

На правах рукописи



Кочкина Екатерина Николаевна
**Вклад различных изоформ IP₃-рецептора
в Ca²⁺-сигнализацию в клетках HEK-293**

1.5.2. — Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Колесников Станислав Сергеевич

Официальные оппоненты: **Авдонин Павел Владимирович**
доктор биологических наук, профессор,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
заведующий лабораторией физиологии рецепторов и
сигнальных систем.

Сибаров Дмитрий Александрович
кандидат биологических наук, Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной
нейрофизиологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится _____ 2025 года в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета **24.1.232.01** (Д 002.285.01), созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3. и на сайте <http://www.icb.pbcras.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
д.б.н.



Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В многоклеточных организмах функционирование тканей и органов во многом детерминируется аутокринными и паракринными регуляциями, которые включают секрецию сигнальных молекул (первичных медиаторов) и их распознавание рецепторами плазмалеммы, сопряжёнными с разнообразными внутриклеточными сигнальными каскадами. Ключевую роль в межклеточных коммуникациях и регуляции клеточных функций играют гептаспиральные рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR), сигнальная функция которых в значительной степени реализуется за счёт сопряжения с G-белками.

Среди разнообразных процессов, инициируемых внешними стимулами в цитозоле клеток, мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} играет центральную роль в трансдукции сигналов многих первичных медиаторов, которые действуют через GPCR-рецепторы, сопряжённые G-белками с фосфоинозитидным каскадом (*Lemmon, Schlessinger, 2010, Berridge, 2016*). В этом случае, ключевым внутриклеточным событием является агонист-зависимая активация фосфолипазы C (PLC) (*Lemmon, Schlessinger, 2010, Huang, Reichardt, 2003*), которая гидролизует липид-предшественник фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP_2), тем самым продуцируя два вторичных мессенджера IP_3 (инозитол-1,4,5-трифосфат) и диацилглицерин (DAG). Функция IP_3 в значительной степени сводится к стимуляции IP_3 -рецепторов (IP_3R) и высвобождению Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо (*Berridge, 2016*). IP_3 -рецепторы представляют собой IP_3 - и Ca^{2+} -активируемые Ca^{2+} -каналы, функционирующие преимущественно на мембране эндоплазматического ретикула (ЭР). IP_3 -рецепторы функционируют в виде гомо- или гетеротетрамерных канальных комплексов субъединиц (изоформ) $\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$ (*Berridge, 2016, Prole, Taylor, 2019, Hamada, Mikoshiba, 2020*). Субъединицы IP_3 -рецептора кодируются тремя генами, которые подвергаются альтернативному сплайсингу, что также увеличивает гетерогенность популяции IP_3 -рецепторов, функционирующих в клетках (*Mikoshiba, 2007, Foskett et al., 2007*).

Клетки большинства типов экспрессируют два или все три гена IP_3 -рецепторов (*Foskett et al., 2007*). Это указывает на то, что одна конкретная изоформа IP_3 -рецептора не способна обеспечить все аспекты агонист-индуцируемой $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -сигналикации, документированные в экспериментах (*Berridge, 2016*). Профиль экспрессии индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов в разных тканях и типах клеток различается, что предполагает специфическую роль отдельных подтипов IP_3 -рецепторов или их комбинаций в физиологии клеток (*Foskett et al., 2007*). Так, $\text{IP}_3\text{R1}$, как правило, является доминантной изоформой в нейронах (*Woll, Petegem, 2022*) и ооцитах (*Parys et al., 2021*). $\text{IP}_3\text{R2}$

экспрессируется на высоком уровне в гепатоцитах (*Kerkhofs et al.*, 2018), глиальных клетках, кардиомиоцитах и секреторных клетках различных типов (*Parys et al.*, 2021), а IP_3R3 — в быстро пролиферирующих, таких как эпителиальные клетки, а также в бета-клетках поджелудочной железы (*Kerkhofs et al.*, 2018). Будучи достаточно высоко гомологичными по первичным последовательностям (55–75%), изоформы IP_3 -рецепторов существенно различаются по чувствительности к IP_3 и Ca^{2+} и по механизмам регуляции (*Hamada, Mikoshiba*, 2020, *Foskett et al.*, 2007, *Parys, Vervliet*, 2020).

Ряд исследований, проведённых в нашей лаборатории ранее (*Kotova et al.*, 2014, 2018, *Cherkashin et al.*, 2022) и выполненных в рамках данной работы, позволили установить, что многие клетки (СНО, НЕК-293, МСК) отвечают на различные агонисты GPCR-рецепторов, мобилизующие внутриклеточный Ca^{2+} , по принципу «всё или ничего». Другими словами, кратковременная аппликация таких агонистов в малых (подпороговых) дозах не приводила к детектируемому увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , тогда как агонисты в концентрации, превышающей пороговую, инициировали Ca^{2+} -сигналы (изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , Ca^{2+} -ответы), амплитуда и форма переднего фронта которых были сходны при различных надпороговых концентрациях агониста. Поскольку это явление наблюдалось нами в клетках нескольких типов и при стимуляции различными агонистами, можно говорить об универсальности механизмов, обеспечивающих это свойство Ca^{2+} -сигналов, инициируемых лигандами GPCR-рецепторов. В своей совокупности наши результаты, в том числе полученные в данной работе, свидетельствовали о том, что во всех случаях конечным событием в цепи трансдукции сигналов использовавшихся агонистов был Ca^{2+} -индуцируемый выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) через IP_3 -рецепторы. CICR — это регенеративный триггерный процесс, который, будучи запущенным, приводит к генерации глобального Ca^{2+} -сигнала, слабо зависящего от инициирующих воздействий, т.е. от агонист-зависимой генерации IP_3 (*Kaimachnikov et al.*, 2021). Именно этим можно объяснить, почему агонисты GPCR инициировали сходные по форме и идентичные по амплитуде Ca^{2+} -сигналы вне зависимости от дозы выше пороговой. Следует отметить, что в упомянутых выше клетках экспрессируются все три изоформы IP_3 -рецепторов. Поэтому оставалось неясным, может ли каждая изоформа IP_3 -рецепторов обеспечивать CICR со свойствами, необходимыми для генерации Ca^{2+} -ответов по механизму «всё или ничего», или на это способна лишь определенная комбинация IP_3 -рецепторов различных типов.

Ранее в нашей лаборатории на основе линии клеток НЕК-293 были получены моноклональные клеточные линии IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -

НЕК, в клетках которых функционирует только IP₃R1, IP₃R2 или IP₃R3 изоформа, соответственно, а также линия ТКО-НЕК, в клетках которой полностью отсутствуют функционирующие IP₃-рецепторы. Наличие клеток, в которых функциональны IP₃-рецепторы только одного типа, обеспечивает возможность ответить на вопрос, сформулированный выше, а также на ряд других, относящихся к анализу механизмов регуляции индивидуальных изоформ IP₃-рецепторов и их роли в Ca²⁺-гомеостазе и агонист-индуцируемой Ca²⁺-сигналикации. В контексте сказанного, были сформулированы следующие цели и задачи данного исследования.

Цель работы: изучить Ca²⁺-сигнализацию, индуцированную внешними стимулами в клетках линии НЕК-293 (WT-НЕК) и производных IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК, ТКО-НЕК, и выявить её закономерности, ассоциированные со свойствами индивидуальных изоформ IP₃-рецептора.

Задачи работы:

1. На примере ацетилхолина (ACh) проанализировать механизмы генерации клеточных ответов на агонисты и, в частности, очертить роль фосфоинозитидного каскада и механизма CICR, оценить вклад входа наружного Ca²⁺ и выброса депонированного Ca²⁺, как основных источников внутриклеточных Ca²⁺-сигналов.
2. Провести сравнительный анализ Ca²⁺-сигналикации в клетках моноклональных линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК и оценить относительный вклад каждой из изоформ IP₃-рецептора в генерацию индуцированных Ca²⁺-сигналов.
3. Оценить вклад индивидуальных изоформ IP₃-рецептора в утечку Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума (ЭР) с использованием тапсигаргинового теста.
4. Разработать методологию для оценки уровня Ca²⁺ в ЭР.

Научная новизна

Благодаря использованию новых моноклональных клеточных линий с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора (IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК), экспрессирующих генетически-кодированный Ca²⁺-сенсор R-CER1a1er с ретикулярной локализацией, а также клеток ТКО-НЕК, лишённых функциональных IP₃-рецепторов, выявлены новые аспекты функционирования индивидуальных изоформ IP₃-рецептора, в частности, оценен их вклад в Ca²⁺-гомеостаз и в трансдукцию агонистов (ACh) по фосфоинозитидному пути.

Впервые показано, что клетки линий с единственной изоформой, как и клетки дикого типа, генерируют полноценные Ca²⁺-ответы на ACh по принципу

«всё или ничего», что свидетельствует о способности каждой изоформы поддерживать выброс депонированного Ca^{2+} по механизму CICR (Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} из депо).

