

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 576.32/.36
Per. № НИОКТР АААА-А19-119100490109-3

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе

«19» декабря 2022 г.
В. Микущев



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
ЛАБОРАТОРИЯ БИОЛОГИИ СИНАПСОВ

(промежуточный, этап 4)

Руководитель НИР,
профессор,
кандидат биологических наук,
Dr.Med.Sci.

О.В. Шупляков

24.11.2022.

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР:

Зав.лабораторией,
Профессор,
к.б.н., Dr. Med. Sci.



подпись

О.В. Шупляков
Подготовка разделов
1 - 5

Исполнители:

Научный сотрудник



подпись

Е.С. Сопова
Подготовка разделов
2 - 5

Инженер-исследователь



подпись

О.М. Коренькова
Подготовка разделов
2 - 4

Инженер-исследователь



подпись

К.В. Онохин
Подготовка разделов
1, 2, 4

Лаборант-исследователь



подпись

А. Г. Шишков
Подготовка разделов
2, 3, 4

Лаборант-исследователь



подпись

Н. А. Нифантова
Подготовка разделов
2

Специалист



подпись

Ю. В. Линовская
Подготовка разделов
2

Нормоконтроль



Н.В. Квадришиус

30.11.2022

РЕФЕРАТ

Отчет: 49 страниц, 14 рисунков, 2 таблицы, 32 процитированных источника.

Ключевые слова: НЕЙРОБИОЛОГИЯ, МЕЖНЕЙРОННЫЙ СИНАПС, СИНАПТИЧЕСКИЕ ВЕЗИКУЛЫ, СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ, МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА.

Исследования лаборатории биологии синапсов Института Трансляционной Медицины СПбГУ, как и ранее, направлены: 1. на изучение молекулярных механизмов, управляющих везикулярным трафиком в синаптических соединениях, 2. на выяснение роли синаптических патологий на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний и 3. на поиск терапевтических подходов для восстановления функций центральной нервной системы.

Работа лаборатории в 2022 году была нацелена на изучение молекулярных механизмов, управляющих везикулярным транспортом, и их связей с патологическими процессами при развитии нейродегенеративных заболеваний, а также на исследовании генетических программ приводящих к развитию болезни Паркинсона в центральной нервной системе. В наших исследованиях мы применяли генетические, молекулярно-биологические, физиологические, морфологические и другие современные клеточные технологии. Для визуализации клеточных процессов использовалась микроскопия высокого разрешения (STED), а также конфокальная и электронная микроскопия. В качестве модельных систем использовались трансгенные животные, изолированные препараты мозга животных, клеточные культуры, а для модельных экспериментов – синтезированные белки и липиды.

За отчётный период обнаружены и объяснены новые механизмы, управляющие везикулярным транспортом в межнейронных синапсах и нейросекреторных клетках. С помощью микроскопии высокого разрешения (STED) прослежена динамика формирования секреторных везикул в живой клетке и обнаружен новый механизм реформирования везикул в секреторных клетках. Проанализирован ряд механизмов, участвующих в трансформации жидких белковых конденсатов, которые участвуют в образовании кластеров синаптических везикул в нервных терминалях. Получены новые данные о ранних изменениях в митохондриях при нарушении функции митохондриальных генов, которые связаны с болезнью Паркинсона. Результаты исследований лаборатории в 2022 году опубликованы в ведущих научных журналах (Q1),

таких как **iScience**, **Frontiers in Molecular Biosciences** и направлены в печать. Таким образом, наши исследования выявили новые механизмы работы синаптических соединений, новые функции везикулярного цикла в нейросекреторных клетках и, в частности, клатрин-независимого эндоцитоза. С помощью трансгенных технологий наши исследования позволили проследить развитие патологических изменений в митохондриях нервных клетках, которые связаны с болезнью Паркинсона. Анализ всех этих механизмов, нацелен на поиск терапевтических подходов для восстановления функций клеток и межклеточных контактов в центральной нервной системе.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК РИСУНКОВ.....	6
СПИСОК ТАБЛИЦ	8
1. ВВЕДЕНИЕ.....	9
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР	13
2.1 Проведённые эксперименты по направлению исследований «Анализ молекулярных механизмов выделения нейроактивных веществ и связанных с ними мембранных процессов».....	13
2.1.1 Кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза при реформировании секреторных везикул.	15
2.1.2 Взаимодействие белков Dap160-Nwk контролирует размеры синаптических везикул.	22
2.1.3 Исследование роли F-BAR белка синдапина в «bulk» эндоцитозе. Негативная регуляция функции динамина синдапином при восстановлении синаптических везикул.	28
2.2 Проведённые исследования по теме «Изучение роли белковых конденсатов и фазовых переходов состояния пресинаптических белков в норме и при образовании патологических агрегатов и амилоидных структур в нервных клетках».....	32
2.2.1 BAR белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе.	33
2.2.2 Роль α -синуклеина, входящего в состав патологических белковых агрегатов при нейродегенеративных заболеваниях, в регуляции жидкой фазы, организующей синаптические везикулы?.....	35
2.3 Исследование ранних патологий в центральных синапсах при мутациях митохондриальных генов, которые приводят к возникновению нейродегенеративных заболеваний.	36
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
4. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44
5. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	48

СПИСОК РИСУНКОВ

Рисунок №	Название рисунка	Страница
Рисунок 1	Схематический рисунок реформирования везикул при секреции биологически активных веществ и нейромедиаторов.	15
Рисунок 2	Визуализация слияния везикул, вызванного раствором с повышенным содержанием K^+ (90мМ, 90 сек) и деполяризацией в течении 1 сек.	16
Рисунок 3	Промежуточные эндоцитозные структуры с клатрин-окаймленными ямками на поверхности мембранных инвагинаций и классические формы эндоцитоза при реформировании секреторных везикул в хромаффинных клетках.	19
Рисунок 4	STED изображения PHmNG (зеленый), Clathrin-mTFP1 (красный), полученные при сканировании клетки в плоскости XZ.	20
Рисунок 5	Количественные характеристики инвагинаций с клатрин-опосредованными ямками.	20
Рисунок 6	Схематическое изображение новой стадии эндоцитоза при реформировании секреторных везикул, на которой происходит кооперация клатрин-опосредованного и «bulk» эндоцитоза.	21
Рисунок 7	Dap160 взаимодействует с NWK в дефосфорилированном состоянии с помощью SH3C домена.	25
Рисунок 8	Нарушение колокализации Dap160 у dC мутанта.	25
Рисунок. 9	Синаптические везикулы в нервно-мышечных соединениях у мутанта dC и dF-BAR и локализация Dap160 и Nwk у мутантов <i>mwk</i> .	26

Рисунок №	Название рисунка	Страница
Рисунок 10	Миниатюрные потенциалы в нервно-мышечных соединениях у мутанта dC имеют большую амплитуду.	27
Рисунок 11	Реконструкция свободных эндосом у активной зоны в двух синапсах, стимулированных с частотой 5 Гц в течение 20 мин, из не инъецированного аксона и аксона, в который были введены FAV фрагменты антител против SH3 домена синдапина.	31
Рисунок 12	Схема, иллюстрирующая участие BAR белков в регуляции жидких белковых фаз, образующихся на различных этапах синаптического цикла.	34
Рисунок 13	Инактивация <i>Mfn2</i> приводит к изменению формы митохондрий.	38
Рисунок 14	Трехмерная реконструкция крист митохондрий ДН после инактивации <i>Mfn2</i> .	39

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица №	Название таблицы	Страница
Таблица 1.	Список основных реактивов в работе 2.1.1.	48
Таблица 2.	Программы и алгоритмы, использованные в экспериментах в работе 2.1.1.	49

1. ВВЕДЕНИЕ

Поздняя диагностика является одной из главных причин неудач при лечении нейродегенеративных заболеваний. На поздних стадиях большинства нейродегенеративных заболеваний нейроны, как правило, погибают. Лечение является симптоматическим, направленным на поддержание, а не на восстановление функций пациентов. Выявление ранних патологий – одна из насущных проблем современной медицины. Биомедицинские исследования показывают, что во многих случаях ранние патологические изменения наблюдаются в зоне контактов или синапсов, которые устанавливают нервные клетки на клетках-мишенях в центральной нервной системе (ЦНС). Эти межклеточные контакты служат для передачи электрических и химических сигналов на нервные, мышечные и глиальные клетки и являются пластичными образованиями. Восстановление синаптических соединений и поиск программ восстановления погибших клеток в ЦНС при нейродегенеративных заболеваниях и травмах являются в настоящее время ключевыми проблемами биомедицины.

Исследования лаборатории биологии синапсов, Института Трансляционной Биомедицины СПбГУ по программе НИР направлены на решение этих проблем. Экспериментальная работа посвящена:

- а) изучению базовых молекулярных механизмов, управляющих везикулярным трафиком в синаптических соединениях;
- б) выяснению роли синаптических патологий на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний;
- в) поиску терапевтических подходов для восстановления функциональных клеток в ЦНС.

Мы полагаем, что наши исследования позволят понять основные принципы работы и формирования синаптических соединений и программ дифференцировки нейронов и окружающих их клеток в нервной системе. Эксперименты нацелены на идентификацию потенциальных молекулярных мишеней и препаратов, которые могут влиять на пресинаптические процессы и программы дифференцировки клеток, что в итоге приведет к разработке новых подходов для восстановления функций при травмах и патологиях в ЦНС.

Исследования по программе НИР в лаборатории проводятся по четырем основным направлениям (кратко):

1. Анализ молекулярных механизмов, управляющих циклом синаптических везикул при секреции нейроактивных веществ.

На начальных этапах проекта нами был обнаружен и охарактеризован новый актин-зависимый механизм, который отвечает за образования поры, через которую происходит слияние мембраны секреторного пузырька с клеточной мембраной. Было показано, что данный механизм участвует в секреции нейроактивных веществ в нейронах и нейросекреторных клетках. Было доказано, что этот процесс зависит от осмотического давления в клетке. Последующие исследования выявили, что актин-зависимый механизм участвует в образовании новых везикул в процессе эндоцитоза. Мы продолжаем наши исследования в этом направлении. С помощью микроскопии высокого разрешения (STED) мы проводим исследования кинетики этого механизма в живых клетках при прямой оптической регистрации этого процесса и проводим поиск препаратов способных его регулировать. Математическое моделирование также используется для изучения мембранных процессов.

2. Изучение роли белковых конденсатов и фазовых переходов состояния пресинаптических белков в норме и при образовании патологических агрегатов и амилоидных структур в нервных клетках.

В 2020 году мы показали, что фазовые переходы синаптических белков из растворимого состояния в белковый конденсат имеют ключевое функциональное значение для работы центральных синапсов. В исследованиях *in vitro* было показано, что фазовый переход также имеет ключевое значение для образования амилоидов. Результаты наших экспериментов позволяют предполагать, что такие патологические структуры могут возникать в нервных терминалях при нейродегенеративных заболеваниях. Мы исследуем молекулярные механизмы этих процессов, используя модельные системы, в которых функции отдельных синаптических белков нарушаются в результате введения молекул, нарушающих их молекулярные взаимодействия, и с помощью генетических методов.

3. Исследование ранних патологий в центральных синапсах при мутациях митохондриальных генов, которые приводят к возникновению нейродегенеративных заболеваний.

Известно, что целый ряд мутаций митохондриальных генов приводят к возникновению нейродегенеративных заболеваний у человека, например, развитию болезни Паркинсона. Совместно с лабораториями Каролинского Института, Стокгольм, Швеция, с которым у СПбГУ имеется договор о сотрудничестве, были созданы трансгенные мыши, у которых выключение митохондриальных генов селективно

запускается тамоксифеном в сформированных дофаминергических нейронах во взрослом состоянии. Таким образом были созданы экспериментальные модели для изучения форм болезни Паркинсона, в которых участвуют митохондриальные гены. Совместно с исследователями в Каролинском Институте, мы изучаем механизмы и динамику возникновения ранних патологических изменений в ЦНС и в синаптических контактах дофаминергических нейронов в этих модельных системах.

4. Идентификация молекулярных механизмов дифференцировки мультипотентных клеток с целью получения функциональных нервных клеток для замены поврежденных нейронов и глии в ЦНС при травмах.

Мы также изучаем молекулярные механизмы, контролирующие переходные состояния, которые клетки принимают во время эмбрионального развития и при дифференцировке. Мы считаем, что это прольёт свет на то, каким образом происходит переключение программ при дифференцировках различных клеток. Это позволит нам направлять дифференцировку клеток, обладающих свойствами стволовых клеток, в нейроны с функциональными синаптическими соединениями и глиальные клетки. Эти исследования также проводятся в сотрудничестве с лабораториями Каролинского Института.

В 2022 году эксперименты проводились по трем направлениям исследований лаборатории (1-3). Были опубликованы 2 работы в ведущих научных журналах **iScience** и **Frontiers in Molecular Biosciences** (уровень Q1). Кроме того, подготовлены и направлены в журнал **Биологические мембраны** (уровень Q4) 2 статьи (обзор и экспериментальная работа) и 1 статья направлена в журнал **Cell Reports** (уровень Q1). Обзорная статья в журнал **Биологические мембраны** принята к печати. Результаты исследований были представлены в виде стендовых докладов **на ежегодной конференции «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины 2022» ИТБМ СПбГУ**.

