

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623292>

Сфингомиелиназа как модулятор нервно-мышечной передачи через пресинаптический механизм

Ч.Р. Гафурова^{1,2}, А.Н. Ценцевицкий¹, К.А. Мухутдинова^{1,2}, А.Р. Гиниатуллин^{1,2},
А.М. Петров^{1,2*}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Российская Федерация;

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Секреторные сфингомиелиназы выделяются при действии на клетки различного рода стрессовых стимулов, включая воспаление [1]. Избыточная активность и освобождение сфингомиелиназ выступает в качестве патологического фактора, ускоряющего возрастные изменения в нервной системе, нейровоспаление, нейродегенерацию, а также мышечную дисфункцию [1–3]. С другой стороны, сфингомиелиназы были обнаружены в регионах около сайтов экзоцитоза и дендритных шипиках, а ингибирование сфингомиелиназ подавляло синаптическую передачу как на пресинаптическом, так постсинаптическом уровнях в гиппокампальных синапсах. Недостаточность кислот сфингомиелиназы ведёт к нейродегенеративному заболеванию Ниманна–Пика типа А, а нокауты нейтральных сфингомиелиназ у модельных мышей вызывают двигательные дефекты, а также нарушения, напоминающие таковые при болезни Альцгеймера [1, 2]. Всё это указывает на существование механизма регуляции синаптической передачи, который зависит от сфингомиелиназ.

В представленной работе, используя микроэлектродное отведение постсинаптических ответов, экзо-эндоцитозные FM-маркеры, а также чувствительные к мембранным свойствам флуоресцентные зонды, исследовали эффект нейтральной сфингомиелиназы на нейропередачу в диафрагмальной мышце мыши.

Было обнаружено, что добавление сфингомиелиназы (на 15 мин) в низкой концентрации (0,01 ед. акт./мл) ведёт к нарушению упаковки липидов избирательно синаптических мембран. В частности, в синаптических мембранах происходило появление скоплений церамида, подавление окрашивания меченой субъединицей В холерного токсина (маркер скоплений GM1 ганглиозидов), сдвиг в зелёную часть спектра флуоресценции F2N12S (показатель экспансии липид-неупорядоченной фазы), увеличение флуоресценции 22-NBD-холестерина (индикатор увеличения текучести мембран), а также встраивания экзогенного церамида во внешний монослой. Повышение концентрации сфингомиелиназы до 0,1 ед. акт./мл усиливает изменения и приводит также к тому, что указанные изменения мембранных свойств начинают проявляться и в мембранах мышечных волокон. В дальнейших экспериментах использовали 15 мин аппликацию сфингомиелиназы в низкой концентрации, оказывающей синапс-специфичное действие на свойства мембран.

Амплитуда и временные параметры миниатюрных постсинаптических ответов, а также мембранный потенциал покоя не изменялись при аппликации сфингомиелиназы. Также спонтанная секреция, как и вызванная секреция нейромедиатора, в ответ на одиночные стимулы не изменялась при действии сфингомиелиназы. Однако сфингомиелиназа существенно увеличивала секрецию нейромедиатора и темп освобождения экзоцитозом FM-красителей из синаптических везикул при стимуляции нерва с частотами 10, 20 и 70 Гц. Следует отметить, что потенцирующий нейропередачу эффект сфингомиелиназы был необратимым и несколько сильнее выражен при 10 Гц синаптической активности. Эксперименты с прерывистой стимуляцией нерва короткими пачками (по 60 стимулов) с частотами 10 или 20 Гц и короткими 0,5 с интервалами покоя, выявляли, что сфингомиелиназа увеличивает кратковременное облегчение секреции нейромедиатора в начале каждого следующего эпизода при 10 Гц (но не 20 Гц) стимуляции.

Опыты с комбинированием электрофизиологической детекции вызванных постсинаптических ответов, слежением за экзоцитозным освобождением FM1-43 красителя и применением тушителя флуоресценции FM1-43, проникающего через поры слияния, показали, что при высокочастотной (70 Гц) активности в норме существенная популяция синаптических везикул освобождает нейромедиатор через транзиторную пору слияния (kiss-and-run механизм) [4, 5]. Обработка сфингомиелиназой ингибирует подобный путь освобождения нейромедиатора, в итоге основная часть событий нейросекреции происходит за счёт экзоцитоза с полным встраиванием везикулярной мембраны в пресинаптическую мембрану.

Рукопись получена: 14.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Сфингомиелин пресинаптических мембран и мембран синаптических везикул может играть разную роль в контроле освобождения нейромедиатора. Для проверки этой гипотезы во время аппликации сфингомиелиназы проводили стимуляцию процессов экзо-эндоцитоза синаптических везикул, таким образом, фермент получал доступ к мембранам синаптических везикул. В этих условиях потенцирующий эффект сфингомиелиназы на секрецию нейромедиатора и темп экзоцитоза FM1-43 был существенно подавлен.

Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что под влиянием сфингомиелиназы (в низкой концентрации) происходит нарушение целостности липидных рафтов и образование скоплений церамида избирательно в синаптических мембранах в мышце. Это в свою очередь увеличивает мобилизацию синаптических везикул в сайты экзоцитоза в ходе 10–70 Гц активности. Предположительно, особенно активно рекрутируются в экзоцитоз синаптические везикулы, принадлежащие к отдельному пулу, который обеспечивает нейропередачу при 10 Гц активности. Более того, изменение свойств мембран при действии сфингомиелиназы ингибирует освобождение нейромедиатора через пору слияния при высокочастотной активности, направляя экзоцитоз по пути полного слияния. Гидролиз сфингомиелина не только плазматических мембран, но и мембран синаптических везикул ослабляет стимулирующие эффекты сфингомиелиназы, указывая на противоположное значение сфингомиелина пресинаптической и везикулярных мембран в контроле освобождения нейромедиатора [5].

Ключевые слова: секреция нейромедиатора; нервно-мышечный синапс; мобилизация синаптических везикул; сфингомиелиназа; липидные рафты; церамид.

Как цитировать:

Гафурова Ч.Р., Ценцевичский А.Н., Мухутдинова К.А., Гиниатуллин А.Р., Петров А.М. Сфингомиелиназа как модулятор нервно-мышечной передачи через пресинаптический механизм // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 469–472. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623292>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-14-00044, <https://rscf.ru/project/21-14-00044/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiang H., Jin S., Tan F., et al. Physiological functions and therapeutic applications of neutral sphingomyelinase and acid sphingomyelinase // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. Vol. 139. P. 111610. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111610
2. Park M.H., Jin H.K., Bae J.S. Potential therapeutic target for aging and age-related neurodegenerative diseases: the role of acid sphingomyelinase // *Experimental & Molecular Medicine*. 2020. Vol. 52, N 3. P. 380–389. doi: 10.1038/s12276-020-0399-8
3. Petrov A.M., Shalaginam M.N., Protopopov V.A., et al. Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, N 19. P. 4860. doi: 10.3390/ijms20194860
4. Petrov A.M., Zakirjanova G.F., Kovyazina I.V., et al. Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between “full-collapse” and “kiss-and-run” in murine motor nerve terminal // *Life Sciences*. 2022. Vol. 296. P. 120433. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120433
5. Tsentsevitsky A.N., Gafurova Ch.R., Mukhutdinova K.A., et al. Sphingomyelinase modulates synaptic vesicle mobilization at the mice neuromuscular junctions // *Life Sciences*. 2023. Vol. 318. P. 121507. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121507

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* А.М. Петров; адрес: Российская Федерация, 420111, Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31; e-mail: alexey.petrov@kazangmu.ru, fysio@rambler.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623292>

Sphingomyelinase as modulator of neuromuscular transmission via presynaptic mechanism

Ch.R. Gafurova^{1, 2}, A.N. Tsentsevitsky¹, K.A. Mukhutdinova^{1, 2}, A.R. Giniatullin^{1, 2}, A.M. Petrov^{1, 2 *}¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, Russian Federation;² Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

ABSTRACT

Secretory sphingomyelinases are released in response to various types of stress stimuli, including inflammation [1]. Excessive activity and release of these enzymes can be pathological and accelerate age-related neurological changes, neuroinflammation, neurodegenerative disorders, and muscle dysfunction [1–3]. In contrast, sphingomyelinases were detected in areas close to exocytosis sites and dendritic spines, and their inhibition reduced synaptic transmission at both the presynaptic and postsynaptic levels in hippocampal synapses. Deficiency of acid sphingomyelinase results in neurodegenerative Niemann–Pick disease type A. Knockouts of neutral sphingomyelinases in model mice cause motor defects and disorders that resemble the Alzheimer's disease phenotype [1, 2]. These findings suggest the existence of a mechanism regulating synaptic transmission, which is dependent on sphingomyelinases.

In this study, we examined the impact of neutral sphingomyelinase on neurotransmission in mouse diaphragm muscles using microelectrode recordings of postsynaptic responses, exo-endocytic FM dyes, and fluorescent probes sensitive to membrane properties.

The researchers discovered that adding sphingomyelinase at a low concentration (0.01 u/ml) for 15 minutes causes disruption of the lipid packaging of selectively synaptic membranes. This disruption leads to ceramide accumulation, a decrease in staining with Alexa Fluor 488 cholera toxin subunit B conjugate (a marker of GM1 ganglioside cluster), and a shift to the green part of the F2N12S fluorescence spectrum (an indicator of the expansion of the lipid-disordered phase). Increased fluorescence of 22-NBD-cholesterol, indicating an increase in membrane fluidity, and enhanced incorporation of exogenous ceramide into the outer monolayer were observed in the synaptic membranes. Increasing sphingomyelinase concentration to 0.1 u/ml intensifies changes in synaptic membranes and leads to corresponding alterations in membrane properties in muscle fiber plasmalemma. Subsequent experiments used a synapse-specific effect on membrane properties by applying sphingomyelinase at a low concentration for 15 minutes.

