследовали эффект удаления генов эндофилина и одного из его партнеров, участвующих в этих взаимодействиях, — динамина, на организацию СВ в синапсах, образованных кортикальными нейронами в культуре. Исследования показали, что удаление генов эндофилина не приводит к изменениям плотности СВ в резервном пуле. В то же время удаление генов динамина 1 и динамина 3 вызывает значительное увеличение плотности везикул. Мы предполагаем, что функции эндофилина в синапсах дополняются другими SH3-домен-содержащими белками, которые являются компонентами белковой жидкой фазы резервного пула СВ.

Ключевые слова: синапс, резервный пул синаптических везикул, разделение жидких фаз, эндофилин, динамин, цикл синаптических везикул

DOI: 10.31857/S0233475524020087, EDN: xkdssv

ВВЕДЕНИЕ

Резервный пул синаптических везикул (СВ) — специализированный немембранный компартмент химического синапса, находящийся на расстоянии около 100 нм над активной зоной и содержащий везикулы, заполненные нейромедиатором, которые используются для синаптической передачи при повышенной активности синапса [1, 2]. Истощение запаса СВ в резервном пуле (РП) приводит к невозможности длительного поддержания синаптической передачи и к синаптической депрессии. Основным структурным компонентом РП является белок синапсин, способный при определенных условиях переходить из растворимого состояния в состояние жидкой фазы, образуя белковый конденсат, включающий в себя СВ [3–5]. В состоянии покоя в РП также локализуется ряд эндоцитозных белков [6], в частности N-BAR белок эндофилин А [6–8].

Исследования, проведенные с изолированными белками, показали, что эндофилин способен образовать жидкую фазу вместе в синапсине. Его присутствие позволяет войти в состав жидкой фазы целому ряду других белков, находящихся в РП *in vivo*, таких как интерсектин, динамин и амфифизин [9]. Это свойство делает эндофилин кандидатом на роль главного регулятора состава жидкой фазы и структуры РП. Выполняет ли эндофилин эту функцию в живом синапсе, остается неизвестным.

В данной работе мы исследовали эффект удаления генов эндофилина на организацию РП в синапсах, образованных кортикальными нейронами в культуре, в состоянии покоя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток и электронная микроскопия. Кортикальные нейроны с тройным нокаутом по

генам эндофилина A1–3 (*EndoTKO*; $n = 3$), с двойным нокаутом по генам динамина 1,3 (*Dyn1,3DKO*; $n = 3$) и контрольных животных ($n = 3$) культивировали согласно описанному ранее протоколу [7, 10, 11]. Мыши *EndoTKO* и *Dyn1,3DKO* получены скрещиванием животных с нокаутом отдельных генов, как описано ранее [10, 11]. Препараты культур нейронов были приготовлены в лаборатории P. De Camilli (Yale University School of Medicine, USA) и любезно предоставлены проф. P. De Camilli. Первичные культуры клеток получали из животных на стадии развития P0 в одинаковых условиях. Нейроны фиксировали через 2 недели *in vitro* в 1.3% глutarовом альдегиде, приготовленном на 66 мМ натрий-какодилатном буфере, постфиксировали в 1% OsO_4 , 1.5% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ в 0.1М натрий-какодилатном буфере, окрашивали в 0.5% уранилацетате, дегидратировали в спиртах, заключали в смолу Embed 812 (EMS). Серии из 5–10 ультратонких 70-нм срезов изготавливали на ультратоме Leica UC и помещали на покрытые формваром бленды. Срезы контрастировали в 1% водном растворе уранилацетата и цитрата свинца, исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol-1400 с камерой Olympus-SIS Veleta (2048×2048), фотографировали на увеличениях ×30000 и ×50000.