Опубликованы:

1. Arpino G, Somasundaram A, Shin W, Ge L, Villareal S, Chan CY, Ashery U, Shupliakov O, Taraska JW, Wu LG. Clathrin-mediated endocytosis cooperates with bulk endocytosis to generate vesicles. *iScience*. 2022 Jan 24;25(2):103809. doi: 10.1016/j.isci.2022.103809. eCollection 2022 Feb 18. PMID: 35198874. (Импакт фактор: 6,10).

2. Brodin L., Milovanovic D., Rizzoli S.O., Shupliakov O. α -Synuclein in the Synaptic Vesicle Liquid Phase: Active Player or Passive Bystander? *Front. Mol. Biosci.*, 18 May 2022; 9:891508. doi.org/10.3389/fmolb.2022.891508. PMID: 35664678. (Импакт фактор: 5,59).

Отправлены в печать:

1. Шишков А. Г., Нифантова Н. В., Коренькова О. М., Сопова Е. С., Бродин Л., Шупляков О. В. BAR белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе. **Биологические мембраны.** (2022) принята в печать. (Импакт фактор: 0,75; Q4).

2. Нифантова Н. В., Шишков А. Г., Онохин К. В. Сопова Е. С., Бродин Л., Шупляков О. В. Негативная регуляция функции динамина синдапином при восстановлении синаптических везикул. **Биологические мембраны.** (2022) направлена в журнал, на рецензии. (Импакт фактор: 0,75; Q4).

3. Brodin L., Vorontsova O., Rees K.A., Sopova E., Winther Å.M.E., Shupliakov O. Dap160-Nwk interaction shapes synaptic vesicles in Drosophila synapses. **Cell Reports** (2022) направлена в журнал, на рецензии. (Импакт фактор: 9,99; Q1).

Участие в конференциях:

1. Сопова Е.С., Коренькова О.М., Шишков А.Г., Нифантова Н.В., Линовская Ю.В., Онохин К.В., Шупляков О.В. Взаимодействие синаптических белков Nwk и Dap160 необходимо для формирования однородной популяции синаптических везикул. **Тезисы VI конференции ИТБМ СПбГУ– 2022, «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины 2022»**, 25-26 июля 2022, (стендовый доклад).

2. Шишков А.Г., Нифантова Н.В., Сопова Е.С., Шупляков О.В. Ранние структурные патологии в митохондриях дофаминергических нейронов при условном выключении гена *Mfn2*. **Тезисы VI конференции ИТБМ СПбГУ– 2022, «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины 2022»**, 25-26 июля 2022, (стендовый доклад).

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

2.1 Проведённые эксперименты по направлению исследований «Анализ молекулярных механизмов выделения нейроактивных веществ и связанных с ними мембранных процессов».

Новые данные были получены в экспериментах по изучению реформирования везикул в результате «bulk» эндоцитоза при клеточной секреции нейроактивных веществ. В рамках проекта нами ранее была разработана технология анализа динамики мембранных процессов при секреции с помощью микроскопии супер-высокого разрешения Stimulated Emission Depletion Microscopy (STED) в живых хромаффинных клетках надпочечников. С помощью STED технологии мы получили возможность изучать в реальном времени динамику мембранных явлений в процессе экзо- и эндоцитоза в живой секреторной клетке [1, 2]. Эти эксперименты, позволили объяснить каким образом формируются мембранные структуры различных типов в процессе секреции в реальном времени. В наших экспериментах в 2022 году было показано, что при интенсивной стимуляции отпочкования клатриновых везикул происходит от больших инвагинаций плазматической мембраны. При этом данные инвагинации остаются связанными с наружной мембраной клетки перемычками, а не отпочковываются полностью, как происходит при классической форме «bulk» эндоцитоза [3]. Таким образом нами было впервые доказано существование промежуточной формы эндоцитоза, при которой классическая форма клатрин-опосредованного эндоцитоза кооперируется с «bulk» эндоцитозом. Эксперименты проводились в сотрудничестве с Национальным Институтом Здоровья (NIH-NINDS, США).

Были проведены эксперименты по исследованию роли F-BAR белков в процессах реформирования везикул в процессе секреции. В экспериментах на модельной системе - нервно-мышечном соединении у дрозофилы, которая позволяет исследовать сложные генетические модификации белков в живых синапсах - исследовалась роль F-BAR белка Nervous-Wreck (Nwk). Предполагается, что он участвует как в клатрин-независимом, «bulk», так и в клатрин-опосредованном эндоцитозе. Ранее в проекте мы обнаружили, что этот белок взаимодействует с белком-скаффолдом Dap160 в результате взаимодействия SH3 доменов белков. Dap160, в свою очередь, взаимодействует с многими эндоцитозными молекулами, а также с белком синапсином, который организует везикулы в кластер в нервных окончаниях [4]. Было показано, что у мутанта, у которого Dap160 не может взаимодействовать с Nervous-Wreck, нарушается механизм контроля размера синаптических везикул. Для подтверждения этого результата мы

провели исследования на мутантах *Nervous-Wreck*, у которых нарушена возможность связываться с *Dap160* и взаимодействовать с плазматической мембраной. Исследована относительная локализация белков в нервных окончаниях с помощью конфокальной микроскопии, STED и электронной микроскопии. В физиологических экспериментах проанализированы функциональные последствия селективного нарушения взаимодействия белков.

В экспериментах с использованием другой модельной системы, разработанной ранее в нашей лаборатории, гигантского аксона миноги, мы исследовали роль F-BAR белка, синдапина, в процессе реформирования секреторных везикул. Мы использовали антитела, которые блокируют взаимодействие SH3 домена белка с ключевым эндоцитозным белком, ГТФазой динамином [5]. Ранее считалось, что синдапин рекрутирует динамин для эффективного отпочкования больших участков синаптической мембраны при высокочастотной стимуляции в процессе «bulk» эндоцитоза. Было обнаружено, что напротив, блокада взаимодействия белков приводит к резкому увеличению образования свободных эндосом при длительной (20 мин) высокочастотной стимуляции (5 Гц). Эти результаты позволяют предполагать, что синдапин секвестрирует динамин на поверхности мембранных инвагинаций и препятствует формированию эндосом при стимуляции. Предполагается, что это может приводить к вышеописанной кооперации «bulk» и клатрин-опосредованного эндоцитоза и более эффективному формированию везикул одинакового размера с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза после завершения высокочастотной стимуляции.

Проводятся дальнейшие исследования локализации синдапина в пресинапсе с помощью микроскопии высокого разрешения для выяснения детальных молекулярных механизмов описанных явлений.

Основные результаты экспериментов, направленных в печать по данному направлению в 2022 году.

2.1.1 Кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза при реформировании секреторных везикул.

ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Считается, что реформирование секреторных везикул происходит в результате двух процессов: клатрин-зависимого эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза, при котором происходит отпочкование больших участков мембраны внутрь клетки в виде эндосом, которые затем разбираются на везикулы с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза (Рис. 1). Исследования, проведенные на ранних этапах проекта, позволили нам предположить существование дополнительных механизмов.

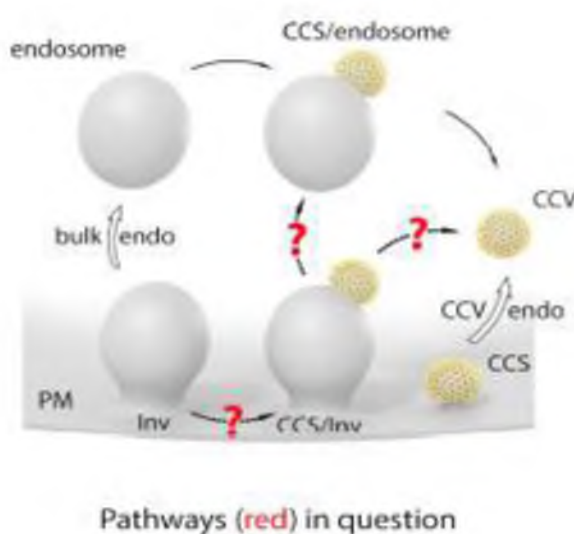


Рис. 1. Схематический рисунок реформирования везикул при секреции биологически активных веществ и нейромедиаторов.

Вопросы на схеме показывают возможные варианты механизмов восстановления везикул, которые исследовались в работе.

Цель исследования. С помощью микроскопии высокого разрешения (STED) и электронной микроскопии изучить динамику и параметры «bulk» эндоцитоза и клатрин-зависимого эндоцитоза и определить возможность участия дополнительных механизмов в реформировании секреторных везикул при секреции активных веществ и нейромедиаторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание объекта исследования

Эксперименты проводили на изолированных хромаффинных клетках бычьих надпочечников. Получение культуры хромаффинных клеток было опубликовано ранее [2, 6] и подробно описывались в предыдущих промежуточных отчетах. Кратко, трансфекция клеток проводилась электропарацией с использованием кита Basic Primary Neurons Nucleofector (Lonza) по протоколу изготовителя. Клетки помещались на покровные стекла покрытые ламинином (Neuvitro) и инкубировались при 37°C и использовались в течение 5 дней. Искользованные реактивы и плазмиды указаны в **Таблице 1** (см. раздел 5. Приложения). Конструкт RH-mNeonGreen получали в результате замещения EGFP tag в RH-EGFP, полученной от Dr. Tamas Balla, mNeonGreen от Allele Biotechnology [2]. Готовый конструкт клатрин mTFP1 покупали у Addgene. Стимуляцию клеток проводили раствором с повышенным содержанием K^+ (70-90 mM) и с помощью внутриклеточной стимуляции. Для визуализации эффектов в живых клетках использовали конфокальную и STED микроскопию (Рис. 2). Электрофизиологическая регистрация в конфигурации «whole-cell» и стимуляция клеток проводилась как описано ранее [6]. Технология также подробно описана в предыдущих отчетах (см. также Рис. 2).

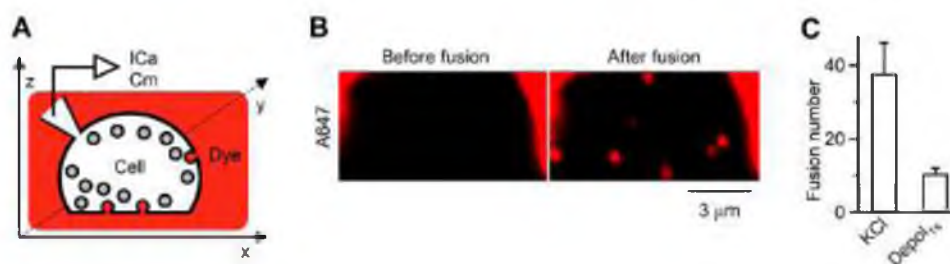


Рис. 2. Визуализация слияния везикул, вызванного раствором с повышенным содержанием K^+ (90 mM, 90 сек) и деполяризацией в течении 1 сек.

Описание к рисунку 2:

- A: схема эксперимента с «whole-cell» регистрацией токов I_{Ca} и ёмкости (C_m) с одновременной микроскопией (конфокальной или STED) поверхности клетки в растворе, содержащем красный флюоресцентный краситель.
- B: конфокальные изображения поверхности клетки в растворе, содержащем Alexa 647. Слева изображение до стимуляции; справа – 0.5 сек после деполяризации от -80 to +10 мВ ($depol_{1s}$). Видны красные точки в местах образования поры пузырьков с раствором.
- C: График, показывающий число слияний пузырьков при аппликации 90 mM KCl в течении 90 сек (12 клеток) и при деполяризации $depol_{1s}$ (60 клеток).

Конфокальная микроскопия. Измерения проводились на инвертированном конфокальном микроскопе (TCS SP5II, Leica, Германия, с помощью объектива 100 x 1.4 NA под масляной иммерсией как описано ранее [6]. Изображения собирались каждые 10-33 мсек, 100-200 нм над покровным стеклом.

STED микроскопия. Микроскопия высокого разрешения STED осуществлялась с помощью Leica TCS SP8 STED 3Å~ микроскопа с использованием объектива 100 x 1.4 NA HC PL APO CS2 под масляной иммерсией и LAS-X программным обеспечением [6]. При использовании двух флюорофоров, например PH-EGFP и A532, клетки возбуждались на 592 нм с помощью STED depletion beam и флюоресценция регистрировалась на 490-530 нм и 545-587 нм. В случае использования комбинации PH-mNeonGreen и FFN511 флюоресценция регистрировалась на 510-587 нм и 447-490 нм, соответственно.

Разрешение STED при сканировании PHG было ~60 нм по оси X- и Y-axis (параллельно покровному стеклу), и ~150-200 нм по оси Z. STED изображения проходили деконволюцию с использованием программного обеспечения Huygens (Scientific Volume Imaging), и анализировались с помощью программ Image J и LAS X (Leica).