The application of sphingomyelinase did not alter the amplitude and temporal parameters of miniature postsynaptic responses or the resting membrane potential. Additionally, sphingomyelinase (0.01 u/ml) did not change spontaneous secretion and evoked neurotransmitter release in response to single stimuli. However, the activity of sphingomyelinase led to a notable increase in the release of neurotransmitters and the rate of exocytotic unloading of FM dye from synaptic vesicles during nerve stimulation at 10, 20, and 70 Hz frequencies. The effect of sphingomyelinase on neurotransmission potentiation was irreversible and more significant at 10 Hz activity. Experiments involving intermittent nerve stimulation with short bursts of 60 stimuli each at 10 or 20 Hz frequencies, along with brief 0.5-second rest intervals, indicated that sphingomyelinase elevated the short-term facilitation of neurotransmitter release at the onset of each subsequent episode at 10 Hz (but not at 20 Hz) stimulation.

Experiments with a combination of electrophysiological detection of evoked postsynaptic responses, monitoring of exocytotic release of the FM1-43 dye, and the use of FM1-43 fluorescence quencher that penetrates through the fusion pores have demonstrated that a significant portion of synaptic vesicles release the neurotransmitter through the transient fusion pore (kiss-and-run mechanism) during high-frequency (70 Hz) activity [4, 5]. Treatment with sphingomyelinase inhibited the neurotransmitter release pathway. As a consequence, the majority of neurosecretion events went through exocytosis, completely incorporating the vesicular membrane into the presynaptic membrane.

Sphingomyelin in the membranes of presynaptic and synaptic vesicles is believed to have varying functions in regulating neurotransmitter release. To investigate this theory, we stimulated the exo-endocytosis processes of synaptic vesicles using sphingomyelinase, which provided access to the synaptic vesicle membranes. Under these circumstances, the enhancing impact of sphingomyelinase on neurotransmitter release and FM1-43 exocytosis rate were notably inhibited.

Received: 14.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

Based on the obtained data, we hypothesize that sphingomyelinase disrupts the integrity of lipid rafts and selectively forms ceramide accumulations in synaptic membranes within the muscles at low concentrations. This ultimately leads to an increase in the mobilization of synaptic vesicles towards exocytosis sites during 10–70 Hz activity. Presumably, the synaptic vesicles from a distinct pool, which predominantly mediates the neurotransmission at a frequency of 10 Hz, are the most actively involved in exocytosis under these circumstances. Sphingomyelinase modifies membrane properties and can inhibit the release of neurotransmitters through the fusion pore during high-frequency activity, redirecting exocytosis towards the complete fusion pathway. Hydrolysis of sphingomyelin in both plasma and synaptic vesicle membranes reduces the stimulatory effects of sphingomyelinase, indicating a contrasting role of sphingomyelin in presynaptic and vesicular membranes for controlling neurotransmitter release [5].

Keywords: neurotransmitter release; neuromuscular junctions; synaptic vesicle mobilization; sphingomyelinase; lipid rafts; ceramide.

To cite this article:

Gafurova ChR, Tsentsevitsky AN, Mukhutdinova KA, Giniatullin AR, Petrov AM. Sphingomyelinase as modulator of neuromuscular transmission via presynaptic mechanism. *Genes & Cells*. 2023;18(4):469–472. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623292>

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. This work was supported by the by Russian Science Foundation, grant No. 21-14-00044, <https://rscf.ru/project/21-14-00044/>

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Xiang H, Jin S, Tan F, et al. Physiological functions and therapeutic applications of neutral sphingomyelinase and acid sphingomyelinase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111610. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111610
2. Park MH, Jin HK, Bae JS. Potential therapeutic target for aging and age-related neurodegenerative diseases: the role of acid sphingomyelinase. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52(3):380–389. doi: 10.1038/s12276-020-0399-8
3. Petrov AM, Shalagina MN, Protopopov VA, et al. Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse. *International Journal of Molecular. Sciences*. 2019;20(19):4860. doi: 10.3390/ijms20194860
4. Petrov AM, Zakirjanova GF, Kovyazina IV, et al. Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between «full-collapse» and «kiss-and-run» in murine motor nerve terminal. *Life Sciences*. 2022;296:120433. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120433
5. Tsentsevitsky AN, Gafurova ChR, Mukhutdinova KA, et al. Sphingomyelinase modulates synaptic vesicle mobilization at the mice neuromuscular junctions. *Life Sciences*. 2023;318:121507. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121507

AUTHORS' CONTACT INFO

* A.M. Petrov; address: 2/31 Lobachevsky street, 420111 Kazan, Russian Federation; e-mail: alexey.petrov@kazangmu.ru, fysio@rambler.ru