Впервые показано, что в нестимулированных клетках спонтанная активность IP_3 -рецепторов в соответствии с рядом $\text{IP}_3\text{R2-HEK} > \text{IP}_3\text{R1-HEK} > \text{IP}_3\text{R3-HEK}$ вносит вклад в Ca^{2+} -проницаемость мембран ретикулума и определяет долю утечки Ca^{2+} из депо.

В результате одновременного мониторинга изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и ретикулуме в клетках с единственной изоформой IP_3 -рецептора с использованием генетически-кодируемого сенсора R-CER1er впервые получено экспериментальное свидетельство того, что уровень Ca^{2+} в ЭР в нестимулированных клетках коррелирует с Ca^{2+} -утечкой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведённые в данной работе исследования вклада различных изоформ IP_3 -рецептора в Ca^{2+} -сигнализацию расширяют современные представления о системе Ca^{2+} -гомеостаза и механизмах генерации агонист-индуцированных Ca^{2+} -сигналов в клетках человека. В частности, установлено, что любая из изоформ IP_3 -рецептора способна обеспечить генерацию Ca^{2+} -ответов по принципу «всё или ничего» при стимуляции ACh.

Разработана методология на основе тапсигаргинового теста и интерпретирующей его математической модели, позволяющая оценивать относительную Ca^{2+} -проницаемость мембран ЭР в клетках человека.

Клетки линий $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$ и $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$, а также их варианты, экспрессирующие генетически кодируемый сенсор ретикулярного Ca^{2+} , могут использоваться в качестве относительно простых и эффективных тест-систем для поиска фармакологических средств воздействия на IP_3 -рецепторы, а также для исследования механизмов их регуляции. В частности, анализ Ca^{2+} -гомеостаза и индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в клетках $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$ может способствовать пониманию причин, по которым вкусовые клетки типа II используют исключительно эту изоформу для трансдукции вкусовых стимулов.

Линия ТКО-HEK, клетки которой не способны генерировать Ca^{2+} -сигналы в ответ на активацию GPCR-рецепторов, представляет собой полезную клеточную модель для изучения агонист-зависимого переключения GPCR-рецепторов с фосфоинозитидного каскада на другие внутриклеточные сигнальные пути.

Методология и методы исследования. Для достижения заявленной цели и решения поставленных задач были использованы современные методы биофизики и фотоники клетки. Объектом исследований являлись клетки линии HEK-293 дикого типа (WT-HEK), клетки полученных на её основе

моноклональных линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и ТКО-НЕК, а также клетки данных линий, экспрессирующие рекомбинантный генетически-кодированный Ca²⁺-сенсор R-CER1A1er.

Мониторинг цитозольного Ca²⁺ осуществляли с помощью метода микрофотометрии с использованием флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fluo-8 AM. Для скачкообразного повышения концентрации внутриклеточного IP₃ использовали фоточувствительное и проникающее через мембрану производное IP₃ caged-Ins(145)P₃/PM, фотолиз которого вызывали вспышкой света ультрафиолетового диапазона (355 нм) с помощью лазера LCS-DTL-374QT.

Выносимые на защиту положения:

1. Мускариновый M3-рецептор обеспечивает чувствительность к ACh клеток линий WT-НЕК, IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК, которые генерируют Ca²⁺-ответы на ACh по принципу «всё или ничего».

2. Спонтанная активность IP₃-рецепторов вносит вклад в утечку Ca²⁺ из депо: относительный вклад индивидуальных изоформ в Ca²⁺-проницаемость мембраны ЭР ранжируется как IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3, что соответствует ряду вероятностей открытого состояния IP₃-рецепторов в нестимулированных клетках.

3. С использованием разработанной методологии установлено, что уровень Ca²⁺ в ЭР в нестимулированных клетках коррелирует с Ca²⁺-утечкой и описывается рядом IP₃R3-НЕК ≥ IP₃R1-НЕК > IP₃R2-НЕК.

Личный вклад автора. Исследуемые в работе модифицированные клеточные линии получены Копыловой Е.Е. и Рогачевской О.А., оценки относительных уровней транскриптов получены Коваленко Н.П. Автор принимала непосредственное участие в постановке физиологических экспериментов, их выполнении, обработке и анализе полученных результатов, а также в подготовке научных публикаций. Материалы, вошедшие в работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: 24 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология — Наука XXI века» (2020, стендовый доклад), VII Съезд физиологов СНГ (2022, устный доклад), 26 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология — Наука XXI века» (2023, стендовый доклад), XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (2023, стендовый доклад), 27 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология — Наука XXI века» (2024, стендовый доклад), 28

Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология — Наука XXI века» (2025, устный доклад).

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методов биофизики клетки, апробированных и верифицированных ранее, воспроизводимостью измеряемых параметров в многочисленных измерениях и их статистической значимостью. Полученные в работе данные находятся в согласии с опубликованными результатами исследований в области, соответствующей проблематике диссертации.

Публикации. Содержание работы отражено в 13 публикациях, включая 4 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и международные базы данных (Scopus, WoS), 1 главу в книге “Calcium and Signal Transduction” (IntertechOpen, London) (Scopus, WoS), а также 8 тезисов конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 92 страницах, включает 18 рисунков, 1 таблицу. Список литературы содержит 117 источников. Работа содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, приложение, список литературы, список сокращений и список публикаций по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии. В данной работе использовали клетки линии НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных), а также их производные клетки IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора и клетки ТКО-НЕК, в которых IP₃-рецепторы не функциональны (т.к. не осуществляется синтез белка). Эти клеточные линии были получены нашими коллегами (*Копылова и др.*, 2023, *Быстрова и др.*, 2020). Для анализа изменений уровня депонированного Ca²⁺ клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей сенсор R-CEPIA1er, который имел сигнал локализации в эндоплазматическом ретикулуме (*Suzuki et al.*, 2014).

Подготовка клеток к эксперименту. Снятые с культурального пластика клетки осаждали центрифугированием при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью адгезивного материала Cell Tak (BD Biosciences) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel-Glaser) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca²⁺-зондом Fluo-8. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23–25 °C) в присутствии проникающего через мембрану аналога Fluo-8 (ацетоксиметильного эфира Fluo-8 AM, 3 мкМ) и

детергента Pluronic F-127 (0,02%) (оба ААТ Bioquest) в течение 20 мин. Затем клетки отмывали при 25 °С в течение 40 мин внеклеточным раствором следующего состава (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 HEPES, 0,05 EDTA, 10 глюкоза (все Sigma-Aldrich). Для скачкообразного повышения концентрации внутриклеточного IP₃ (IP₃-uncaging) использовали фоточувствительный и проникающий через мембрану предшественник IP₃ — caged-Ins(145)P₃/PM (SiChem, Германия), в этом случае клетки инкубировали в присутствии 3 мкМ Fluo-8 AM, 4 мкМ caged-Ins(145)P₃/PM и 0,02% Pluronic F-127, как описано выше.

Методика и экспериментальная установка. Эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Fluor 20×/0,75 (Zeiss) и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Один из входов бифуркационного оптического волокна соединяли с осветителем на сверхъярких диодах (340–630 нм) (Хохлов и др., 2007) для возбуждения флуоресценции. Флуоресценцию Fluo-8 и R-CEPIA1er возбуждали на длинах волн 480 ± 5 нм и 572 ± 17 нм, соответственно, а эмиссию регистрировали в областях 535 ± 20 нм и 630 ± 30 нм, соответственно, что обеспечивало одновременный мониторинг цитозольного и депонированного Ca²⁺.

Последовательные флуоресцентные изображения регистрировали со скоростью 1 кадр в секунду, в поле зрения камеры наблюдали 100–200 клеток. Изменение концентрации цитозольного и ретикулярного Ca²⁺ в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции $\Delta F/F_0$ Fluo-8 и R-CEPIA1er, соответственно, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 — текущая интенсивность эмиссии Fluo-8 (или R-CEPIA1er) и его эмиссия в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS-Elements AR 5.30.01 (Nikon).

Импульсное повышение концентрации IP₃ в цитоплазме клетки осуществляли путем фотолиза caged-Ins(145)P₃/PM вспышкой света ультрафиолетового диапазона (355 нм). В соответствующих экспериментах клетки нагружали одновременно caged-Ins(145)P₃/PM и Fluo-8. При этом один из входов бифуркационного оптического волокна соединяли с лазером LCS-DTL-374QT (Лазер-Экспорт, Россия), а второй подключали к осветителю для возбуждения флуоресценции Fluo-8.