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии клетки стимулировались раствором с повышенным содержанием калия (70 мМ) в течении 90 сек. Клетки фиксировались в смеси 2% глутаральдегида, 2% параформальдегида и 4% таниновой кислоты на 0.1мМ какодилатном буфере (pH 7.4) в течение 15 мин. Заливка в смолу Embed-812 (EMS) производилась стандартными методами. Ультратонкие срезы исследовались в микроскопе JEOL JEM-200CX и фотографировались при увеличении 73.000x с помощью камеры AMT XR-100 CCD.

Для быстрой заморозки суспензий клеток использовали стандартный протокол для аппарата EM ICE заморозки под высоким давлением (Leica Microsystems) с последующей заливкой в смолу Embed-812 (EMS). Ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме EM UC7 (Leica Microsystems) и исследовались на микроскопе JEOL JEM1400.

Получение платиновых реплик поверхности внутриклеточной мембраны клеток для электронной микроскопии. Клетки стимулировали погружением в раствор с высоким содержанием K^+ на 45 сек. Раствор содержал 70 мМ KCl, 60 мМ NaCl, 10 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES, 2 мМ $CaCl_2$, и 1 мМ $MgCl_2$ (pH 7.3), затем переносили в раствор буфера с составом 70 мМ KCl, 30 мМ HEPES, 5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ EGTA (pH 7.4),

разрушали целостность поверхностной мембраны и быстро фиксировали в 2% растворе параформальдегида, в том же буфере. Затем стекла переносили в раствор 2% глутаральдегида на 20 мин при 4°C и 0.1% раствор таниновой кислоты на 20 мин. После этого проводили дегидрирование в спиртах и сушку в критической точке. Препараты покрывали платиной и углеродом как описано ранее [7]. Реплику отделяли от препарата согласно протоколу [7] и помещали на сетки (Ted Pella 01802-F, 75 меш), покрытые формваровой плёнкой с углеродным напылением. Сбор изображений проводили на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 1400 при увеличении 15 000x. Изображения представлены в работе инвертированными.

Анализ данных. Все данные представляли как средние \pm стандартное отклонение. Каждое изменение проводилось как минимум в 4х клетках на культуру от двух различных надпочечников. Для сравнения средних использовался t-test или ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для детального структурного анализа мембранных структур, формирующихся в хромаффинных клетках при реформирования секреторных везикул, производилась быстрая заморозка клеток в процессе секреции. Препараты заливались в смолу и исследовались с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Для объемной визуализации структур на внутриклеточной поверхности клеток изготавливали реплики с поверхности мембраны после быстрого разрушения клеток с последующей фиксацией в альдегидах. С использованием обоих подходов в дополнение к классическим формам эндоцитоза – клатрин-опосредованного эндоцитоза с поверхности внутренней мембраны и «bulk» эндоцитоза – удалось обнаружить массовое формирование клатриновых с поверхности мембранных инвагинаций. Данные структуры показаны на Рисунке 3.

Для изучения динамики формирования данных структур и процесса отпочкования клатриновых пузырьков проводилась STED микроскопия в живых хромаффинных клетках, погруженных в раствор. При этом мембрана клетки метилась в результате повышенной экспрессии фосфолипазы C дельта РН-домена конъюгированного с mNeonGreen (показана на Рис. 4. зеленым). Клатрин метился в результате трансфекции клеток конструктором клатрин mTFP1 (показан на Рис 4. красным). Это позволило провести оптическую регистрацию процесса формирования и отпочкования клатрин-окаймленных ямок с поверхности инвагинации в реальном времени. Динамика процесса отпочкования везикул показана в приложении к статье.

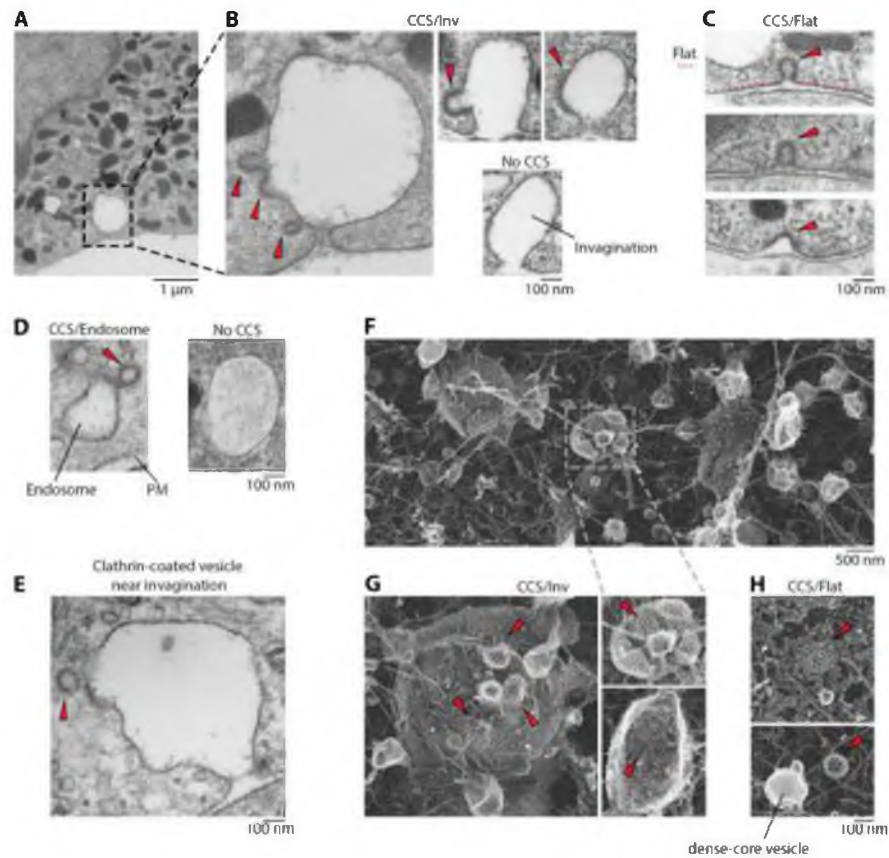


Рис. 3. Промежуточные эндоцитозные структуры с клатрин-окаймленными ямками на поверхности мембранных инвагинаций и классические формы эндоцитоза при реформировании секреторных везикул в хромаффинных клетках.

Описание к рисунку 3:

- А-Е, фотографии, полученные с помощью трансмиссионного электронного микроскопа из клеток после деполяризации раствором с повышенным содержанием K^+ в течении 90 сек.
- А, малое увеличение; выделенный участок показан на В на большем увеличении.
- ССС (клатриновые структуры) на В отмечены красными треугольниками.
- С, клатрин-окаймленная ямка на внутренней поверхности клеточной мембраны
- D, эндосомы с клатрин-окаймленными ямками и без.
- Е, клатрин-окаймленная везикула в непосредственной близости от мембранной инвагинации.
- F-H, Фото платиновых реплик внутренней поверхности мембраны клеток после 45 сек стимуляции раствором с повышенным содержанием KCl (70 мМ).
- F, малое увеличение (выделенный участок увеличен на G).
- G, примеры мембранных инвагинаций с ССС (отмечены треугольниками).
- H, примеры ССС на плоской поверхности плазматической мембраны.

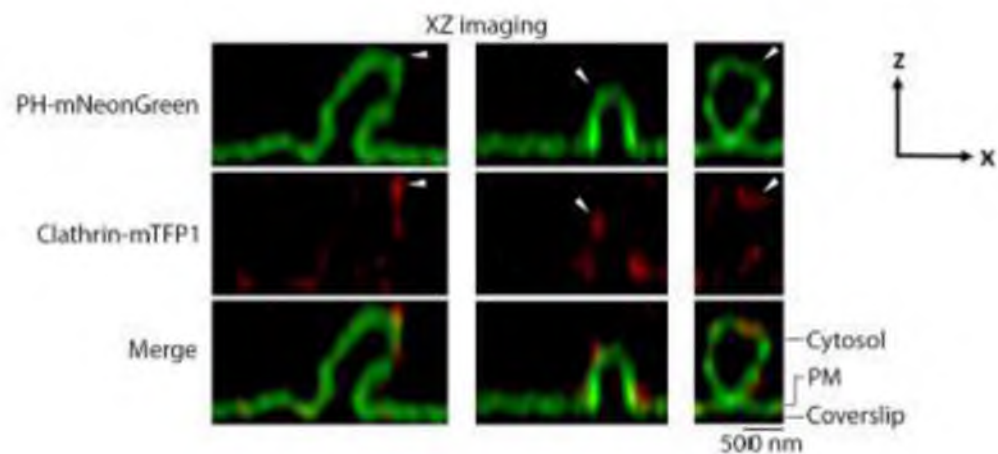


Рис. 4. STED изображения PHmNG (зеленый), Clathrin-mTFP1 (красный), полученные при сканировании клетки в плоскости XZ.

Слияние изображений показывает, что 3 клатриновые везикулы (стрелки) формируются на поверхности мембранной инвагинации. Указано положение покровного стекла по отношению к цитозоллю и мембране клетки. Динамика процесса отпочкования везикул имеется в приложении к статье.

Был проведен количественный анализ параметров и характеристик инвагинаций с клатрин-опосредованными ямками. Результаты представлены на Рисунке 5.

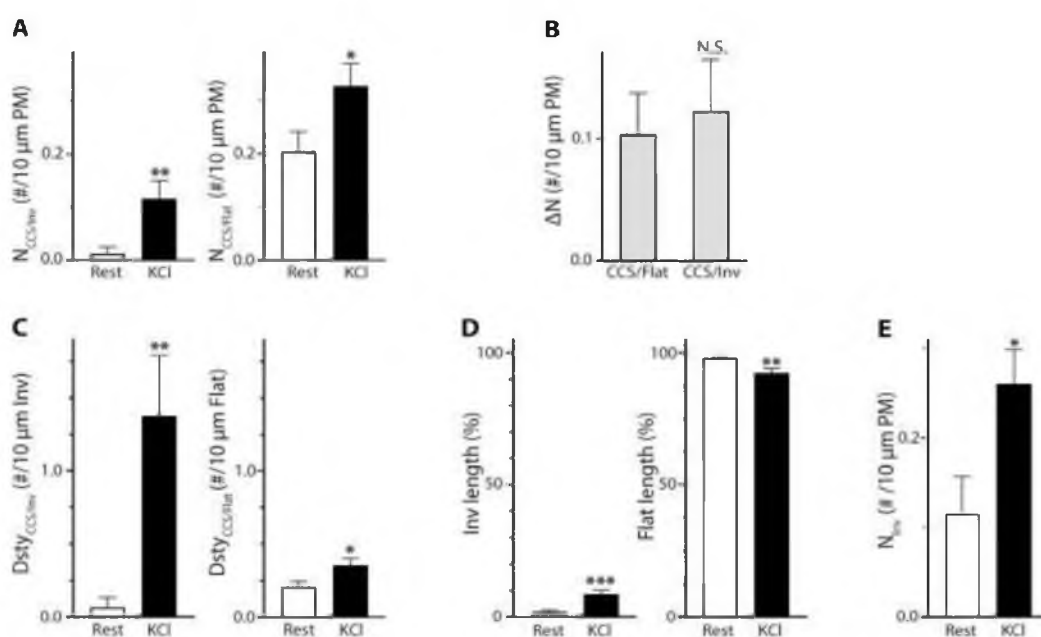


Рис. 5. Количественные характеристики инвагинаций с клатрин-опосредованными ямками.

Описание к рисунку 5:

- **А**, NCCS/Inv [CCS/Inv число # на 1мкм ПМ] и NCCS/Flat (CCS/Flat число # на 10 мкм ПМ) в состоянии покоя (Rest (состояние покоя), 40 срезов, 3 железы) или при аппликации в течении 90сек KCl (70 мМ) (40 срезов, 9 желез). Данные ТЭМ представлены как среднее ± стандартная ошибка; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, N.S.: $p > 0.05$; Student's t-test (также от **А** до **Е**).
- **В**, увеличение числа NCCS/Inv (NCCS/Inv,# на 1мкм ПМ) и NCCS/Flat (NCCS/Flat) при аппликации KCl.
- **С**, DstySCC/Inv (CCS/Inv число # на 10мкм ПМ) и DstyCCS/Flat (CCS/Flat на 10 мкм ПМ) at Rest (40 срезов) или KCl (40 срезов).
- **Д**, Инвагинации (Inv, слева) или Плоская ПМ (справа) % длинны в состоянии покоя (40 срезов) или при аппликации KCl (40 срезов). % нормализован к величине длины ПМ.
- **Е**, Число инвагинаций (NInv, на 10 мкм ПМ) at Rest (40 срезов) или при аппликации KCl (40 срезов).

Таким образом мы показали, что при реформировании секреторных везикул задействуется дополнительная промежуточная стадия (Рис. 6), на которой происходит кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза.