Анализ изображений и статистика. Синапсы отбирали случайным образом на серийных срезах. Для сравнения гомогенных популяций в различных культурах исследования проводили на асимметричных синапсах. Для анализа электронных микрофотографий и измерения параметров РП использовали ПО Image J. Значения площади РП на идентифицированном центральном срезе синапса нормализовали к длине активной зоны. На некоторых срезах было сложно провести измерение всех интересующих структур, например, из-за наклонной ориентации плоскости среза. С этим связаны различия в количестве измерений отдельных параметров в графиках. Статистическую обработку данных проводили с помощью ПО Prism 9 (GraphPad).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При тройном нокауте по генам эндофилина A1–3 (*EndoTKO*) фенотипическим признаком межнейронных синапсов на ультраструктурном уровне является наличие клатриновых везикул в непосредственной близости от активной зоны [10]. Это связано с тем, что основной функцией эндофилина при эндоцитозе является привлечение (рекрутинг) к мембране везикул фосфоинозитидфосфатазы синаптоянина, которая запускает процесс снятия клатринового окаймления [10, 12].

Действительно, в синапсах *EndoTKO* вокруг кластера СВ мы обнаружили клатрин-окаймленные везикулы (КВ) (рис. 1а). Преимущественно КВ находились на расстоянии до 200 нм от границы кластера. Количество КВ в этой зоне составило в среднем 24.82 против 2.92 КВ/мкм² в контроле ($p < 0.0001$, t -тест; рис. 1у). В ряде случаев КВ наблюдали в аксоплазме на расстоянии более 1 мкм от границы кластера (максимум – 1.44 мкм), далеко за пределами зоны эндоцитоза.

Синапсы *EndoTKO* имели выраженные кластеры СВ, включающие везикулы РП (рис. 1в). Площадь РП в синапсах *EndoTKO* была в среднем в 1.6 раза меньше, чем в контроле ($p = 0.0108$, t -тест; рис. 1з), что объясняется замедлением эндоцитоза в синапсах. Неполное блокирование клатрин-зависимого эндоцитоза, вероятно, является следствием частичного дублирования функций эндофилина другими белками, такими как интерсектин и амфифизин, которые имеют свойство взаимодействовать с партнерами эндофилина [13]. Чтобы выяснить, повлияло ли отсутствие эндофилина на структуру РП, мы измерили плотность расположения СВ в кластерах синапсов *EndoTKO* и в контроле. Статистически значимых различий между этими группами выявлено не было (t -тест; рис. 1ж).

Для сравнения мы исследовали плотность расположения СВ в синапсах с двойным нокаутом по генам динамина (*Dyn1,3DKO*). Как и синаптоянин, динамины 1,3 взаимодействуют с эндофилином в процессе эндоцитоза [8] и необходимы для поддержания эндоцитоза в центральных синапсах [11]. Фенотип *Dyn1,3DKO* характеризуется многочисленными инвагинациями пресинаптической мембраны, образующими клатрин-окаймленные ямки [11, 14], что также наблюдалось в наших экспериментах. Размеры РП были значительно уменьшены (рис. 1д, 1з). Кластеры СВ были обнаружены только в отдельных синапсах, а в большинстве отсутствовали, что объясняется полной блокадой клатрин-зависимого эндоцитоза в отсутствие динамина и неспособностью клатрин-независимых механизмов эффективно формировать СВ [11]. Плотность везикул в РП оказалась существенно выше в синапсах *Dyn1,3DKO* по сравнению с *EndoTKO* ($p < 0.0001$) (рис. 1г, 1е, 1ж). Различий в средней длине активной зоны в исследованных синапсах обнаружено не было (рис. 1к).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что ключевую роль в организации жидкой фазы везикул РП играет белок синапсин [4, 5]. Наличие дополнительных белков в составе РП позволяет