Аппликация соединений и смена растворов в экспериментальной камере. Смену раствора в экспериментальной камере объемом 200–300 мкл

производили со скоростью ~ 1 мл/с. Используемые соединения в необходимой концентрации растворяли во внеклеточном растворе. В начале эксперимента в течение 300 с регистрировали базовый уровень флуоресценции клеток, после чего апплицировали агонист, заменяя внеклеточный раствор на раствор с агонистом, а через 100–200 с отмывали трёхкратно (по 500 мкл) внеклеточным раствором. Следующую стимуляцию агонистом проводили через 300 с, что обычно соответствовало рефрактерному периоду Ca^{2+} -ответов на агонисты. Для снижения содержания Ca^{2+} во внеклеточном растворе, 2 мМ CaCl_2 заменяли на смесь 0,5 мМ EGTA и 0,4 мМ CaCl_2 , что соответствовало снижению свободного Ca^{2+} с 2 мМ до 260 нМ, как это следует из расчётов программы Maxchelator. Растворы ингибиторов или антагонистов подавали за 200 с до аппликации раствора агониста.

Статистическая репрезентативность и обработка данных. Все представленные эффекты были продемонстрированы как минимум в трёх независимых экспериментах. Для построения графиков и их анализа использовали программу SigmaPlot 15.0 (Grafiti). Статистически значимые различия между группами клеток определяли с использованием критериев Mann-Whitney или ANOVA on Ranks в программе Sigma Plot 15.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм трансдукции сигнала ACh в клетках WT-НЕК. Из ряда использовавшихся агонистов клетки линии НЕК-293 (далее WT-НЕК для единообразия) генерировали Ca^{2+} -ответы на АТР (67,8%), аденозин (1,2%), ACh (76,4%), норадреналин (2,4%), UTP (0,6%), ГАМК (0,6%), тогда как на гистамин, дофамин и серотонин Ca^{2+} -ответы не детектировались. Поскольку ACh инициировал Ca^{2+} -ответы в большинстве клеток WT-НЕК, именно этот агонист был выбран в качестве основного для данного исследования.

Множественные факты свидетельствуют о том, что повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} обусловлено двумя процессами — входом наружного Ca^{2+} и выбросом Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В клетках млекопитающих функционируют два типа рецепторов ACh — мускариновые GPCR-рецепторы и никотиновые ионотропные рецепторы, которые являются ACh-активируемыми катионными каналами, проницаемыми для ионов Ca^{2+} (Noviello *et al.*, 2021). Кроме того, Ca^{2+} может поступать в клетку через рецептор-управляемые каналы, проницаемые для Ca^{2+} (Harteneck, Gollasch, 2011).

Мы показали, что Ca^{2+} -ответы клеток WT-НЕК на ACh блокируются в присутствии антагониста МЗ-рецептора 4-DAMP (Рис. 1А, Б), сохраняются в

среде с низким содержанием Ca^{2+} , полностью блокируются ингибитором PLC U73122 (Рис. 1В) и ингибитором IP_3 -рецепторов ксестоспонгином С (Рис. 1Г). Перечисленное однозначно свидетельствует о том, что клетки WT-НЕК в ответ на стимуляцию ACh генерируют Ca^{2+} -сигналы посредством активации M_3 -рецептора, которая приводит к активации классического фосфоинозитидного каскада, в результате которого Ca^{2+} высвобождается из депо через IP_3 -рецепторы. Следует отметить, что Ca^{2+} -ответы клеток WT-НЕК на ACh обладали интересной особенностью, а именно генерировались по принципу «всё или ничего» (Рис. 1Д). Иными словами, клетки не отвечали на подпороговые концентрации ACh, тогда как при любых концентрациях ACh, превышающих порог, генерировались Ca^{2+} -сигналы примерно одинаковой амплитуды. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что мезенхимные стромальные клетки человека генерируют Ca^{2+} -сигналы такого типа, используя механизм CICR (*Kotova et al.*, 2018, *Cherkashin et al.*, 2022, *Kaimachnikov et al.*, 2021). Для подтверждения работы данного механизма в клетках WT-НЕК мы проводили регистрацию Ca^{2+} -сигналов, стимулируемых импульсным повышением концентрации IP_3 в их цитозоле (IP_3 -uncaging). Клетки нагружали Fluo-8 для мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} и фоточувствительным предшественником IP_3 caged-Ins(145)P₃, фотолиз которого вспышками УФ приводил к импульсному высвобождению IP_3 в цитозоле клеток. Клетки WT-НЕК генерировали одинаковые по амплитуде Ca^{2+} -сигналы в ответ на вспышки УФ длительностью 0,5 и 1,5 с (Рис. 2А, Б) — это указывает на то, что зависимость амплитуды Ca^{2+} -ответа от инициирующей концентрации IP_3 носит пороговый характер «всё или ничего».

Перечисленные выше результаты экспериментов убедительно свидетельствуют о том, что механизм CICR при участии IP_3 -рецепторов может обеспечивать постоянство амплитуды Ca^{2+} -ответов на агонисты. Между тем, клетки WT-НЕК экспрессируют все три изоформы IP_3 -рецептора, а экспрессия участников фосфоинозитидного каскада одинакова в клетках всех линий (*Kochkina et al.*, 2024). Поэтому оставалось неясным, опосредована ли реакция «всё или ничего» активностью конкретной изоформы IP_3 -рецептора, или каждая из них способна обеспечивать этот вид Ca^{2+} -сигналов, индуцированных агонистом. Ответить на этот вопрос мы попытались в экспериментах, описанных ниже.

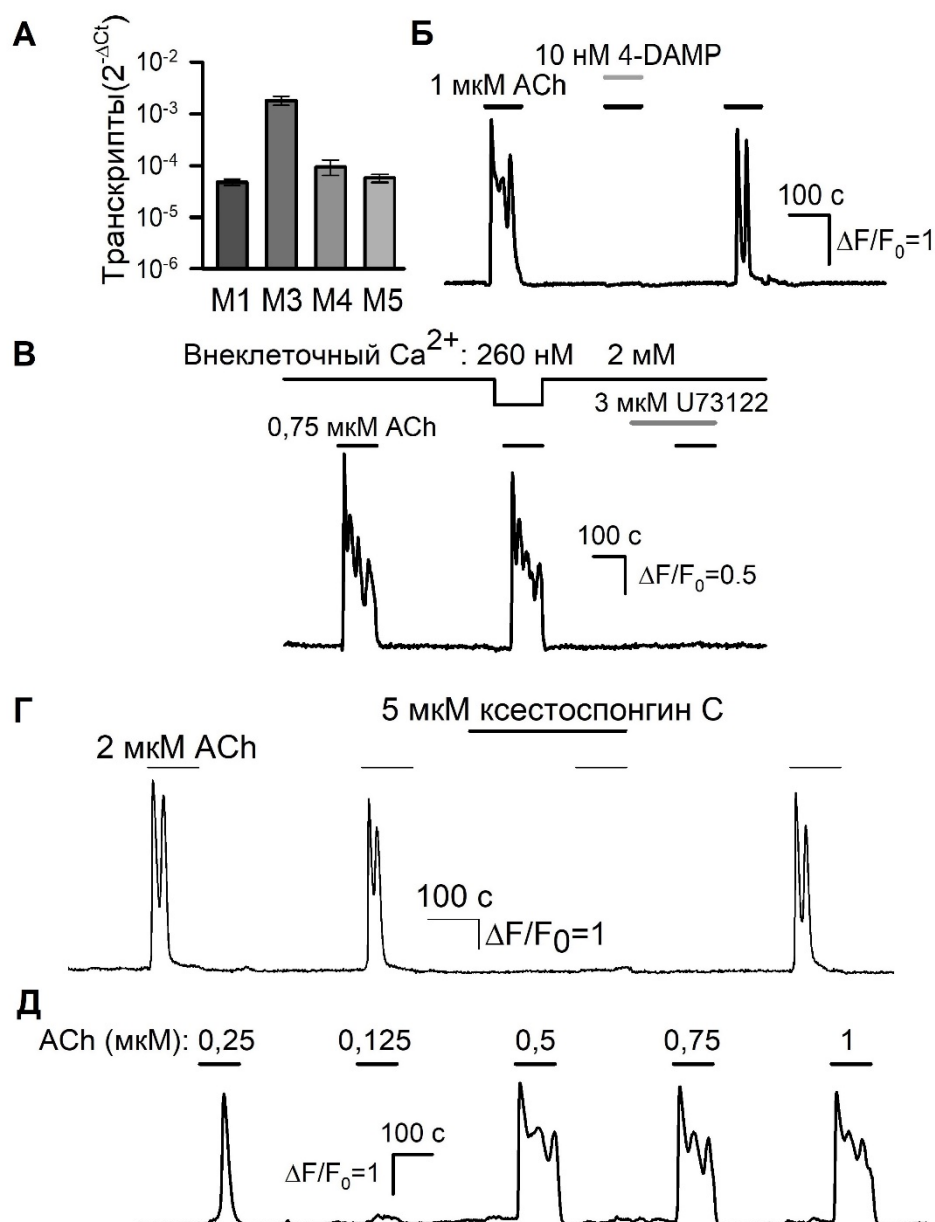


Рисунок 1. Механизм генерации Ca^{2+} -ответов на ACh клетками HEK-293 (здесь и далее WT-HEK) (адаптировано из Kochkina et al., 2024).

А – Относительные уровни транскриптов мускариновых рецепторов в клетках WT-HEK (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$), референтный ген актин (данные Коваленко Н.П.).