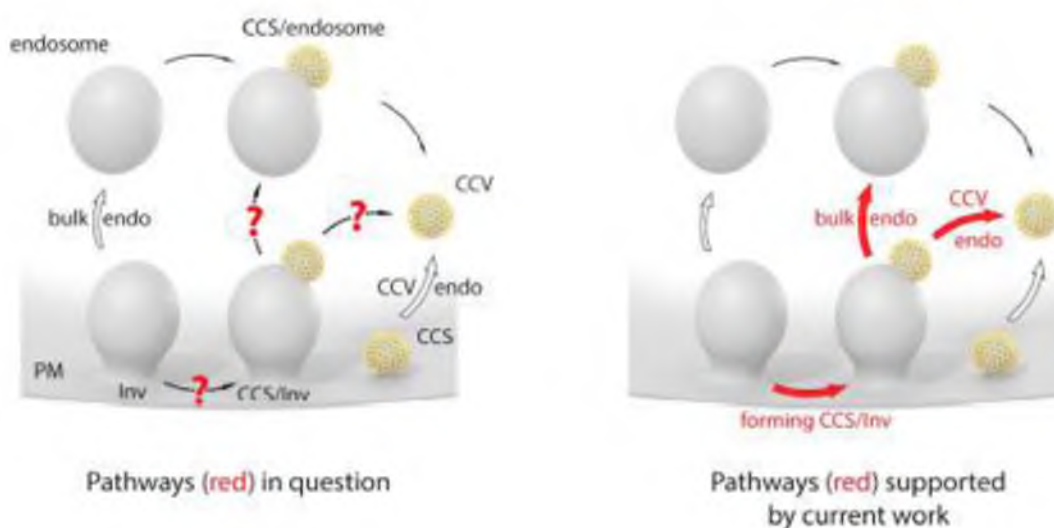


Рис. 6. Схематическое изображение новой стадии эндоцитоза при реформировании секреторных везикул, на которой происходит кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза. Справа показана традиционная модель; слева – новая модель. CCV-клатрин-окаймленные везикулы.

ВЫВОДЫ

1. В реформировании секреторных везикул в процессе секреции участвует дополнительная промежуточная стадия, на которой происходит кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза.

2. Клатрин-опосредованный эндоцитоз происходит преимущественно на мембранных инвагинациях. Это позволяет получать большее количество везикул одинакового размера в процессе восстановления и, соответственно, обеспечивать квантовый характер выделения биологически активных веществ при секреции.

2.1.2 Взаимодействие белков Dap160-Nwk контролирует размеры синаптических везикул.

ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нейромедиаторы в синаптических соединениях выделяются одинаковыми порциями или квантами, что обеспечивает нормальную функцию нервных окончаний. Одинаковый размер синаптических везикул в синапсах является одним из ключевых факторов, контролирующих размер кванта. Формирование синаптических везикул обеспечивается различными механизмами эндоцитоза, в которых работают целый ряд белков и сигнальных молекул, которые контролируют кривизну мембраны. К таким молекулам относятся BAR белки, которые делятся на 3 группы: N-BAR, F-BAR и I-BAR. Из широкого разнообразия BAR белков выделяют три группы: N-BAR, F-BAR, I-BAR. N-BAR белки при димеризации образуют заряженную поверхность в форме полумесяца, способную стабилизировать наибольшую кривизну мембраны [8]. Особенностью BAR домена N-BAR белков является N-терминальная амфипатическая спираль, которая впервые была описана для белка амфифизина [9]. Белки, стабилизирующие меньшую кривизну поверхности мембраны, были названы по именам характерных представителей группы Fes/CIP4 homology-BAR белков, сокращенно F-BAR белками [10, 11]. Белки, димеры которых стабилизируют обратную кривизну мембраны, получили название Inverse-BAR или I-BAR [12-14]. Каждая группа белков способна контролировать определенную кривизну мембраны (см. обзор по BAR белкам далее в отчете).

В данном проекте мы исследовали функциональную роль молекулярных взаимодействий F-BAR белка Nervous Wreck (NWK) у дрозофилы, который является гомологом белка FCHSD2 у млекопитающих. Nervous Wreck – это F-BAR белок, который обеспечивает контроль кривизны клеточной мембраны при эндоцитозе [15, 16]. Нарушение функций гомологов синаптических F-BAR белков у млекопитающих

связывают с рядом патологических состояний. NWK активирует WASp (Wiskott–Aldrich syndrome protein)/Arp2/3 (actin-related белок 2/3)-активируемую полимеризацию актина. Основным взаимодействующим партнером NWK, является эндоцитозный белок скаффолд DAP160.

Эксперименты по этой тематике в рамках проекта начались в 2020 году. Тогда были получены первые мутантные линии *Dap160* и данные о нарушениях формирования везикул в синапсах. Предварительные данные были опубликованы в виде тезисов. Исследования были продолжены, чтобы довести работу до уровня полноценной статьи. В 2022 году мы провели исследования на мутантах *Nervous-Wreck*, у которых нарушена возможность связываться с Dap160 и взаимодействовать с плазматической мембраной. Исследована относительная локализация белков в нервных окончаниях с помощью конфокальной микроскопии, STED и электронной микроскопии. В физиологических экспериментах проанализированы функциональные последствия селективного нарушения взаимодействия белков. В результате был получен набор данных и необходимые контроли для публикации в журнале уровня **Cell Reports** (Q1).

Цель исследования: определить функциональную роль взаимодействия F-BAR белка *Nervous Wreck* с белком скаффолдом DAP160 при реформировании везикул при синаптической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание объекта исследования, генетические линии и технологии. UAS-*nwk* конструкторы изготавливались с помощью Gateway технологии (Invitrogen, Inc.) в pBI-UASC-EGFP. В предыдущие годы были созданы и описаны линии: *dap160* null, *dap160* ΔAB и *dap160* cDNA full-length rescue. Для генерации *dap160* rescue мутанта, у которого SH3C domain отсутствует (dC), был создан геномный конструктор в результате введения ПЦР амплифицированного участка даунстрим последовательности SH3C домена в pUAST-*dap160* wt вектора, линейаризованного с помощью PshAI и XhoI. При этом использовались следующие праймеры, содержащие PshAI и XhoI последовательности (ATAGACCCATGTCACGCACCTCTTCTGACAAGGTCATTGCTCTCTATCCGTAC и GATCCTCTAGAGGTACCCTCGAGC). Конструктор ΔC содержал делецию в 432 нуклеотида. ΔC мухи были сгенерированы BestGene Inc. Экспрессия *dap160* без SH3C домена на фоне *dap160* null у мух была подтверждена генотипированием. Также использовался мутант *dap160*¹³⁰, у которого *dap160* экспрессируется без SH3C и SH3D доменов.

В 2022 году исследования проводились на линиях, в которых нарушения функции находились со стороны *nwk*. Это линии *nwk* null, rescue мутанты *nwk* BAR и *nwk* ΔF-BAR (ΔF). Кроме того, использовались мутанты *Syn^{CS97}* (*Synapsin*-null линия *Syn^{CS97}* была подарена д-ром E. Buchner) и *shibire^{ts1}* из Bloomington Stock Центра.

Иммунопреципитация и пулдаун эксперименты. Для биохимических экспериментов использовался экстракт белков из голов *Drosophila*. Экстракт (DNE) получали при гомогенизации изолированных голов в IP буфере (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% NP40; pH 7.2) с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma). Детальное описание биохимических процедур опубликовано ранее [4].

Антитела. Поликлональные антитела из кролика и морской свинки против Dap160 1:500 и 1:1000, соответственно [17]; Мышиные anti-dynamin, 1:300 (clone 41; BD Biosciences); мышиные anti-Brp, 1:100 [18]; из морской свинки anti-Eps15, 1:1000 [17]; кроличьи anti-synaptotagmin, 1:1000 [19]; мышиные anti-synapsin, 1:25 (University of Iowa Hybridoma Bank) кроличьи anti-Nwk, 1:1000 [20], кроличьи anti-GFP 1:500 (598, MBL International, Woburn, MA), мышиные anti-CSP, 1:100 (6D6), [21], мышиные anti-AP180 antibody, 1:100 (подарок от Dr. Bing Zhang) and козы anti-HRP конъюгированные к DyLight649 или к FITC, 1:400 (Jackson Immunoresearch). Для иммуноблоттинга антитела использовались в концентрации в 10 раз ниже. Кроличьи антитела anti-Dap160, Eps15 и NWK были использованы для иммунопреципитаций. Мышиные моноклональные антитела anti-actin (#1501, clone C4, Millipore) были использованы как описано ранее [22].

Электронная и конфокальная микроскопия. Исследования синапсов производилось на личинках на стадии 3rd instar, как было описано в наших предыдущих исследованиях [22].

Анализ данных. Изображения синаптических проекций и синапсов анализировались с помощью программы Image J. Все данные представляли как средние ± стандартное отклонение. Для сравнения средних использовался t-тест или ANOVA тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было показано, что белок-скаффолд Dap160 взаимодействует с NWK с помощью SH3C домена в дефосфорилированном состоянии. Иммунопреципитация (Рис. 7 слева сверху) из экстракта голов дрозофилы с помощью антител к NWK в контрольных условия. Иммунопреципитации (справа сверху) в присутствии фосфатазы (CIP) и в присутствии Ca²⁺ и АТФ (АТР). Организация кассеты SH3доменов у Dap160. Pull-down

эксперимент, который показывает, что только SH3C участвует во взаимодействии с NWK.

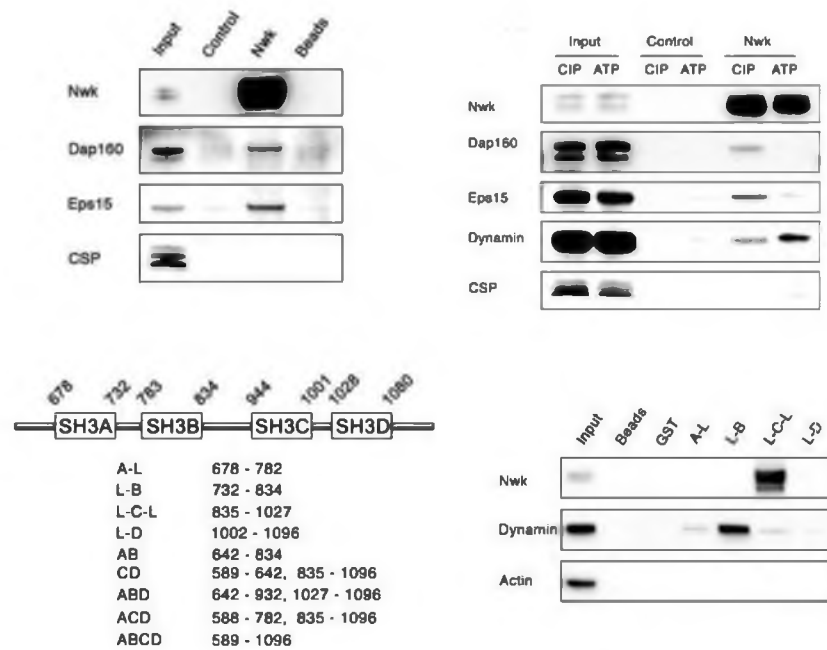


Рис. 7. Dap160 взаимодействует с NWK в дефосфорилированном состоянии с помощью SH3C домена.

На Рисунке 8 показаны конфокальные изображения нервно-мышечных синапсов, меченных с помощью иммуногистохимии антителами против Dap160 и NWK у 3-instar личинок дрозофилы. Dap160 и NWK в значительной степени (>80%) колокализуются при стимуляции. У dC мутанта колокализация нарушается и составляет < 35%.

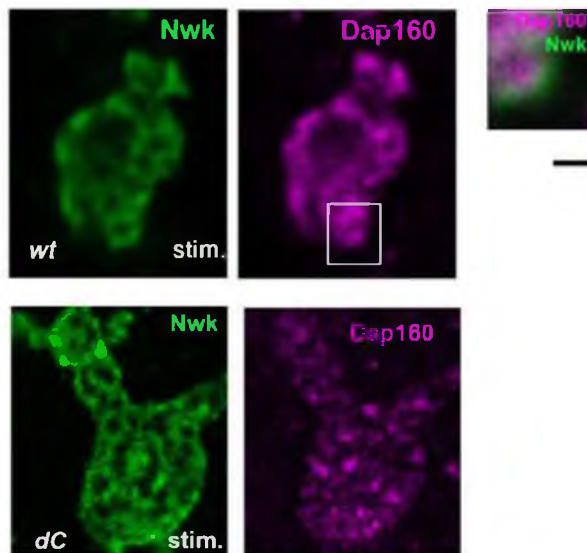


Рис. 8. Нарушение колокализации Dap160 у dC мутанта.

В нервно-мышечных соединениях у мутанта *dC* и *dF-BAR* синаптические везикулы имеют увеличенный диаметр (Рис. 9).