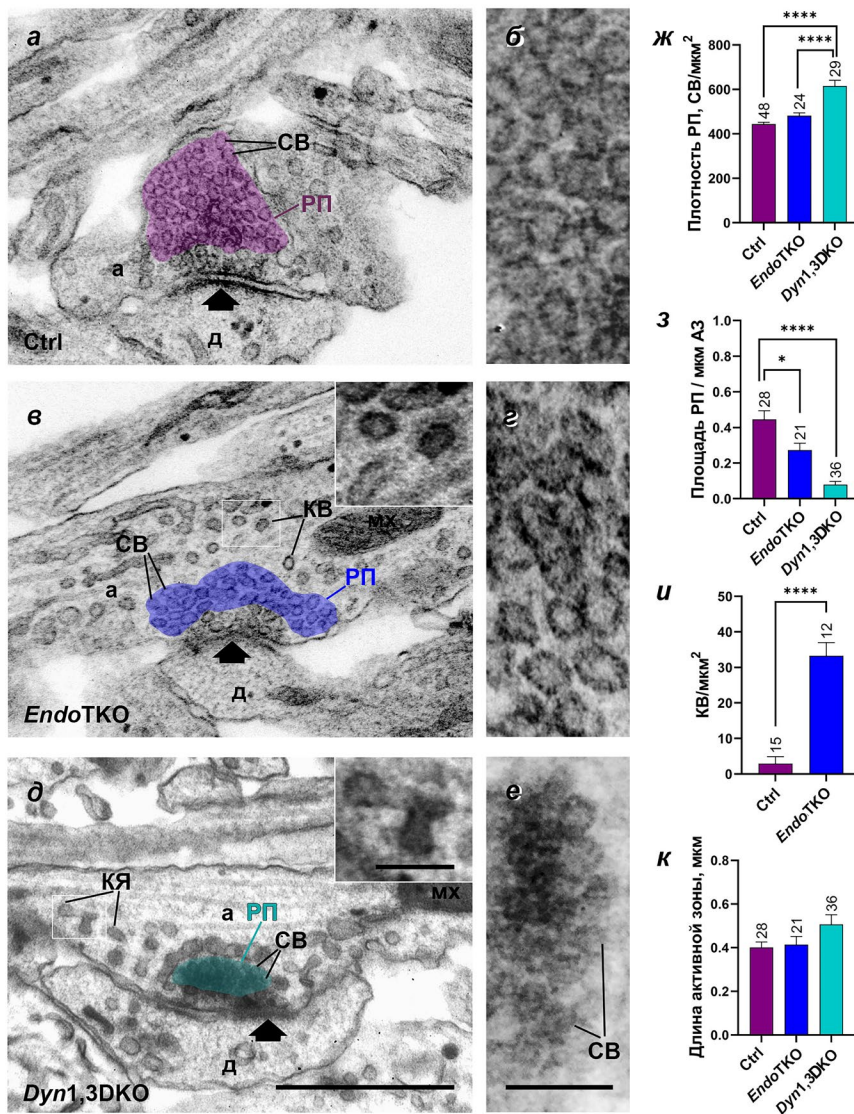


Рис. 1. Эффекты удаления генов эндофилина и динамина на организацию резервного пула СВ в асимметричных синапсах в культуре кортикальных нейронов.

а, в, д – Электронные микрофотографии асимметричных синапсов в контрольной культуре нейронов (*а*), в культуре нейронов с тройным нокаутом по генам эндофилина (*в*) и с двойным нокаутом по генам динамина 1 и 3 (*д*) в покое. Зоны, содержащие клатриновые везикулы (*в*) и клатрин-окаймленные ямки (*д*), выделены белой рамкой и показаны на вставках при большем увеличении. На микрофотографиях *б, г, е* участки РП, изображенных на *а, в, д*, показаны при большем увеличении. Масштаб для *а, в, д*: 500 нм; для вставок на *в, д*: 100 нм; для *б, г, е*: 100 нм. Обозначения: *а* – аксон, *д* – дендрит, СВ – синаптические везикулы, РП – резервный пул СВ, мх – митохондрия, КВ – клатрин-окаймленные везикулы, КЯ – клатрин-окаймленные ямки, черная стрелка – активная зона. *ж, з* – Плотность (*ж*) и площадь (*з*) резервных пулов в контрольных, *EndoTKO* и *Dyn1,3DKO* синапсах; площадь РП нормализована к длине активной зоны. *и* – Плотность КВ в зоне 200 нм от границы РП в контрольных и *EndoTKO* синапсах. *к* – Средняя длина активных зон в исследованных группах. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Цифры над столбцами указывают число исследованных синапсов.