Б – Антагонист мускариновых M3-рецепторов 4-DAMP подавлял Ca^{2+} -ответы на ACh.

В – Ответы на ACh сохранялись в среде с низким содержанием Ca^{2+} , ингибитор PLC U73122 блокировал ответы. Верхняя линия иллюстрирует изменения концентрации внеклеточного Ca^{2+} .

Г – Антагонист IP_3 -рецепторов ксестоспонгин С обратимо подавлял Ca^{2+} -ответы на ACh.

Д – Ca^{2+} -ответы на ACh (0,125–1 мкМ) генерировались по принципу «всё или ничего».

Здесь и далее на рисунках представлены репрезентативные регистрации Ca^{2+} -ответов одиночных клеток, начало и длительность стимуляций обозначены отрезками прямой над кривой регистрации.

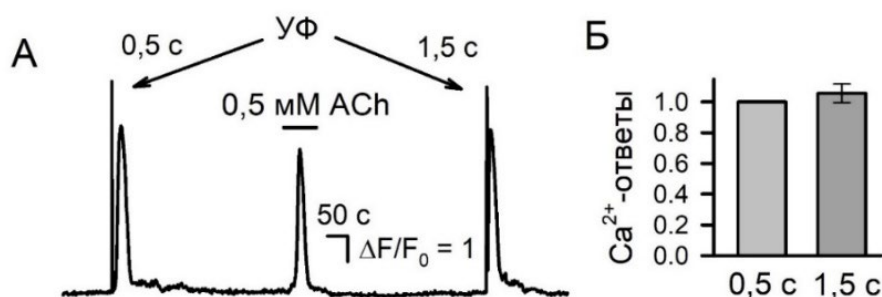


Рисунок 2. Ca^{2+} -ответы, инициируемые фотовысвобождением IP_3 (адаптировано из *Kochkina et al.*, 2024). **А** – Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке WT-НЕК, загруженной одновременно caged-Ins(145) P_3 /PM и Fluo-8. Вспышки УФ (355 нм) инициировали импульсное повышение концентрации IP_3 в цитозоле клетки, что инициировало Ca^{2+} -сигналы, сходные с ответом на ACh. Увеличение длительности вспышки с 0,5 с до 1,5 с незначительно влияло на величину и форму Ca^{2+} -сигнала. **Б** – Относительные величины Ca^{2+} -ответов на УФ импульсы длительностью 0,5 с и 1,5 с. Для усреднения по разным экспериментам ответ на 0,5 с вспышку принят за 1. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 26$).

Анализ Ca^{2+} -сигнализации в клетках $\text{IP}_3\text{R1-}$, $\text{IP}_3\text{R2-}$, $\text{IP}_3\text{R3-}$ и ТКО-НЕК. Как и в случае клеток WT-НЕК (Рис. 1), кратковременная аппликация ACh инициировала импульсные Ca^{2+} -сигналы в цитоплазме клеток $\text{IP}_3\text{R1-}$, $\text{IP}_3\text{R2-}$ и $\text{IP}_3\text{R3-}$ НЕК (Рис. 3А). Клетки всех этих типов генерировали ответы на ACh по принципу «всё или ничего», что предполагает их формирование при участии механизма CICR (*Kaimachnikov et al.*, 2021) и свидетельствует о способности каждой из трёх изоформ IP_3 -рецептора поддерживать механизм CICR. Этот вывод из наших экспериментов и математического моделирования (*Kaimachnikov et al.*, 2021) согласуется с исследованиями Ca^{2+} -сигнализации в клетках с одной функциональной изоформой IP_3 -рецептора, проводившимися в других лабораториях (*Mataragka, Taylor*, 2018, *Lock, Parker*, 2020).

В качестве дополнительного контроля мы провели ряд экспериментов с клетками линии ТКО-НЕК, в которой были инактивированы все три гена IP_3 -рецептора. Как и ожидалось, данные клетки не генерировали Ca^{2+} -ответы при стимуляции ACh и АТР по отдельности или совместно (Рис. 4), тогда как аппликация иономицина (5 мкМ) инициировала значительный Ca^{2+} -сигнал, свидетельствуя о функциональности системы мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} . Таким образом, наши данные показывают, что экспрессия хотя бы одной изоформы IP_3 -рецептора необходима и достаточна для генерации Ca^{2+} -ответов на ACh. Это верифицирует вывод ингибиторного анализа о том, что фосфоинозитидный каскад играет принципиальную роль (Рис. 1).

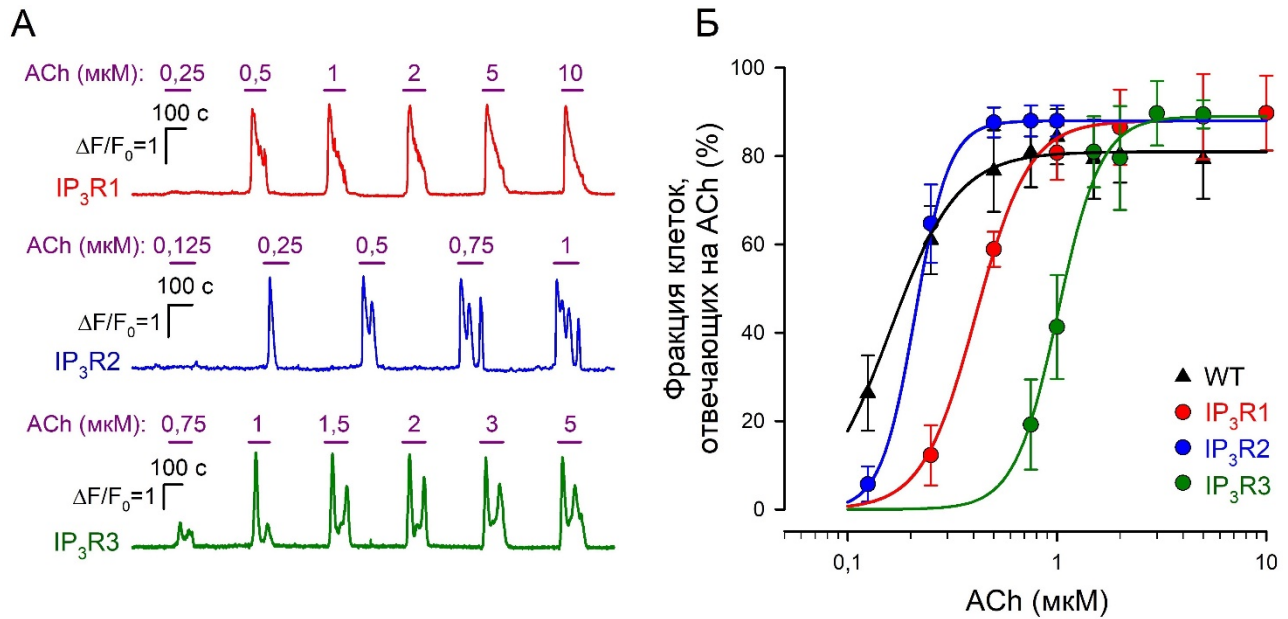


Рисунок 3. Зависимости Ca^{2+} -ответов клеток IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и WT-НЕК от концентрации ACh (адаптировано из *Kochkina et al.*, 2024). **А** – Репрезентативные регистрации внутриклеточного Ca^{2+} в одиночных клетках IP₃R1-НЕК ($n = 191$), IP₃R2-НЕК ($n = 178$) и IP₃R3-НЕК ($n = 164$) (здесь и далее на рисунках будут обозначены как IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, соответственно). ACh использовался в дозах как указано. **Б** – Фракции ACh-чувствительных клеток в популяциях WT-НЕК ($n = 256$), IP₃R1-НЕК ($n = 191$), IP₃R2-НЕК ($n = 178$) и IP₃R3-НЕК ($n = 164$). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Непрерывные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных.

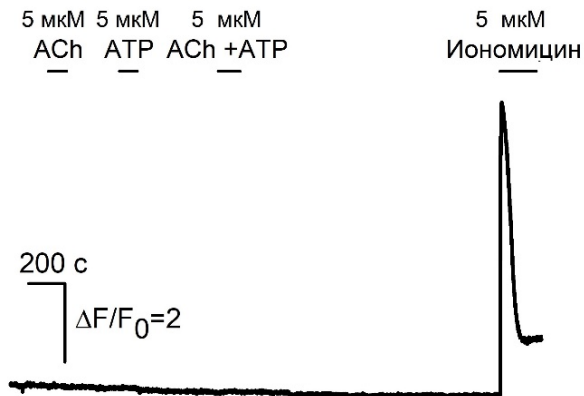


Рисунок 4. Репрезентативная регистрация изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке линии ТКО-НЕК ($n = 61$). Продemonстрировано отсутствие генерации Ca^{2+} -ответов при стимуляции 5 мкМ ACh, 5 мкМ АТР и их смесью. При этом стимуляция 5 мкМ иониомина вызывает рост цитозольного Ca^{2+} .