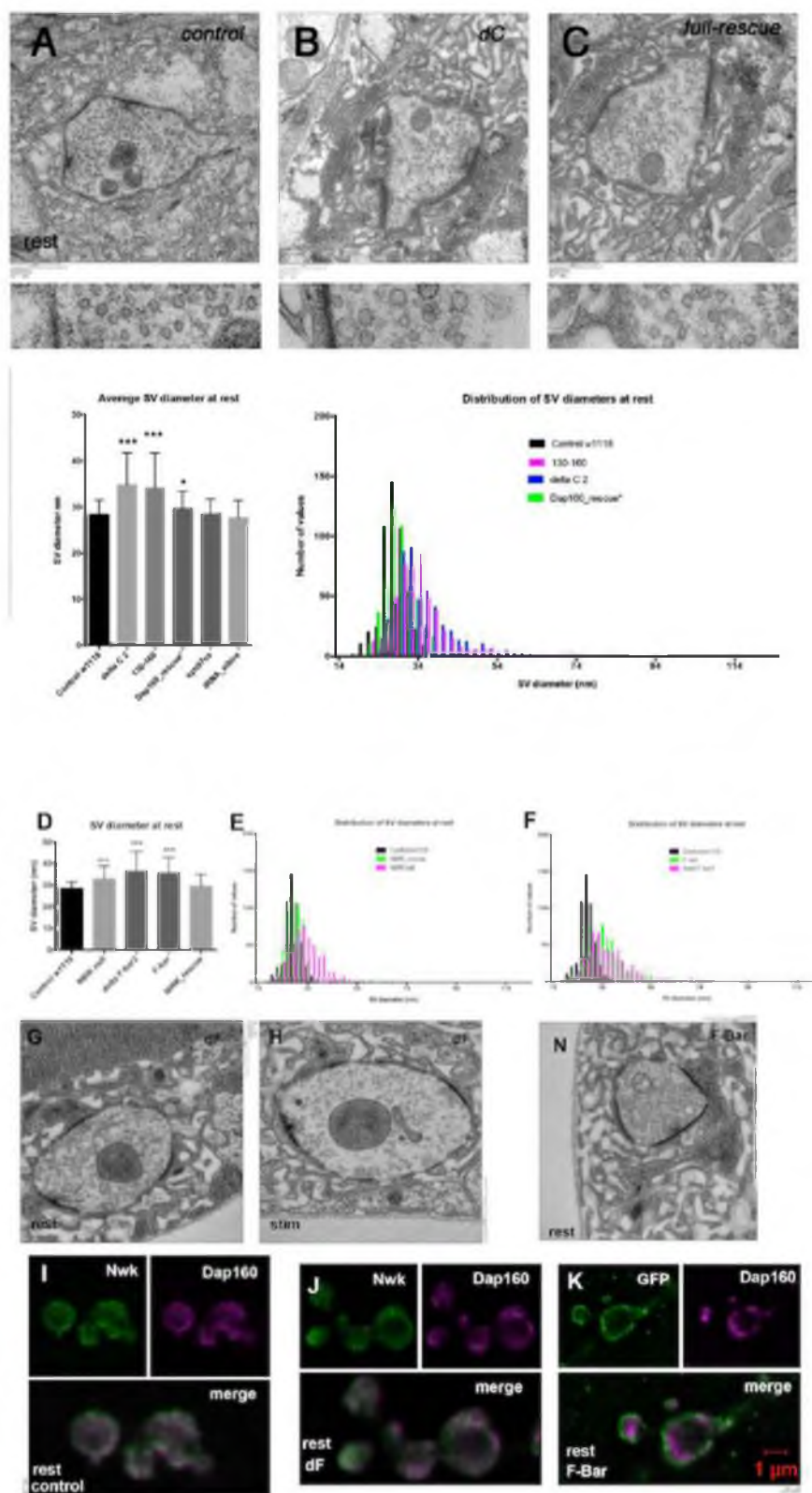


Рис. 9. Синаптические везикулы в нервно-мышечных соединениях у мутанта *dC* и *dF-BAR* и локализация *Dap160* и *Nwk* у мутантов *nwk*.

Описание к рисунку 9:

- A-B: Фото нервно-мышечных соединений 3-instar личинок дрозофилы у контрольной линии, мутанта *dC*, и *full-rescue* линии. Графики показывают статистический анализ диаметров везикул, у мутанта *dC* и контрольных линий.
- D: График показывают статистический анализ диаметров везикул, у мутанта *mwk* null, *dF*, *F-BAR*, *mwk* full rescue, и контрольной линий.
- E,F: Графики показывают распределения диаметров везикул, у мутанта *mwk* null, *dF*, *F-BAR_GFP*, *mwk* full rescue, и контрольной линий
- G,H,N: Фото нервно-мышечных соединений 3-instar личинок дрозофилы у *dF*, *F-BAR_GFP* линий.
- I,J,K: Конфокальные микрофотографии локализации *Dap160* и *Nwk* в нервных терминалях у мутантов *dF*, *F-BAR* и контрольной линии. У мутанта *dF* наблюдается полная колокализация белков. У *F-BAR_GFP* мутанта, *F-BAR_GFP* локализован на плазматической мембране.

Вызванные и миниатюрные потенциалы в нервно-мышечных соединениях у 3-instar личинок дрозофилы у контрольной линии (Рис. 10, черные трейсы) и у мутанта *dC* (Рис. 10, желтые трейсы). Графики показывают статистический анализ амплитуды и частоты миниатюрных потенциалов ($P < 0.05$) и уровень падения амплитуды вызванных потенциалов при ритмической стимуляции с частотой 10 Гц.

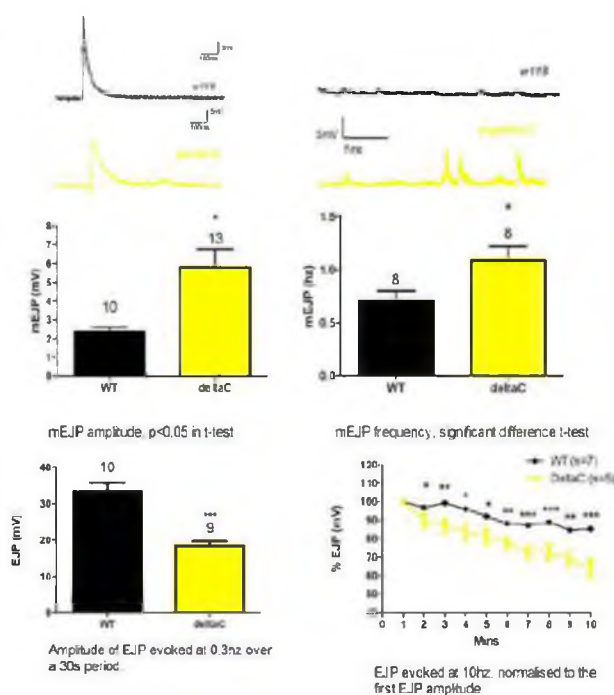


Рис. 10. Миниатюрные потенциалы в нервно-мышечных соединениях у мутанта *dC* имеют большую амплитуду.

ВЫВОДЫ

1. Наши эксперименты показывают, что рекрутирование F-BAR белка Nwk с помощью скаффолд-белка Dap160 к мембране формирующегося синаптического пузырька в процессе эндоцитоза является важным этапом формирования однородной популяции синаптических везикул при синаптической активности.

2. Nwk меняет свою локализацию в нервной терминали при синаптической активности. В состоянии покоя Nwk локализуется в периактивной зоне синапса на границе кластера синаптических везикул. Взаимодействие с SH3C доменом Dap160 перемещает Nwk в область пресинаптической мембраны, где происходит реформирование синаптических везикул.

3. Взаимодействие между двумя белками регулируется фосфорилированием. У мутантов, у которых Dap160 лишен SH3C домена, рекрутирования Nwk не происходит. При нарушении взаимодействия между Dap160 и Nwk, а также у мутантов, у которых в структуре Nwk отсутствовал F-BAR домен, позволяющий белку связываться с пресинаптической мембраной, синаптические везикулы в нервно-мышечных синапсах имели различные диаметры. Восстановления функции при введении только F-BAR, у rescue мутанта nwk BAR, не происходит.

4. При синаптической активности при нарушении взаимодействия Dap160 и Nwk происходит нарушение синаптического цикла и реформирования синаптических везикул.

5. Электрофизиологические эксперименты выявили нарушения в синаптической передаче, которые коррелировали со структурными изменениями в нервно-мышечных синапсах.

2.1.3 Исследование роли F-BAR белка синдапина в «bulk» эндоцитозе. Негативная регуляция функции динамина синдапином при восстановлении синаптических везикул.

ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные литературы указывают, что F-BAR белок синдапин играет важнейшую роль в процессах клатрин-независимого эндоцитоза в синапсах, таких как супербыстрый эндоцитоз и «bulk» эндоцитоз. В геноме млекопитающих присутствуют три гена F-BAR белка синдапина (PACSIN1-3), кодирующих три его изоформы – синдапины 1-3. Синдапин 1 экспрессируется исключительно в ЦНС и аккумулируется в нервных окончаниях. Синдапин 2 обнаруживается во всех тканях и органах. Экспрессия

синдапина 3 наиболее высока в скелетной и сердечной мускулатуре, но также выявляется в легких, почках, мозге, плаценте, поджелудочной железе [23].

Мономер синдапина 1 включает F-BAR домен, переменный участок и C-концевой SH3 домен. Рентгеноструктурный анализ показал, что в целом структура F-BAR домена синдапина схожа с таковой у других F-BAR белков. F-BAR домен у димера синдапина имеет меньшую кривизну поверхности, чем у N-BAR доменов димеров эндофилина и амфифизина. На границе центрального и дистального участков F-BAR домена синдапина также находятся гидрофобные петли, позволяющие синдапинам 1 и 2 активно изменять кривизну мембраны [24, 25].

Было продемонстрировано, что для протекания супербыстрого эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза необходимо не только присутствие функционально активного синдапина, но и его взаимодействие с ГТФ-азой динамином 1 [5, 25]. Условием этого взаимодействия является дефосфорилирование динамина 1 со стороны Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой фосфатазы кальциневрина [3]. Было высказано предположение, что синдапин рекрутирует динамин для последующего срезания мембранных инвагинаций с поверхности мембраны [3]. В 2022 году мы попытались выяснить роль данного взаимодействия в прямом эксперименте на модельной системе - гигантский ретикулоспинальный синапс миноги, разработанной ранее в нашей лаборатории [26, 27]. Мы блокировали SH3 домен синдапина с помощью антител в живом синапсе и исследовали эффекты этой блокады на цикл синаптических везикул при высокочастотной стимуляции аксона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание объекта исследования

Эксперименты проводились на речных миногах (*Lampetra fluviatilis*). Модельная система – гигантский синапс миноги- была разработана в нашей лаборатории для исследования пресинаптических механизмов. Модель позволяет вводить активные вещества непосредственно в зону синапса. Препарат изолированного мозга миноги приготавливался по ранее описанной методике [26, 27].

Основные реактивы

Для микроинъекций использовали Fab-фрагменты антител против SH3 домена синдапина миноги. Очистка и тестирование Fab-фрагментов на специфичность были опубликованы ранее [5]. В контрольных экспериментах, для микроинъекций также использовали нейтральные кроличьи IgG в той же концентрации.

Микроинъекции и электронная микроскопия

Микроинъекции Fab-фрагментов антител и нейтральных IgG в гигантский синапс миноги проводили по ранее описанной методике (Evergren et al., 2007; Gad et al., 2000; Pechstein et al., 2010). Для визуализации инъекций антитела метились Alexa 488, как описано ранее [5]. Инъекции проводили на трех изолированных препаратах. После микроинъекций препараты фиксировали в 3% глутаральдегиде, 4% таниновой кислоты на 0,1 М какодилатном буфере (pH=7,4) и заливали в Dugciran ACM (Fluka) согласно прилагаемой инструкции. Серийные ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме Leica Ultracut UTC ultramicrotome (Leica) и исследовали в микроскопе Tecnaï 12 при 80 кВ (ThermoFisher Scientific). 3D реконструкции синапсов проводили с помощью программы Amira (ThermoFisher Scientific).

Статистическая обработка результатов.

Выборку синапсов (n) получали из трёх аксонов в каждом случае. Для подсчета структур использовали три центральных среза или серии срезов на толщину всей активной зоны синапса (1мкм). В последнем случае проводилась полная реконструкция эндосом и мембранных инвагинаций на серийных срезах для последующих подсчетов и статистического анализа. Сравнения средних использовали Student's t-test. Статистический анализ данных проводился с помощью программы GraphPad Prism 9.0 (GraphStat Software, San Diego, CA, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутриклеточные микроинъекции в гигантские ретикулоспинальные аксоны миноги проводили с помощью микроэлектродов. После введения антител аксоны стимулировали с частотой 5 Гц в течение 20 мин. Для миноги данная частота является физиологической, поскольку регистрируется в аксонах при инициации локомоторной активности.

Ультраструктурный анализ синапсов обнаружил пятикратное увеличение эндосомо-подобных структур на центральных ультратонких срезах синапсов в аксонах инъецированных FАВ фрагментами антител против SH3 домена синдапина по сравнению с не инъецированными аксонами в том же препарате или в аксонах инъецированных нейтральными кроличьими IgG (P <0.001; n=11 для каждого случая). Достоверных различий в количестве эндосомо-подобных структур в не инъецированных синапсах и синапсах инъецированных нейтральными кроличьими IgG не наблюдали (P >0.05; n=11 для каждого случая).