менять свойства жидкой фазы, вследствие чего может изменяться динамика и организация РП при синаптической активности [3]. Так, в исследованиях *in vitro* было показано, что жидкая фаза СВ и синапсина способна рекрутировать α -синуклеин, что снижает плотность СВ в кластере [15]. В гиппокампальных синапсах с тройным

нокаутом генов α , β , γ -синуклеиновых везикулы РП кластеризуются плотнее, чем в синапсах дикого типа [16]. В отношении эндоцитозных белков, находящихся в РП в состоянии покоя и имеющих SH3-домены, способные взаимодействовать с синапсином, также высказывались предположения, что они регулируют восстановление структуры РП

при рекластеризации СВ после синаптической активности и необходимы для поддержания этой структуры в покое [13].

В недавних исследованиях было показано, что эндоцитозный белок эндофинин способен формировать жидкую фазу совместно с синапсином *in vitro* [9]. Коэкспрессия эндофина и синапсина в COS7 клетках повышала способность смешанной жидкой фазы кластеризовать СВ-подобные везикулы и увеличивала площадь таких псевдо-синаптических кластеров. Однако какое значение имеет эндофинин для поддержания структуры РП в живом синапсе, осталось невыясненным [9].

В настоящей работе на кортикальных нейронах мы показали, что генетическое удаление эндофинов A1, A2 и A3 в синапсах не нарушает плотность упаковки везикул в РП, что указывает на то, что эндофинин и белки, которые включаются в резервный пул с его помощью, не оказывают существенного влияния на организацию жидкой фазы СВ. Неожиданным оказалось значительное увеличение плотности везикул в РП при удалении динаминов 1 и 3. Возможным объяснением этому может быть отсутствие дублирования функций динамина при организации жидкой фазы. Для выяснения роли динамина в организации РП нужны дальнейшие исследования.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 21–15–00227) и Шведского Совета по научным исследованиям (grants 2020–01731, 2020–01952), Шведского фонда исследований мозга (Hjärnfonden), а также гранта СПбГУ (ID93026594). Мы бы хотели поблагодарить д-ра I. Milosević (University of Oxford) за помощь в получении культур и обсуждении результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Работа выполнена с соблюдением международных принципов по использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pieribone V.A., Shupliakov O., Brodin L., Hilfiker-Rothenfluh S., Czernik A.J., Greengard P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*, **375**, 493–497.
2. Rizzoli S.O., Betz W.J. 2004. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, **303**, 2037–2039.
3. Brodin L., Milovanovic D., Rizzoli S.O., Shupliakov O. 2022. alpha-Synuclein in the synaptic vesicle liquid phase: Active player or passive bystander? *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 891508.
4. Milovanovic D., Wu Y., Bian X., De Camilli P. 2018. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*, **361**, 604–607.
5. Pechstein A., Tomilin N., Fredrich K., Vorontsova O., Sopova E., Evergren E., Haucke V., Brodin L., Shupliakov O. 2020. Vesicle clustering in a living synapse depends on a synapsin region that mediates phase separation. *Cell Rep.*, **30**, 2594–2602.e3.
6. Shupliakov O. 2009. The synaptic vesicle cluster: a source of endocytic proteins during neurotransmitter release. *Neuroscience*, **158**, 204–210.
7. Denker A., Kröhnert K., Bückers J., Neher E., Rizzoli S.O. 2011. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17183–17188.
8. Sundborger A., Soderblom C., Vorontsova O., Evergren E., Hinshaw J.E., Shupliakov O. 2011. An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Sci.*, **124**, 133–143.
9. Yoshida T., Takenaka K.I., Sakamoto H., Kojima Y., Sakano T., Shibayama K., Nakamura K., Hanawa-Suetsugu K., Mori Y., Hirabayashi Y., Hirose K., Takamori S. 2023. Compartmentalization of soluble endocytic proteins in synaptic vesicle clusters by phase separation. *iScience*, **26**, 106826.
10. Milosevic I., Giovedi S., Lou X., Raimondi A., Collesi C., Shen H., Paradise S., O'Toole E., Ferguson S., Cremona O., De Camilli P. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*, **72**, 587–601.
11. Raimondi A., Ferguson S.M., Lou X., Armbruster M., Paradise S., Giovedi S., Messa M., Kono N., Takasaki J., Cappello V., O'Toole E., Ryan T.A., De Camilli P. 2011. Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, **70**, 1100–1114.
12. Gad H., Ringstad N., Low P., Kjaerulff O., Gustafsson J., Wenk M., Di Paolo G., Nemoto Y., Crun J., Ellisman M.H., De Camilli P., Shupliakov O., Brodin L. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*, **27**, 301–312.
13. Шишков А.Г., Нифантова Н.В., Коренькова О.М., Сопова Е.С., Бродин Л., Шупляков О.В. 2023. BAR-домен-содержащие белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе. *Биол. мембраны*, **40** (3), 155–171.
14. Shishkov A.G., Nifantova N.V., Korenkova O.M., Sopova E.S., Brodin L., Shupliakov O. 2023. BAR domain proteins as putative regulators of the protein liquid phase in nerve terminals in the central nervous system. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **17**, 69–82.
15. Ferguson S.M., Brasnjo G., Hayashi M., Wolfel M., Collesi C., Giovedi S., Raimondi A., Gong L.W.,