Несмотря на схожий характер Ca^{2+} -ответов на ACh, клетки линий IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора демонстрировали разную чувствительность к агонисту (Рис. 3А). Поскольку в каждой клетке Ca^{2+} -ответы на ACh при варьируемых дозах были идентичны по амплитуде (Рис. 3А), кривые дозо-зависимости ответов строили как зависимость фракции (%) клеток в популяции (100%), отвечающих на агонист при данной его концентрации (Рис. 3Б). В результате аппроксимации экспериментальных зависимостей (символы) уравнением Хилла (сплошные линии) значения EC_{50} ACh для клеток WT-, IP₃R1-, IP₃R2-, и IP₃R3-НЕК составили 0,16, 0,41, 0,21, и 1,01 мкМ, соответственно. Таким образом,

чувствительность к ACh анализируемых клеточных линий можно описать рядом: WT-НЕК $\approx$ IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК

Клетки всех линий в ответ на ACh генерировали Ca²⁺-сигналы с явной задержкой (τ_d) относительно момента аппликации агониста (Рис. 5А), которая заметно уменьшалась с увеличением концентрации агониста, и эта зависимость была достаточно специфична для клеток отдельных линий (Рис. 5Б). Проведённое нами ранее моделирование процесса трансдукции сигналов Ca²⁺-мобилизующих агонистов показало, что задержка Ca²⁺-ответов определяется скоростью стимул-зависимой генерации IP₃ и аффинностью к нему IP₃-рецепторов (*Kaimachnikov et al.*, 2021). Поскольку в большей дозе агонист стимулирует больше рецепторов, а значит, увеличивает скорость продукции IP₃, то это объясняет, почему задержка падает с увеличением дозы агониста. Как и предсказывали вычислительные эксперименты, расположение задержек на оси концентраций, полученное для клеток IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК (Рис. 5Б), полностью соответствует ряду аффинностей рецепторов к IP₃ (*Mikoshiba*, 2007, *Parys et al.*, 2021, *Saleem et al.*, 2013, *Smith, Taylor* 2023): IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3. То же соответствие имело место и для кривых доза-ответ (Рис. 3Б). Поэтому представляется, что именно чувствительность конкретной изоформы IP₃-рецептора к IP₃ является доминантным фактором, определяющим кривые доза-ответ и доза-задержка, характерные для клеточной линии, в которой она экспрессируется.

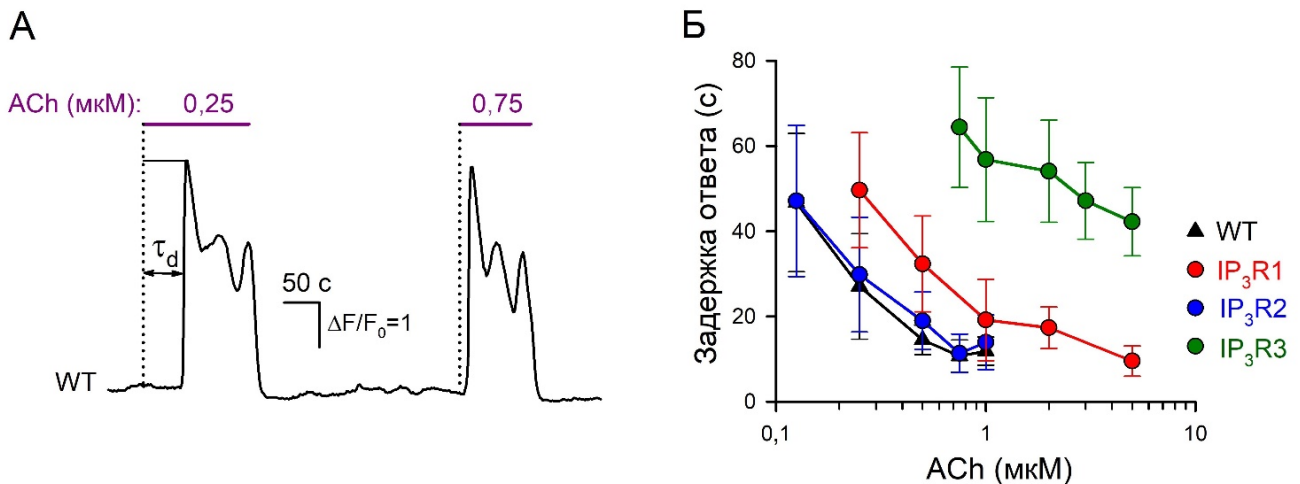


Рисунок 5. Зависимость задержки Ca²⁺-ответов клеток исследуемых линий на ACh от его концентрации (адаптировано из *Kochkina et al.*, 2024). **А** – Репрезентативные ответы индивидуальной клетки WT-НЕК на ACh в концентрациях 0,25 мкМ (околопороговая концентрация) и 0,75 мкМ. Приведённые ответы имели задержку от момента аппликации ACh 52 и 14 с, соответственно. Характерное время задержки ответа (τ_d) определяли как интервал времени, необходимый для достижения Ca²⁺-ответом половины своего максимального значения. **Б** – Зависимость времени задержки ответа от концентрации агониста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 61, 56, 58$ и 49 для WT-, IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК, соответственно).

Оценка вклада IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 в утечку депонированного Ca^{2+} в клетках WT-, IP_3R1 -, IP_3R2 -, IP_3R3 - и ТКО-НЕК. Клетки используют несколько транспортных систем для поддержания стационарного уровня Ca^{2+} в цитозоле в покое и для генерации Ca^{2+} -сигналов в ответ на внешние стимулы (*Berridge et al.*, 2003, *Carreras-Sureda et al.*, 2018). Уровень цитозольного Ca^{2+} определяется потоками Ca^{2+} через плазмалемму, мембраны ЭР и Ca^{2+} -аккумулирующих органелл, включая митохондрии, кислые лизосомы и аппарат Гольджи. На плазматической мембране функционирует множество Ca^{2+} -проницаемых каналов, в том числе депо-управляемые Ca^{2+} -каналы (SOC-каналы), плазматическая Ca^{2+} -АТРаза PMCA и Na^+/Ca^{2+} -обменник, тогда как проницаемость мембраны ЭР для Ca^{2+} детерминирована IP_3 -рецепторами, каналами Ca^{2+} -утечки и Ca^{2+} -АТРазой SERCA (Рис. 6А).

Для выяснения роли спонтанной активности IP_3 -рецепторов в утечке Ca^{2+} из ЭР мы использовали классический тапсигаргиновый тест. Клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ тапсигаргина, ингибирующего SERCA, в условиях пониженного внеклеточного Ca^{2+} (260 нМ), что снижало поток наружного Ca^{2+} на четыре порядка, делая его вклад во внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы пренебрежимым. В этих условиях Ca^{2+} -сигналы, инициируемые аппликацией тапсигаргина (Рис. 6Б), были вызваны утечкой Ca^{2+} из ЭР, приводившей к опустошению Ca^{2+} -депо, которое в свою очередь стимулировало активность SOC-каналов, что, однако, не сопровождалось детектируемым депо-управляемым Ca^{2+} -входом (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) за счёт низкого Ca^{2+} во внеклеточном растворе. После инкубации с тапсигаргином в течение промежутка времени, обеспечивающего релаксацию внутриклеточного Ca^{2+} до исходного уровня (900 с в случае клеток ТКО-НЕК и 600 с в случае клеток остальных линий), концентрацию внеклеточного Ca^{2+} возвращали к 2 мМ, инициируя существенный SOCE и заметные Ca^{2+} -ответы (Рис. 6Б, верхняя кривая).

Для количественного описания выброса Ca^{2+} из депо и входа наружного Ca^{2+} кривые регистрации Ca^{2+} -сигналов в отдельных клетках (Рис. 6Б, верхняя кривая) дифференцировали, что позволяло оценить максимальные скорости выброса Ca^{2+} (R_r — release rate) и входа Ca^{2+} (R_e — entry rate) по соответствующим локальным максимумам на кривой $d(F/F_0)/dt$ (Рис. 6Б, пики на нижней кривой).