Для выяснения природы эндосомо-подобных структур мы провели их трехмерную реконструкцию синапсов по серийным срезам с помощью программы Amiga. Для каждого случая было реконструировано три синапса. Результаты показали, что основная часть профилей представляют собой свободные эндосомы. На мембранной поверхности многих из них наблюдали клатрин-окаймленные ямки, что указывает, что в их состав входит мембрана синаптических везикул. Количественный анализ показал достоверное (5и кратное, $P < 0.001$, $n=3$) увеличение числа свободных эндосом в реконструированных синапсах, инъецированных FAV фрагментами антител. (Рис. 11).

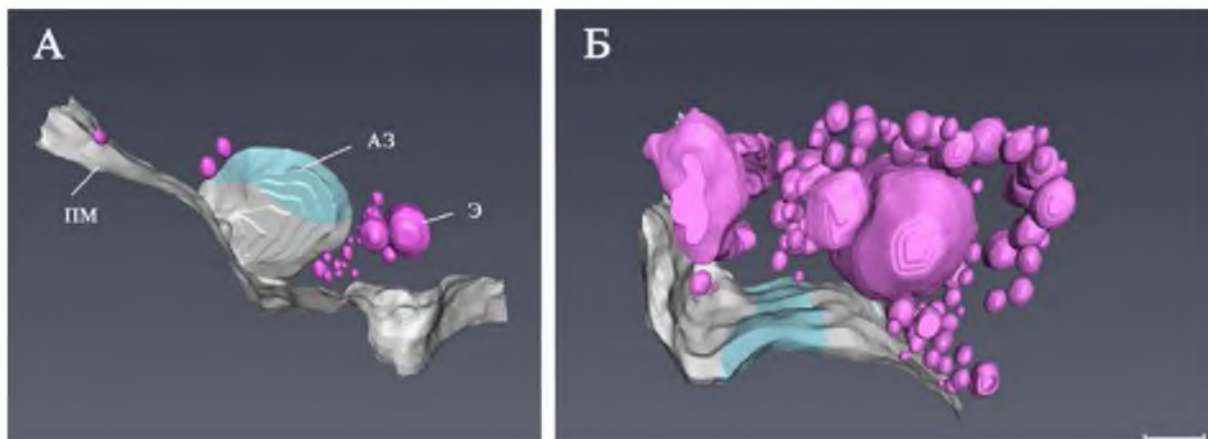


Рис. 11. Реконструкция свободных эндосом у активной зоны в двух синапсах, стимулированных с частотой 5 Гц в течение 20 мин, из не инъецированного аксона и аксона, в который были введены FAV фрагменты антител против SH3 домена синдапина. Оба аксона стимулировались одинаково. Видно значительное увеличение свободных эндосом в инъецированном синапсе. пм- пресинаптическая мембрана, аз – активная зона синапса, э- свободные эндосомы. Остальные синаптические структуры не показаны. Масштаб: 0,5 мкм.

Полученный результат указывает, что SH3 домен синдапина не рекрутирует динамин для последующего отпочкования эндосом от поверхности мембраны, как считалось ранее [3]. Увеличение числа свободных эндосом можно объяснить активностью других белков, например, амфифизина, который может доставлять свободный динамин к месту отпочкования мембранных структур. Полученный результат, позволяет взглянуть на функцию синдапина по-новому и предположить иную роль этого белка в его взаимодействии с динамином. Мы предполагаем, что синдапин является негативным регулятором ГТФазы динамина. Белок в комплексе с динамином удерживает динамин на поверхности больших мембранных инвагинаций, к которым прикрепляется с помощью F-BAR домена. Это позволяет локально увеличить

концентрацию динамина на их поверхности. При этом, как показали недавние исследования, возможен переход белков в жидкую фазу [28]. В результате, при фосфорилировании и разрушении комплекса синдапин-динамин, динамин может активно участвовать в клатрин-опосредованном эндоцитозе на поверхности эндосом, способствуя, таким образом, эффективному реформированию везикул одинакового размера. Можно также предположить, что уменьшение вероятности отпочкования мембраны, содержащей синаптические белки позволяет удержать мембрану, содержащую белки необходимые для реформирования везикул в непосредственной близости от активной зоны, препятствуя, таким образом, возможному аксональному транспорту этой мембраны из зоны синаптического контакта.

ВЫВОДЫ

Блок SH3 домена синдапина с помощью антител приводит к увеличению свободных эндосом в синапсах при высокочастотной активности. Это позволяет предположить, что синдапин является негативным регулятором функции ГТФазы динамина в синапсах при высокочастотной стимуляции.

Проводятся дальнейшие исследования для выяснения детальных молекулярных механизмов обнаруженных эффектов. Планируется довести данную работу до уровня журнала Q1 в 2023 году.

2.2 Проведённые исследования по теме «Изучение роли белковых конденсатов и фазовых переходов состояния пресинаптических белков в норме и при образовании патологических агрегатов и амилоидных структур в нервных клетках».

На основании данных, полученных нашей лабораторией в рамках настоящего проекта и литературных данных была выдвинута гипотеза, что BAR белки являются регуляторами фазовых переходов жидкость-жидкость (англ. liquid-liquid phase transitions), которые приводят к образованию белковых конденсатов, участвующих в синаптическом везикулярном цикле в нервных окончаниях. В журнал Биологические мембраны был написан обзор: Шишков А. Г., Нифантова Н. В., Коренькова О. М., Сопова Е. С., Бродин Л., Шупляков О. В. BAR белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе. Биологические мембраны. (2022).

В лаборатории продолжаются эксперименты по анализу молекулярных механизмов фазовых переходов жидкость-твёрдое тело (англ. liquid-solid state

transitions), лежащих в основе формирования патологических белковых агрегатов, которые обнаруживаются в нейронах при болезнях Альцгеймера и Паркинсона. На основании данных, полученных в проекте и литературных данных, нами выдвинута гипотеза, что в основе образования патологических белковых агрегатов, содержащих синуклеин, лежат нарушения в формировании белковых жидких фаз участвующих в секреторном цикле синаптических везикул в пресинаптических окончаниях.

Гипотезы, выдвинутые в обзорах, проверяется в экспериментах, которые в настоящее время проводятся в лаборатории.

2.2.1 BAR белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе.

ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ВЫВОДЫ

Результаты экспериментов, полученные в последние годы, показали, что BAR белки являются одними из ключевых компонентов секреторного везикулярного цикла в нервных окончаниях нейронов. Они участвуют в регуляции секреции нейромедиаторов при слиянии синаптических везикул с пресинаптической мембраной, а также в рециклировании везикул в результате эндоцитоза. Локализация этих белков в зонах нервных окончаний, где формируются жидкие белковые фазы, предполагает дополнительные функции этих молекул. В обзоре мы обсуждаем функции BAR белков на различных этапах секреторного цикла. Мы предполагаем, что BAR белки, помимо регуляции экзо- и эндоцитоза, играют важную роль в организации резервного пула везикул и на промежуточных этапах секреторного цикла. Мы выдвигаем гипотезу, объясняющую каким образом эти белки могут участвовать в регуляции формирования белковых жидких фаз в нервных окончаниях при синаптической активности. К данной гипотезе привели результаты наших экспериментов, которые мы опубликовали в рамках настоящего проекта в 2021 году (результаты были представлены в отчёте). А именно, что при введении изолированных SH3 доменов, разрушающих жидкую белковую фазу, организующую везикулы в активной зоне, в пресинапсе образуются белковые агрегаты [29]. Как известно, в структуру синаптических BAR белков входят SH3 домены, которые могут находиться как в состоянии аутоингибирования, так и активно взаимодействовать с пресинаптическими белками, образующими жидкую фазу. Таким образом BAR белки могут участвовать в регуляторном процессе (Рис. 12.).

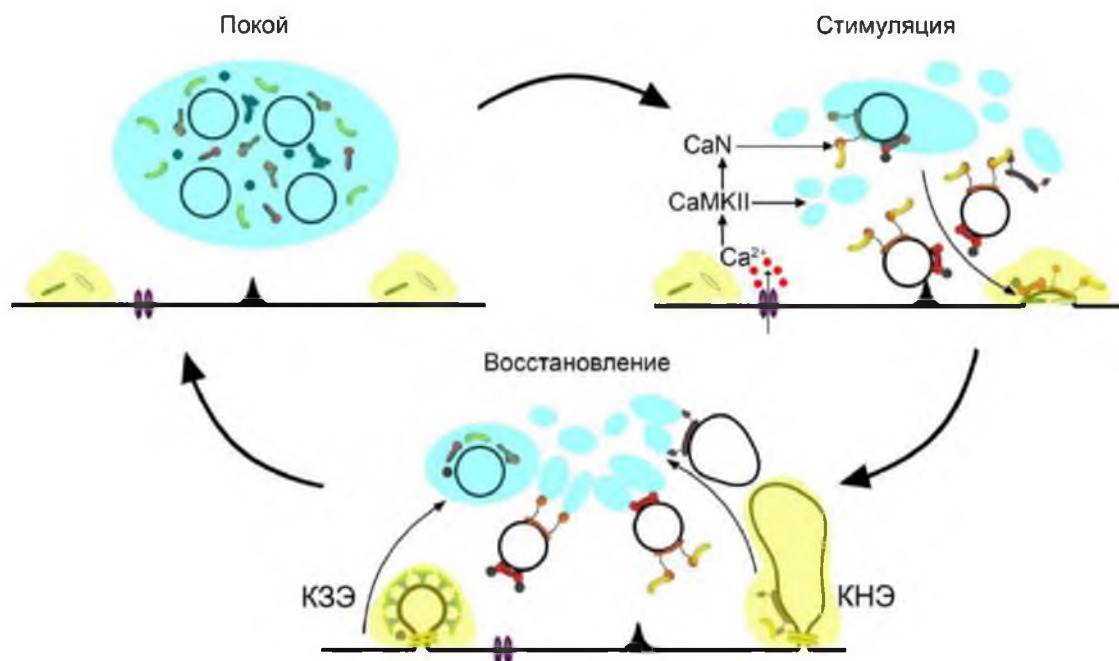


Рисунок 12. Схема, иллюстрирующая участие BAR белков в регуляции жидких белковый фаз, образующихся на различных этапах синаптического цикла.

Слева в верхней части схемы показана организация резервного пула в состоянии покоя. BAR белки находятся в мономерном аутоингибированном состоянии и стабилизируют жидкую фазу синапсина, организующую везикулы в кластер. F-BAR белки (FCHo, FCHSD и частично синдапин) локализованы в периактивной зоне.

При стимуляции (справа) вход кальция через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы приводит к фосфорилированию синапсина с помощью CaMKII и разрушению жидкой фазы в кластере. N-BAR белки подвергаются дефосфорилированию и димеризации, что приводит к взаимодействию с мембраной синаптических везикул и с другими эндоцитозными белками, например, с динамином и синаптоянином, которые также локализуются в кластере в состоянии покоя. Динамин при этом может одновременно и связывать синдапин, и взаимодействовать с амфифизином, находящимся на мембране везикул. Везикулы перемещаются в активную зону и сливаются с пресинаптической мембраной. BAR белки, участвующие в регуляции этих стадий, находятся в растворимом состоянии в аксоплазме.

При эндоцитозе (внизу) BAR белки снова включаются в состав жидкого белкового конденсата в периактивной зоне (желтый). При отпочковании везикул от мембраны с помощью ГТФазы динамина происходят посттрансляционные модификации белков и разрушение жидкой фазы. BAR белки взаимодействуют с синапсинам, что

приводит к увеличению его локальной концентрации. Дефосфорилирование синапсина и последующее усиление его взаимодействия с везикулами приводят к замещению BAR белков на поверхности везикул и формированию жидкой фазы. Посттрансляционные изменения и образование аутоингибированных мономеров BAR белков приводят к стабилизации жидкой фазы и организации везикул в кластер. Подробности в тексте.

Большие стрелки указывают направление синаптического цикла. Голубым цветом показана жидкая фаза синапсина, оранжевым – амфифизин, красным – эндофилин А, серым – синдапин 1, желтым – динамин, зеленым – FCHо и FCHSD, фиолетовым – потенциал-зависимые кальциевые каналы, красными кружками – ионы кальция, серыми кружками – синаптоянин. CaMKII – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, CaN – кальциневрин, КЗЭ – клатрин-зависимый эндоцитоз, КНЭ – клатрин-независимый эндоцитоз.

Гипотеза, выдвинутая в обзоре, проверяется в наших экспериментах в лаборатории.

2.2.2 Роль α -синуклеина, входящего в состав патологических белковых агрегатов при нейродегенеративных заболеваниях, в регуляции жидкой фазы, организующей синаптические везикулы?

ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Недавние исследования, включая результаты экспериментов, полученные в рамках настоящего проекта, показали, что синаптические везикулы организованы в кластеры у активной зоны синапса в результате физического явления - разделение жидких фаз. Кластеры секреторных везикул содержат белки, которые могут формировать жидкие белковые конденсаты. Главным организатором жидкой белковой фазы является белок синапсин [29, 30]. В состав белковой жидкой фазы, организующей синаптические везикулы в кластер, входят также белки, которые являются основной составляющей патологических белковых агрегатов, образующихся при болезни Паркинсона. Одним из таких белков является α -синуклеин [31]. В работе проведен анализ литературных данных о свойствах этого белка, который позволяют предполагать, что α -синуклеин является компонентом белкового конденсата, организующего везикулы в кластер. Мы высказываем предположение, что жидкая фаза синапсина включает синуклеин в конденсат, что поддерживает его состояние в жидкой фазе. Нарушения организации белкового конденсата может приводить к фазовому переходу синуклеина в

твердое состояние с образованием агрегатов, наблюдаемых при синуклеинопатиях, одной из форм которых является болезнь Паркинсона.

ВЫВОДЫ

Анализ данных литературы позволяет заключить, что несмотря на интенсивные исследования, остается неясным какую физиологическую функцию имеет белок α -синуклеин в пресинаптических окончаниях. Однако, данные, полученные в последние годы, позволяют предполагать, что он, вместе с синаптическим белком синапсином, участвует физическом феномене - в организации жидкой белковой фазы, которая организует синаптические везикулы в кластер в активной зоне синапса. Данная роль позволяет предположить механизм патологической трансформации жидкой фазы α -синуклеина в твердую фазу, которая может служить основой для формирования белковых агрегатов в нейронах, которые выявляют при нейродегенеративных заболеваниях, например, при болезни Паркинсона.

2.3 Исследование ранних патологий в центральных синапсах при мутациях митохондриальных генов, которые приводят к возникновению нейродегенеративных заболеваний.

Целый ряд мутаций митохондриальных генов приводят к возникновению нейродегенеративных заболеваний у человека, например, развитию болезни Паркинсона. Совместно с лабораториями Каролинского Института, Стокгольм, Швеция, с которым СПбГУ имеет договор о сотрудничестве, были созданы трансгенные мыши, у которых выключение митохондриальных генов селективно запускается тамоксифеном в сформированных дофаминергических нейронах во взрослом состоянии [32]. Таким образом были созданы экспериментальные модели для изучения форм болезни Паркинсона, в которых участвуют митохондриальные гены.

Одним из белков, нарушение функции которого связывают с БП, является митофузин 2 (Mfn2). Трансмембранный белок Mfn2 расположен во внешней митохондриальной мембране. Он является важным компонентом процесса слияния митохондрий. Ранее для исследования роли этого белка в развитии БП использовался метод нокаута гена *Mfn2*, однако у нокаутных мышей наблюдались нарушения эмбрионального развития и формирования ДН, что усложняло оценку результатов экспериментов.

Совместно с лабораторией проф. Ларсена Каролинского Института, Стокгольм, Швеция, с которым наша лаборатория в СПбГУ имеет договор о сотрудничестве, были

созданы трансгенные мыши, у которых выключение гена *Mfn2* селективно запускается тамоксифеном в сформированных дофаминергических нейронах во взрослом состоянии [32]. Таким образом была создана экспериментальная модель для изучения фенотипа болезни Паркинсона, в которых участвует митохондриальный ген *Mfn2*.

Цель исследования. Выяснить, какие ранние 3D-структурные изменения возникают в митохондриях при условном выключении гена *Mfn2* в сформированных дофаминергических нейронах, какие молекулярные процессы нарушаются и приводят к данным структурным изменениям, каким образом можно остановить этот процесс и предотвратить развитие заболевания.

После публикации динамики развития патологий при выключении гена [32], в 2022 году мы продолжили наши исследования в этом направлении. Новые данные получены по детальным структурным изменениям внутренней организации митохондрий. Для анализа был освоен и использован метод послойного анализа и реконструкции органелл с помощью методов FIB-SEM, (сканирующего электронного микроскопа с фокусированным ионным пучком (ФИП-СЭМ)), и программы Amira для получения 3D моделей органелл. Исследования по данному проекту продолжаются, материалы готовятся к печати.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовали линию мышей, в дофаминергических нейронах (ДН) которых может запускаться экспрессия *Cre*-рекомбиназы, а ген *Mfn2* фланкирован loxP сайтами. Введение тамоксифена в этой модельной системе вызывало инактивацию гена *Mfn2* у взрослых мышей в сформированных ДН. Препараты среднего мозга животных исследовали через 3, 6 и 9 недель после введения тамоксифена с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) и сканирующего электронного микроскопа с фокусированным ионным пучком (ФИП-СЭМ). Трехмерная (3D)-анализ структуры митохондрий в ДН черной субстанции проводили в компьютерной программе Amira 6.0 (ThermoFisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами было обнаружено, что инактивация *Mfn2* приводит к изменению формы митохондрий уже через 2-3 недели после выключения гена (Рис. 13). Фокус наших исследований в 2022 году был направлен на изучение внутренней структуры митохондрий у нейронов черной субстанции. Для этого отрабатывались режимы и настройки ФИП-СЭМ для получения серийных срезов с шагом 6 нм. Серии

использовались для получения детальной информации об изменениях организации крист (Рис. 14).

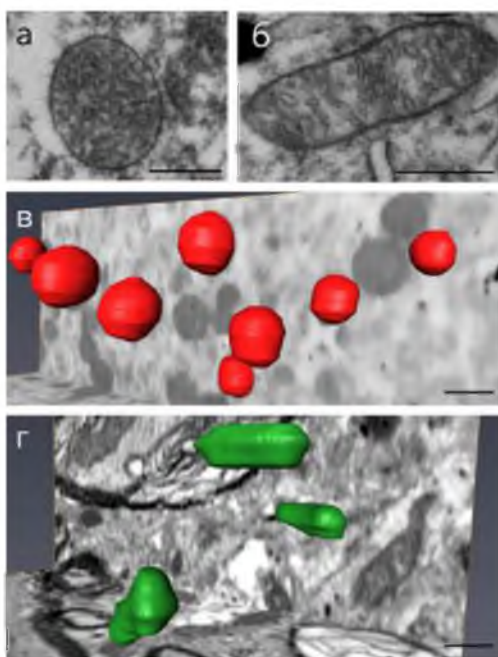


Рис. 13. Инактивация *Mfn2* приводит к изменению формы митохондрий.

Описание к рисунку 13:

- а-б. Электронно-микроскопические снимки митохондрий ДН через 3 недели после инактивации *Mfn2* (а) и в контроле (б). При инактивации гена *Mfn2* профили органелл на срезах принимают сферическую форму, нарушается регулярная организация крист внутренней мембраны.
- в-г. 3D- реконструкция митохондрий ДН по изображениям полученными с шагом 20 нм в препарате черной субстанции через 3 недели после инактивации *Mfn2* (в) и в контроле (г).

Изображения для Рис.13 получали с помощью ФИП-СЭМ. Реконструкция получена с помощью программы Amira. Обращает на себя внимание на существенное изменение формы митохондрий по сравнению с контролем. Органеллы принимают эллиптическую форму. Масштаб: 0,5 мкм.

Инактивация *Mfn2* приводит к нарушению внутренней структуры митохондрий, а именно, морфологии крист.

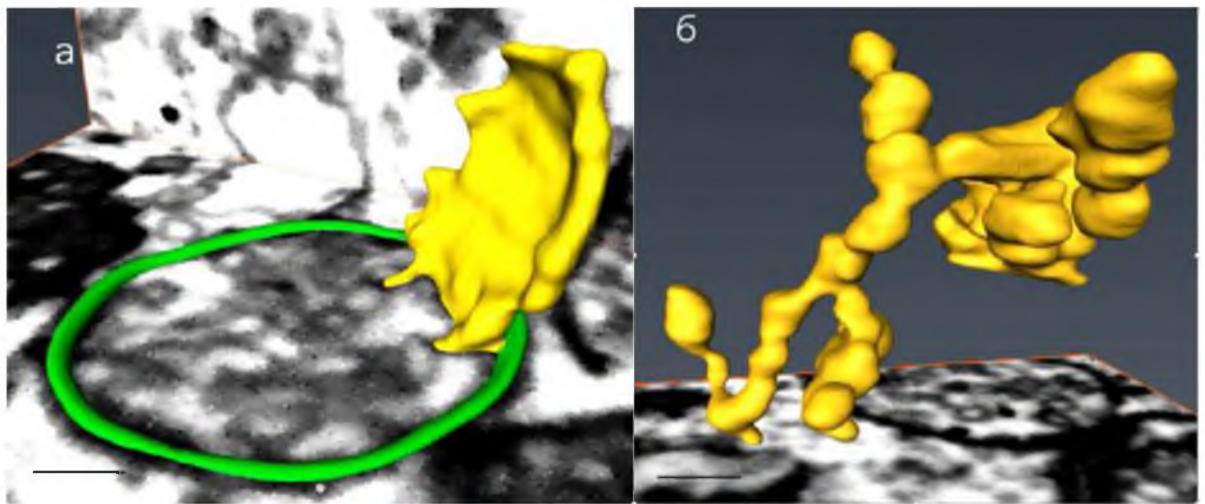


Рис. 14. Трехмерная реконструкция крист митохондрий ДН после инактивации *Mfn2*. Реконструкция проводилась по серии изображений, полученных с помощью ФИП-СЭМ с шагом 6 нм.

При выключении *Mfn2* митохондриальные кристы принимают форму «чаши» (а). Мы также обнаружили, что некоторые кристы ветвятся и образуют цепочки, состоящие из множества сферических структур, соединенных узкими перемычками (б). Зеленый – внешняя митохондриальная мембрана, желтый – внутренняя мембрана. Масштаб: 0,25 мкм.

Измерения площади поверхности крист через 6 недель после выключения *Mfn2* приводит к трехкратному увеличению площади поверхности отдельных крист ($P < 0.001$; $n=20$). Предполагается, что происходит перераспределение белковых комплексов, локализованных в основании крист, которые контролируют их размеры. Иммуногистохимические исследования локализации этих комплексов белков, позволят дать ответ на этот вопрос. Эти исследования проводятся в настоящее время в лаборатории.

ВЫВОДЫ

1. Выключение гена *Mfn2* в ДН на ранних стадиях приводит к изменению формы митохондрий. Органеллы принимают эллиптическую форму, что указывает на перераспределение белковых комплексов на поверхности мембраны митохондрий, контролирующей их форму.

2. Инактивация *Mfn2* в ДН нарушает регулярную организацию митохондриальных крист. Кристы принимают форму «чаши», ветвятся и образуют длинные цепочки. Полученные результаты подтверждают предположения, что *Mfn2*

связан с белковыми комплексами, которые стабилизируют структуру внутренней мембраны митохондрий.

3. Наши исследования позволяют предполагать, что восстановление нормальной экспрессии *Mfn2* будет иметь важное значение для терапии форм болезни Паркинсона, связанных с мутациями *Mfn2*.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2022 году были получены новые данные по трем основным направлениям исследований лаборатории. Фокусом наших исследований были структурные и функциональные механизмы, управляющие работой нервных окончаний и секреторных клеток. Используя хромаффинные клетки в качестве модельной системы, было обнаружено, что в реформировании секреторных везикул в процессе секреции участвует дополнительная промежуточная стадия эндоцитоза, на которой происходит кооперация клатрин-опосредованного эндоцитоза и «bulk» эндоцитоза. При этом клатрин-опосредованный эндоцитоз происходит преимущественно на мембранных инвагинациях, что позволяет получать большее количество везикул одинакового размера в процессе восстановления везикулярного пула и, соответственно, обеспечивать квантовый характер выделения биологически активных веществ при секреции.

Были получены новые данные о функциях F-BAR белков в секреторном цикле в синапсах. Для исследования F-BAR белка скаффолда Nwk (гомолог FCHSD2) использовалась другая модельная система – нервно-мышечные соединения дрозофилы. Данная модельная система позволяет легко проводить генетические манипуляции, в результате которых можно исследовать функции отдельных доменов белков. Наши эксперименты показали, что рекрутирование F-BAR белка Nwk с помощью скаффолд-белка Dap160 (гомолог Интерсектина) к мембране формирующегося синаптического пузырька в процессе эндоцитоза является важным этапом формирования однородной популяции везикул при секреции медиатора. Nwk меняет свою локализацию в нервной терминали при синаптической активности. Взаимодействие с SH3 доменом Dap160 локализует Nwk в области пресинаптической мембраны, где происходит эндоцитоз. Взаимодействие между двумя белками регулируется фосфорилированием. При нарушении взаимодействия между Dap160 и Nwk, а также у мутантов, у которых в структуре Nwk отсутствовал F-BAR домен, позволяющий белку связываться с пресинаптической мембраной, синаптические везикулы в нервно-мышечных синапсах имели различные диаметры. Восстановления функции не происходит при экспрессии F-BAR домена, у *rescue* мутанта *nwk*F-BAR. Электрофизиологические эксперименты выявили нарушения в синаптической передаче, которые соответствовали обнаруженным структурным изменениям в нервно-мышечных синапсах.