- Ariel P., Paradise S., O'Toole E., Flavell R., Cremona O., Miesenbock G., Ryan T.A., De Camilli P. 2007. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**, 570–574.
16. Hoffmann C., Sansevrino R., Morabito G., Logan C., Vabulas R.M., Ulusoy A., Ganzella M., Milovanovic D. 2021. Synapsin condensates recruit alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.*, **433**, 166961.
17. Vargas K.J., Schrod N., Davis T., Fernandez-Busnadiego R., Taguchi Y.V., Laugks U., Lucic V., Chandra S.S. 2017. synucleins have multiple effects on pre-synaptic architecture. *Cell Rep.*, **18**, 161–173.

Organization of the Reserve Pool of Synaptic Vesicles in Nerve Terminals Lacking Protein Liquid Phase Components

© 2024 г. N. V. Nifantova¹, A. G. Shishkov¹, O. M. Korenkova¹, E. Sopova^{1, 2}, L. Brodin²,
O. Shupliakov^{1, 2, *}

¹*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University,
St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, 17177 Sweden*
**e-mail: oleg.shupliakov@ki.se*

Protein endophilin A regulates the synaptic vesicle cycle during exo- and endocytosis, and it is present in the reserve pool of synaptic vesicles (SVs), where its function is unknown. In vitro experiments suggest that endophilin via its SH3 domain interactions incorporates several components into the protein liquid phase that organizes SVs in the reserve pool. We investigated the effect of deletion of the genes encoding endophilin and one of its binding partners, dynamin, on the organization of SVs in living synapses formed by cortical neurons in culture. Experiments showed that deletion of endophilin genes does not change the density of SVs in the reserve pool. At the same time, deletion of the major dynamins 1 and 3 leads to a significant increase in the vesicle density. These results suggest that other SH3-domain-containing proteins, which are components of the protein liquid phase, complement the function of endophilin in the SV reserve pool.

Keywords: synapse, reserve pool of synaptic vesicles, liquid–liquid phase separation, endophilin, dynamin, synaptic vesicle cycle