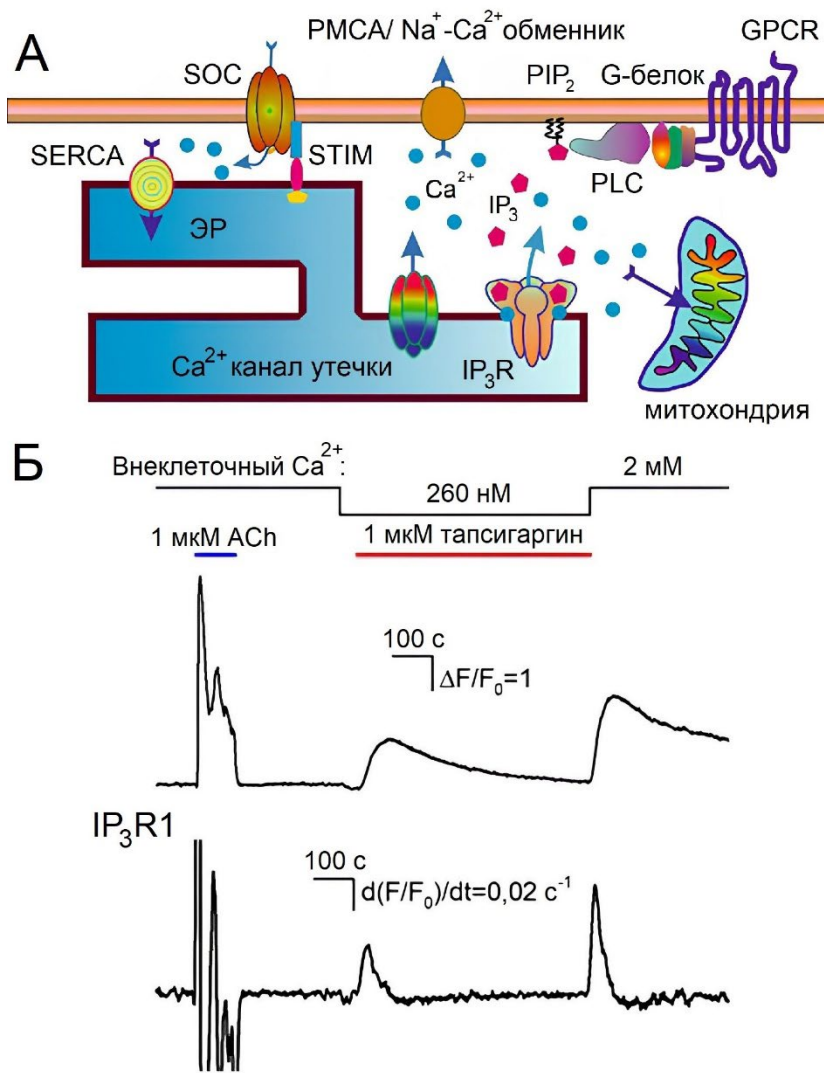


Рисунок 6. Ca^{2+} -сигналы, связанные с ингибированием SERCA тапсигаргином и истощением запасов Ca^{2+} в ЭР (адаптировано из Kochkina et al., 2024). **А** – Схема, демонстрирующая основные процессы, вносящие вклад в Ca^{2+} -гомеостаз. **Б**, верхняя кривая – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -сигналов, вызванных в клетках IP₃R1-НЕК ($n = 135$) в присутствии 1 мкМ ACh в контроле, 1 мкМ тапсигаргина при 260 нМ Ca^{2+} во внеклеточном растворе и возвратом к концентрации Ca^{2+} 2 мМ во внеклеточном растворе после опустошения Ca^{2+} -депо в течение 600 с.

Б, нижняя кривая – Производная $d(F/F_0)/dt$ верхней кривой. Максимальные значения первого и второго пиков принимали за скорость высвобождения Ca^{2+} (R_r) и входа Ca^{2+} (R_e) соответственно.

На основании этих данных мы построили ряд гистограмм, характеризующих распределение R_r и R_e среди клеток разных линий. Все полученные гистограммы были сложными в том смысле, что для их удовлетворительной аппроксимации требовалась комбинация 2 или 3 функций Гаусса (Рис. 7), что может говорить о наличии 2–3 клеточных субпопуляций, различающихся интенсивностью утечки Ca^{2+} и SOCE. Экспериментальные гистограммы выявили различия между клетками WT-, IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК как по высвобождению Ca^{2+} , индуцированному тапсигаргином, так и по SOCE. В частности, гистограммы R_r для клеток WT- и IP₃R3-НЕК были шире и сдвинуты вправо по сравнению с гистограммами R_r , полученными для клеток IP₃R1-, IP₃R2- и ТКО-НЕК (Рис. 7, левые панели). Это указывало на то, что утечка Ca^{2+} в клетках WT- и IP₃R3-НЕК была более интенсивной, чем в клетках IP₃R1-, IP₃R2- и ТКО-НЕК.

Гистограммы, полученные для SOCE, наблюдаемого после опустошения Ca^{2+} -депо, также были достаточно специфичны для индивидуальных клеточных

линий (Рис. 7, правые панели). В то время как клетки IP₃R1- и IP₃R3-НЕК были сопоставимы по распределению и среднему значению SOCE после истощения Ca²⁺-депо тапсигаргином, активность SOCE была выше в клетках IP₃R2- и WT-НЕК, где IP₃R2 является функционально доминирующей изоформой (*Kochkina et al.*, 2024), а также в клетках ТКО-НЕК. Вероятно, IP₃R2 функционально сопряжены с Ca²⁺-каналами, опосредующими SOCE в клетках WT- и IP₃R2-НЕК. По литературным данным, постоянная утечка Ca²⁺ из ЭР опосредуется несколькими белками (*Carreras-Sureda et al.*, 2018, *Wang et al.*, 2016), а также спонтанной активностью IP₃-рецепторов и рианодиновых рецепторов (*Camello et al.*, 2002).

Учитывая приведённые выше факты, значительный SOCE в случае клеток ТКО-НЕК можно объяснить минимальной Ca²⁺-утечкой в отсутствие IP₃-рецепторов, которая приводит к менее интенсивному снижению уровня Ca²⁺ в ЭР, вследствие чего индивидуальные SOC-каналы относительно менее активны. Отметим, что в невозбудимых клетках SOC-каналы являются существенным фактором входа наружного Ca²⁺, поэтому для поддержания физиологически адекватного уровня цитозольного Ca²⁺ в покое требуется большее количество SOC-каналов, если активность индивидуальных каналов меньше.

Оценка Ca²⁺-проницаемости мембраны ЭР. Используя данные о скоростях выброса Ca²⁺ из ЭР в условиях тапсигаргинового теста (Рис. 6, 7), мы попытались оценить вклад IP₃-рецепторов в Ca²⁺-утечку. Гистограмма начальных скоростей выброса Ca²⁺ для клеток IP₃R3-НЕК была сдвинута вправо по отношению к гистограммам, полученным для клеток IP₃R1-НЕК и IP₃R2-НЕК (Рис. 7, левые панели), тогда как изоформа IP₃R3 характеризуется существенно меньшей аффинностью к IP₃, а значит, должна иметь наименьшую спонтанную активность при прочих равных условиях. Поэтому можно было ожидать, что Ca²⁺-проницаемость мембраны ЭР в клетках IP₃R3-НЕК должна была быть наименьшей, что, на первый взгляд, не соответствовало факту, что клетки IP₃R3-НЕК показали в среднем большие начальные скорости выброса Ca²⁺, индуцированного тапсигаргином (Рис. 7, левая панель). Следует отметить, что скорость выброса Ca²⁺ зависит не только от проницаемости мембран ЭР для ионов Ca²⁺, но и от уровня депонированного Ca²⁺. Таким образом, скорость высвобождения Ca²⁺ не может служить независимым показателем проницаемости ЭР для Ca²⁺.