В наших экспериментах исследовались функции другого F-BAR белка, синдапина. Ранее считалось, что этот белок рекрутирует ГТФазу динамин для эффективного отпочкования мембранных инвагинаций от плазматической мембраны, в результате «bulk» эндоцитоза. Мы показали, что блокада SH3 домена синдапина с

помощью антител приводит к увеличению количества свободных эндосом в синапсах при высокочастотной стимуляции синапса. Это указывает на то, что синдапин является негативным регулятором функции ГТФазы динамина. Его функция, вероятно, заключается в удержании динамина на определенных участках мембраны для последующего формирования везикул с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза.

Анализ данных литературы позволил нам высказать предположение, что BAR белки, помимо регуляции экзо- и эндоцитоза, играют важную роль в организации резервного пула везикул и на промежуточных этапах секреторного цикла. Была предложена модель, объясняющую каким образом BAR белки могут участвовать в регуляции формирования белковых жидких фаз в нервных окончаниях при синаптической активности.

Несмотря на интенсивные исследования, остается неясным какую физиологическую функцию имеет белок α -синуклеин в пресинаптических окончаниях. Данные, полученные в последние годы, позволяют предполагать, что он, вместе с синаптическим белком синапсином, участвует в физическом феномене - в организации жидкой белковой фазы, которая организует синаптические везикулы в кластер в активной зоне синапса. В обзоре, посвященном α -синуклеину, было выдвинуто предположение, что в синапсах существует механизм патологической трансформации жидкой фазы α -синуклеина в твердую фазу, которая может приводить к образованию белковых агрегатов в нейронах при нейродегенеративных заболеваниях, например, при болезни Паркинсона.

Мы продолжили исследовать роль митохондриальных генов в развитии определенных форм болезни Паркинсона. Ранее, была создана модельная система на мышцах, которая позволяет выключать митохондриальные гены в сформированных дофаминергических нейронах. Фокусом наших исследований был ген *Mfn2*. Мы показали, что выключение гена *Mfn2* в дофаминергических нейронах (ДН) приводит к изменению формы митохондрий на ранних стадиях. Органеллы принимают эллиптическую форму, что указывает на перераспределение белковых комплексов на поверхности мембраны митохондрий, контролирующей их форму. Новые данные были получены о ранних нарушениях организации крист митохондрий. Инактивация *Mfn2* в ДН нарушает регулярную организацию крист. Кристы принимают форму «чаши», ветвятся и образуют длинные цепочки. Полученные результаты подтверждают предположения, что *Mfn2* также связан с белковыми комплексами, которые стабилизируют структуру внутренней мембран митохондрий. Удаление белка приводит к нарушениям их локализации. Это гипотеза проверяется в наших

иммуногистохимических экспериментах. В заключении, наши исследования позволяют предполагать, что восстановление нормальной экспрессии *Mfn2* имеет важное значение для терапии форм болезни Паркинсона, связанных с мутациями *Mfn2*.

4. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shin, W., Arpino, G., Thiyagarajan, S., Su, R., Ge, L., McDargh, Z., Guo, X., Wei, L., Shupliakov, O., Jin, A., O'Shaughnessy, B., and Wu, L. G. Vesicle Shrinking and Enlargement Play Opposing Roles in the Release of Exocytotic Contents // *Cell Rep* – 2020. – Vol. 30. – № 2. – P. 421-431 e427.
2. Shin, W., Wei, L., Arpino, G., Ge, L., Guo, X., Chan, C. Y., Hamid, E., Shupliakov, O., Bleck, C. K. E., and Wu, L. G. Preformed Omega-profile closure and kiss-and-run mediate endocytosis and diverse endocytic modes in neuroendocrine chromaffin cells // *Neuron* – 2021. – Vol. 109. – № 19. – P. 3119-3134 e3115.
3. Clayton, E. L., Anggono, V., Smillie, K. J., Chau, N., Robinson, P. J., and Cousin, M. A. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles // *J Neurosci* – 2009. – Vol. 29. – № 24. – P. 7706-7717.
4. Winther, A. M., Vorontsova, O., Rees, K. A., Nareoja, T., Sopova, E., Jiao, W., and Shupliakov, O. An Endocytic Scaffolding Protein together with Synapsin Regulates Synaptic Vesicle Clustering in the Drosophila Neuromuscular Junction // *J Neurosci* – 2015. – Vol. 35. – № 44. – P. 14756-14770.
5. Andersson, F., Jakobsson, J., Low, P., Shupliakov, O., and Brodin, L. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation // *J Neurosci* – 2008. – Vol. 28. – № 15. – P. 3925-3933.
6. Chiang, H. C., Shin, W., Zhao, W. D., Hamid, E., Sheng, J., Baydyuk, M., Wen, P. J., Jin, A., Momboisse, F., and Wu, L. G. Post-fusion structural changes and their roles in exocytosis and endocytosis of dense-core vesicles // *Nat Commun* – 2014. – Vol. 5. – P. 3356.
7. Sochacki, K. A., Shtengel, G., van Engelenburg, S. B., Hess, H. F., and Taraska, J. W. Correlative super-resolution fluorescence and metal-replica transmission electron microscopy // *Nat Methods* – 2014. – Vol. 11. – № 3. – P. 305-308.
8. Nishimura, T., Morone, N., and Suetsugu, S. Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors // *Biochem Soc Trans* – 2018. – Vol. 46. – № 2. – P. 379-389.
9. Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure // *Science* – 2004. – Vol. 303. – № 5657. – P. 495-499.

10. Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins // *Dev Cell* – 2005. – Vol. 9. – № 6. – P. 791-804.
11. Frost, A., De Camilli, P., and Unger, V. M. F-BAR proteins join the BAR family fold // *Structure* – 2007. – Vol. 15. – № 7. – P. 751-753.
12. Ahmed, S., Goh, W. I., and Bu, W. I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation // *Semin Cell Dev Biol* – 2010. – Vol. 21. – № 4. – P. 350-356.
13. Zhao, H., Pykalainen, A., and Lappalainen, P. I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics // *Curr Opin Cell Biol* – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 14-21.
14. Chatzi, C., and Westbrook, G. L. Revisiting I-BAR Proteins at Central Synapses // *Front Neural Circuits* – 2021. – doi 10.3389/fncir.2021.787436– –
15. Kelley, C. F., Messelaar, E. M., Eskin, T. L., Wang, S., Song, K., Vishnia, K., Becalska, A. N., Shupliakov, O., Hagan, M. F., Danino, D., Sokolova, O. S., Nicastro, D., and Rodal, A. A. Membrane Charge Directs the Outcome of F-BAR Domain Lipid Binding and Autoregulation // *Cell Rep* – 2015. – Vol. 13. – № 11. – P. 2597-2609.
16. Almeida-Souza, L., Frank, R. A. W., Garcia-Nafria, J., Colussi, A., Gunawardana, N., Johnson, C. M., Yu, M., Howard, G., Andrews, B., Vallis, Y., and McMahon, H. T. A Flat BAR Protein Promotes Actin Polymerization at the Base of Clathrin-Coated Pits // *Cell* – 2018. – Vol. 174. – № 2. – P. 325-337 e314.
17. Koh, T. W., Korolchuk, V. I., Wairkar, Y. P., Jiao, W., Evergren, E., Pan, H., Zhou, Y., Venken, K. J., Shupliakov, O., Robinson, I. M., O'Kane, C. J., and Bellen, H. J. Eps15 and Dap160 control synaptic vesicle membrane retrieval and synapse development // *J Cell Biol* – 2007. – Vol. 178. – № 2. – P. 309-322.
18. Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S. J., and Buchner, E. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila* // *Neuron* – 2006. – Vol. 49. – № 6. – P. 833-844.
19. Littleton, J. T., Bellen, H. J., and Perin, M. S. Expression of synaptotagmin in *Drosophila* reveals transport and localization of synaptic vesicles to the synapse // *Development* – 1993. – Vol. 118. – № 4. – P. 1077-1088.

20. Coyle, I. P., Koh, Y. H., Lee, W. C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J. T., and Ganetzky, B. Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila* // *Neuron* – 2004. – Vol. 41. – № 4. – P. 521-534.
21. Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N., and Benzer, S. Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila* // *Science* – 1994. – Vol. 263. – № 5149. – P. 977-980.
22. Winther, A. M., Jiao, W., Vorontsova, O., Rees, K. A., Koh, T. W., Sopova, E., Schulze, K. L., Bellen, H. J., and Shupliakov, O. The dynamin-binding domains of Dap160/intersectin affect bulk membrane retrieval in synapses // *J Cell Sci* – 2013. – Vol. 126. – № Pt 4. – P. 1021-1031.
23. Kessels, M. M., and Qualmann, B. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton // *J Cell Sci* – 2004. – Vol. 117. – № Pt 15. – P. 3077-3086.
24. Wang, Q., Navarro, M. V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S. L., Judson, B. L., Rajashankar, K. R., and Sonderrmann, H. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2009. – Vol. 106. – № 31. – P. 12700-12705.
25. Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., Luo, L., Shupliakov, O., Saenger, W., and Haucke, V. Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2010. – Vol. 107. – № 18. – P. 8213-8218.
26. Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., and Brodin, L. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions // *Science* – 1997. – Vol. 276. – № 5310. – P. 259-263.
27. 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., and Brodin, L. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin // *Neuron* – 2000. – Vol. 27. – № 2. – P. 301-312.
28. Imoto, Y., Raychaudhuri, S., Ma, Y., Fenske, P., Sandoval, E., Itoh, K., Blumrich, E. M., Matsubayashi, H. T., Mamer, L., Zarebidaki, F., Sohl-Kielczynski, B., Trimbuch, T., Nayak, S., Iwasa, J. H., Liu, J., Wu, B., Ha, T., Inoue, T., Jorgensen, E. M., Cousin, M. A., et al. Dynamin is primed at endocytic sites for ultrafast endocytosis // *Neuron* – 2022. – Vol. 110. – № 17. – P. 2815-2835 e2813.

29. Pechstein, A., Tomilin, N., Fredrich, K., Vorontsova, O., Sopova, E., Evergren, E., Haucke, V., Brodin, L., and Shupliakov, O. Vesicle Clustering in a Living Synapse Depends on a Synapsin Region that Mediates Phase Separation // *Cell Rep* – 2020. – Vol. 30. – № 8. – P. 2594-2602 e2593.
30. Milovanovic, D., Wu, Y., Bian, X., and De Camilli, P. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles // *Science* – 2018. – Vol. 361. – № 6402. – P. 604-607.
31. Brodin, L., Milovanovic, D., Rizzoli, S. O., and Shupliakov, O. alpha-Synuclein in the Synaptic Vesicle Liquid Phase: Active Player or Passive Bystander? // *Front Mol Biosci* – 2022. – Vol. 9. – P. 891508.
32. Filograna, R., Lee, S., Tiklova, K., Mennuni, M., Jonsson, V., Ringner, M., Gillberg, L., Sopova, E., Shupliakov, O., Koolmeister, C., Olson, L., Perlmann, T., and Larsson, N. G. Mitochondrial dysfunction in adult midbrain dopamine neurons triggers an early immune response // *PLoS Genet* – 2021. – Vol. 17. – № 9. – P. e1009822.

5. ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1. Реактивы, использованные в экспериментах

Реактивы	Источник	Идентификатор, номер каталога
DMEM medium	Gibco	Cat#11885092
Fetal bovine serum	Gibco	Cat#10082147
German glass coverslips with mouse Laminin coating over PDL layer	Neuvitro	GG-25-Laminin; GG-25-1.5-Laminin
Atto 532	Sigma	88793
Atto 655	Sigma	93711
Trypsin inhibitor Sigma	Sigma	T9253; CAS: 9035-81-8
Bovine serum albumin	Sigma	A2153; CAS: 9048-46-8
mCLING-Atto 488 Synaptic Systems	Synaptic Systems	Cat#710 006AT3
FFN511	Abcam	Cat#ab120331
Embed-812	EMS	Cat#13940
Collagenase P	Sigma	COLLP-RO Roche 11249002001
Dynasore	Tocris Bioscience	Cat#2897; CAS: 30448-55-3
Basic Primary Neurons Nucleofector Kit	Lonza	Cat#VVPI-1003
PH-EGFP	Várnai P. and Balla T. 1998	Addgene Plasmid #51407
PH-mCherry	Chisari et al., 2009	Addgene Plasmid #36075
mNeonGreen	Allele Biotechnology	ABP-FP-MNEONSB
PH-mNeonGreen	Shin et al., 2018	Allele Biotechnology
Dynamin 1-K44A-mRFP	Hynes et al., 2004	Addgene Plasmid #55795

Таблица 2. Программы и алгоритмы, использованные в экспериментах

Программы и алгоритмы	Источник	Ссылка
Huygens Professional	Scientific Volume Imaging	https://svi.nl/Huygens-Professional
Image J	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/
LAS X	Leica	https://www.leicabiosystems.com/
Igor Pro	WaveMetrics	http://www.wavemetrics.com/
Amira 6.0	ThermoFisher Scientific	https://www.thermofisher.com/se/en/home.html
GraphPad Prism 9.0	GraphStat Software, San Diego, CA, USA	https://www.graphpad.com/company