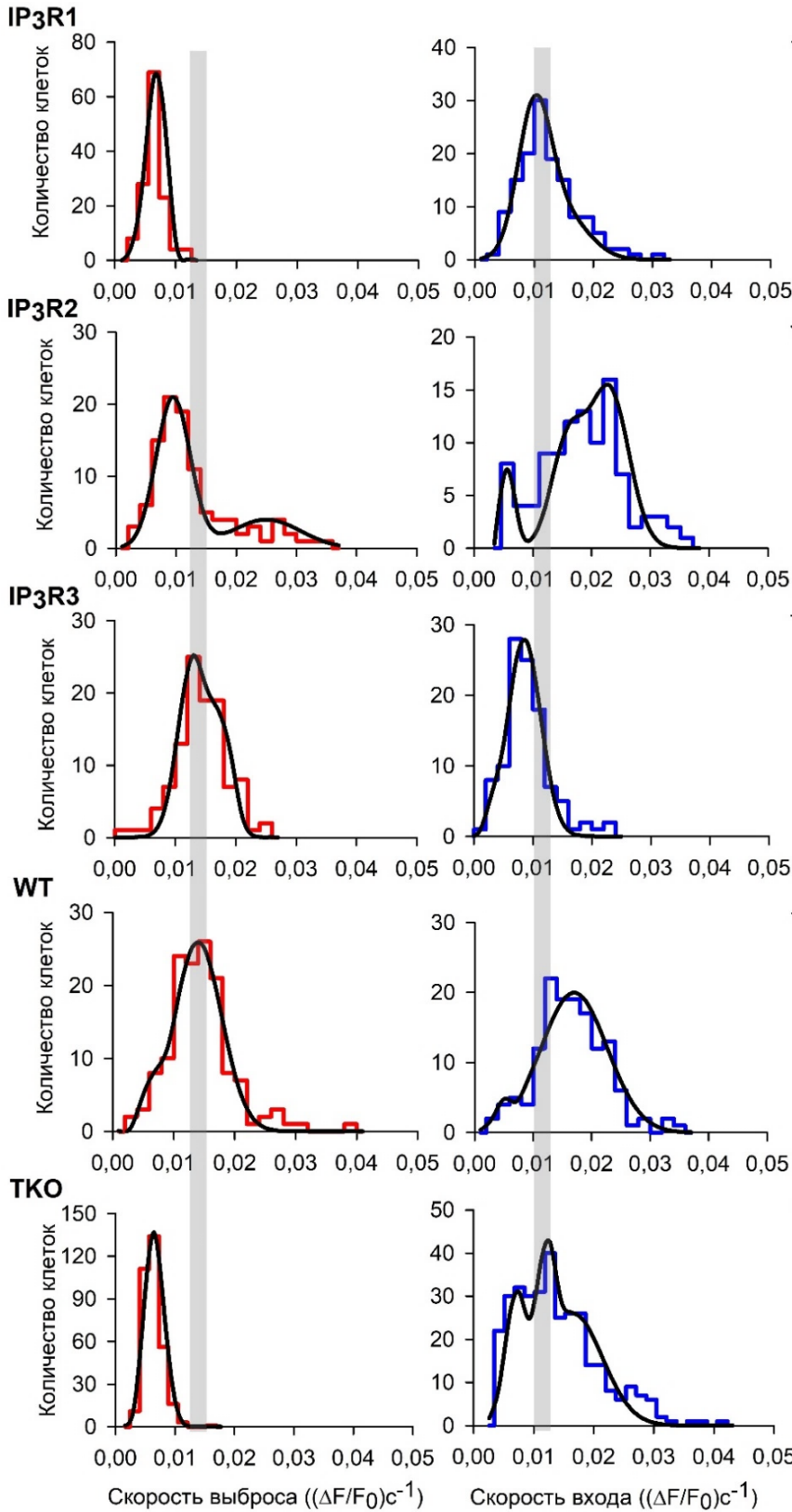


Рисунок 7.

Распределение величин R_r (максимальная скорость Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} -выброса из депо, левые панели) и R_e (максимальная скорость Ca^{2+} -входа, правые панели) в популяциях клеток линий IP₃R1-НЕК ($n = 136$), IP₃R2-НЕК ($n = 103$), IP₃R3-НЕК ($n = 108$), WT-НЕК ($n = 141$), ТКО-НЕК ($n = 332$) (адаптировано из Kochkina et al., 2024). Каждая экспериментальная гистограмма была аппроксимирована (плавные линии) с использованием уравнения: $N(r) = N_1 e^{-\left(\frac{r-r_1}{\sigma_1}\right)^2} + N_2 e^{-\left(\frac{r-r_2}{\sigma_2}\right)^2} + N_3 e^{-\left(\frac{r-r_3}{\sigma_3}\right)^2}$, где $N(r)$ – количество клеток, скорость высвобождения /входа Ca^{2+} в которых равна r , а N_i , r_i и σ_i являются константами.

Для решения этой проблемы мы редуцировали модель агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации (*Kaimachnikov et al.*, 2021, Приложение диссертации), чтобы описать Ca^{2+} -сигналы, цитозольные и ретикулярные, в условиях тапсигаргинового теста. В итоге нами было получено соотношение для оценки относительной Ca^{2+} -проницаемости P мембраны ЭР, в соответствии с которым P пропорционально отношению:

$$P \sim \frac{\frac{dC}{dt}(0)}{\int_0^T C dt} \quad (1)$$

где C — концентрация цитозольного Ca^{2+} ; $\frac{dC}{dt}(0)$ — начальная (т.е. в момент времени $t = 0$) скорость роста концентрации цитозольного Ca^{2+} за счёт Ca^{2+} -утечки при ингибировании SERCA тапсигаргином; $\int_0^T C dt$ — площадь под кривой выброса Ca^{2+} ; T — временной интервал, необходимый для релаксации цитозольного Ca^{2+} к исходному уровню (Рис. 8А).

Так как флуоресценция Fluo-8 была значительно ниже уровня насыщения (Ca^{2+} -сигналы были в 50 раз меньше динамического диапазона зонда (*McMahon, Jackson*, 2014), то измеряемый параметр $\Delta F/F_0$ можно было считать пропорциональным концентрации цитозольного Ca^{2+} . Для каждой анализируемой клетки мы оценили как начальную скорость высвобождения Ca^{2+} (Рис. 6Б, нижняя панель), так и площадь под кривой, характеризующей степень выхода Ca^{2+} из депо (Рис. 8А, заштрихованная область). Как показано на соответствующих гистограммах, тапсигаргин индуцировал гораздо более масштабное высвобождение Ca^{2+} в клетках $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК (Рис. 8Г, средняя панель) по сравнению с клетками $\text{IP}_3\text{R1}$ -, $\text{IP}_3\text{R2}$ - и ТКО-НЕК (Рис. 8Б, В, Д, средние панели).

Затем с использованием уравнения 1 были рассчитаны относительные значения Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР для каждой клетки и получено их распределение среди клеток определенного подтипа (Рис. 8Б–Д, правые панели). В итоге были получены следующие оценки относительных значений (P) Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР для клеток $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК и ТКО-НЕК:

$$P_{\text{IP3R1}} : P_{\text{IP3R2}} : P_{\text{IP3R3}} : P_{\text{ТКО}} = 1 : 1,75 : 0,45 : 0,41$$

Таким образом, по относительной Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР, клетки различных линий должны располагаться как: $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК > $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК > $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК $\approx$ ТКО-НЕК.

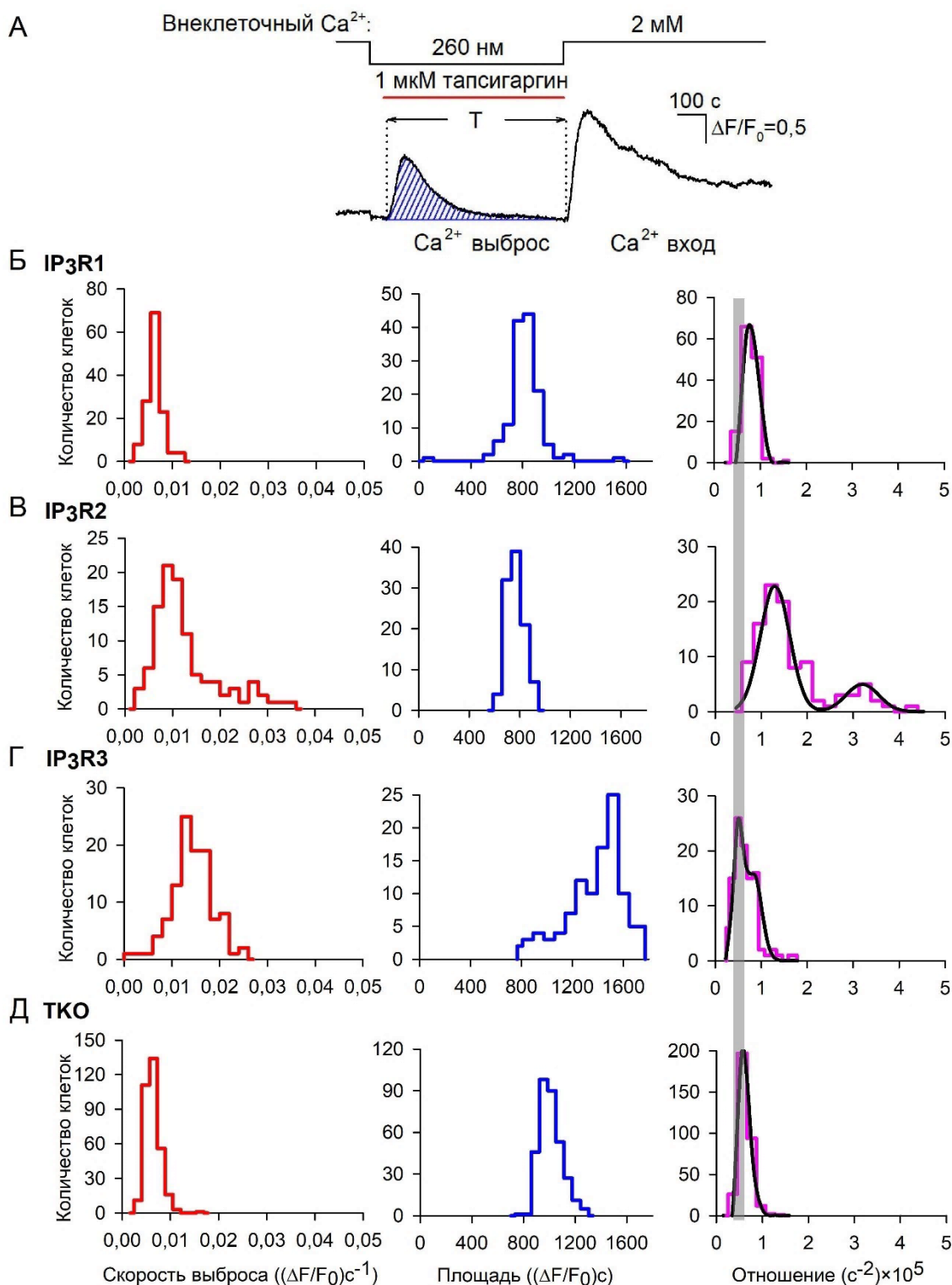


Рисунок 8. Оценка Ca^{2+} -проницаемости мембраны чувствительных к тапсигаргину Ca^{2+} -депо (адаптировано из Kochkina et al., 2024). **А** – Колоколообразный Ca^{2+} -ответ, вызванный тапсигаргин-индуцированным высвобождением Ca^{2+} . Значение заштрихованной площади под кривой, соответствующее уравнению (1), рассчитывали численно. **Б–Д** – Распределение скоростей высвобождения Ca^{2+} (левые панели), площадей под кривыми высвобождения Ca^{2+} (средние панели) и их отношения (правые панели) среди популяций клеток IP₃R1-НЕК ($n = 125$), IP₃R2-НЕК ($n = 101$), IP₃R3-НЕК ($n = 117$) и ТКО-НЕК ($n = 332$). Экспериментальные гистограммы (правые панели) были аппроксимированы (плавные линии) с использованием уравнения: $N(r) = N_1 e^{-\left(\frac{r-r_1}{\sigma_1}\right)^2} + N_2 e^{-\left(\frac{r-r_2}{\sigma_2}\right)^2} + N_3 e^{-\left(\frac{r-r_3}{\sigma_3}\right)^2}$, где $N(r)$ – количество клеток, отношение скорости и площади под кривой равно r , а N_i , r_i и σ_i являются константами.

Качественно последовательность для IP₃-рецепторов идентична ряду вероятностей открытого состояния канала в условиях, близких к состоянию покоя в клетке (100 нМ Ca²⁺, 1 мкМ IP₃), которые были оценены как ~ 0,3, 0,1 и < 0,1 для одиночных каналов IP₃R2, IP₃R1 и IP₃R3, соответственно (Mak, Foskett, 2015). Такое соответствие можно было бы ожидать, если бы спонтанная активность IP₃-рецепторов была существенным фактором утечки Ca²⁺ из ЭР. Действительно, чем активнее IP₃-рецепторы при базальном уровне IP₃, тем выше отток Ca²⁺, который он опосредует. Более того, данные, характеризующие высвобождение Ca²⁺ в течение 600- или 900-секундного интервала (Рис. 8 Б–Д, средние панели), позволяют предположить, что уровень покоя Ca²⁺ в регулируемых IP₃ Ca²⁺-депо в клетках IP₃R3-НЕК существенно выше, чем в клетках IP₃R2- НЕК и IP₃R1-НЕК при условии, что объём ЭР одинаков во всех случаях.

Клетки IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК с Ca²⁺-сенсором R-CEPIA1er. Для более подробного изучения Ca²⁺-гомеостаза клетки полученных линий IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК трансфицировали плазмидным вектором, кодирующим Ca²⁺-сенсор с ретикулярной локализацией R-CEPIA1er (Suzuki *et al.*, 2014). Загрузка Fluo-8 в полученные клетки позволяла проводить одновременный независимый мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca²⁺ (Рис. 9). ACh стимулировал Ca²⁺-ответы в цитозоле клеток и синхронное падение ретикулярного Ca²⁺, который возвращался близко к уровню покоя несмотря на присутствие в растворе агониста (Рис. 9 А–В). Ca²⁺-ионофор иономицин (5 мкМ), добавленный в раствор с низким содержанием Ca²⁺ (260 нМ), также запускал цитозольные сигналы Ca²⁺ (Рис. 9 А–В), предположительно, вследствие проникновения через плазмалемму и увеличения проницаемости ретикулярной мембраны для Ca²⁺. В этом случае низкий стационарный уровень ответа на иономицин должен был быть достигнут, когда потоки Ca²⁺, опосредованные SERCA и иономицином, были уравновешены. Интересно, что в клетках IP₃R1- и IP₃R3-НЕК иономицин опустошал запасы Ca²⁺ в гораздо большей степени, чем ACh (Рис. 9А, В, нижние кривые). При этом в клетках IP₃R2-НЕК ACh и иономицин снижали депонированный Ca²⁺ до сопоставимых уровней (Рис. 9Б).

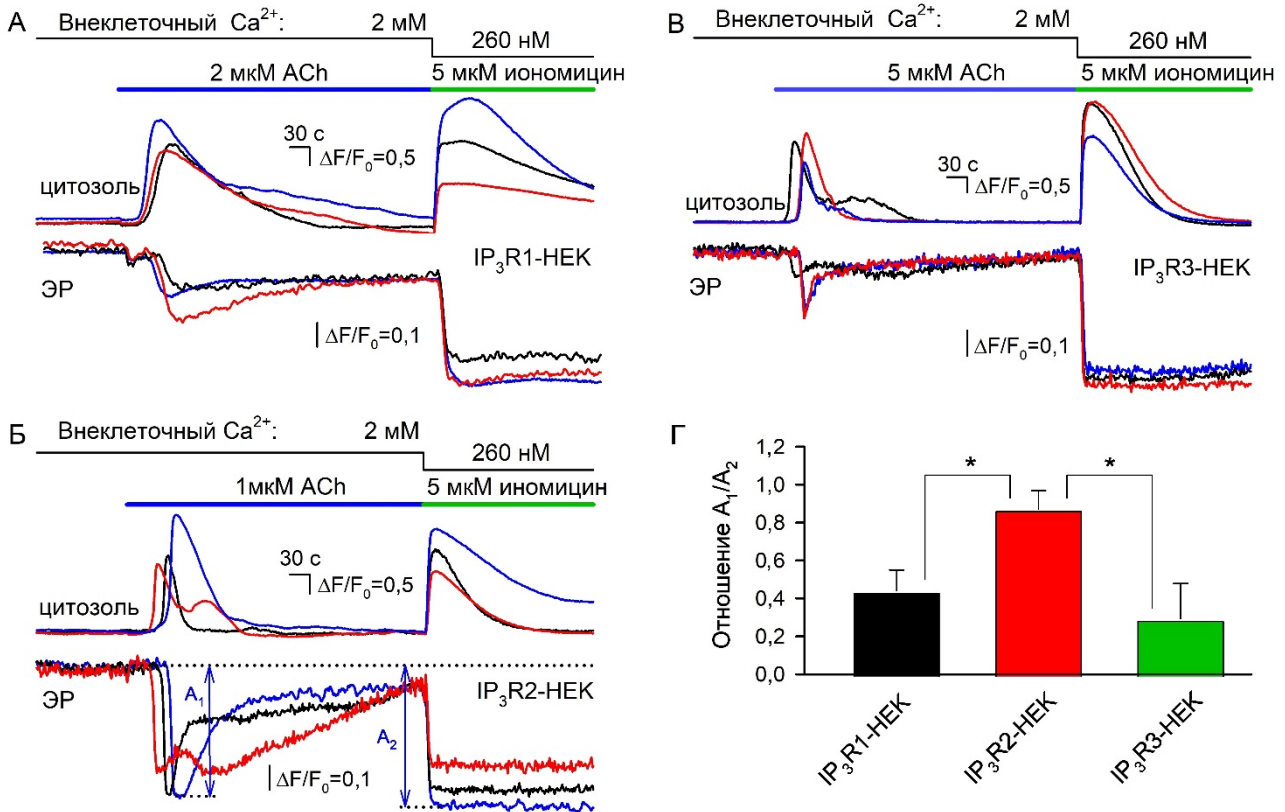


Рисунок 9. Одновременный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca^{2+} в клетках, загруженных Fluo-8 и экспрессирующих сенсор ретикулярного Ca^{2+} R-CEPIA1er (адаптировано из *Kochkina et al.*, 2024). **А-В** – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -ответов в цитозоле (верхние кривые) и в ЭР (нижние кривые) трёх одновременно анализируемых одиночных клеток линий IP₃R1-HEK (**А**) ($n = 59$), IP₃R2-HEK (**Б**) ($n = 71$) и IP₃R3-HEK (**В**) ($n = 63$). Во всех случаях клетки последовательно стимулировали ACh (при 2 мМ Ca^{2+}) и 5 мМ иономицина (при 260 нМ Ca^{2+} во внеклеточном растворе). Для каждой клеточной линии концентрация ACh была выбрана так, чтобы она превышала EC_{50} (Рис. 3Б) примерно в 5 раз. **Г** – Отношения ответов R-CEPIA1er на стимуляцию клеток ACh (A_1) и иономицином (A_2), величины которых были определены, как показано в (**Б**). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 17$). Звёздочки указывают на статистически значимую разницу (критерий ANOVA on Ranks, $p < 0,01$). Между клетками IP₃R1-HEK и IP₃R3-HEK статистически значимой разницы не было.

Это явление можно объяснить взаимодействием Ca^{2+} -связывающего белка аннексина A1 (ANXA1) и IP₃-рецептора. Не связанный с ANXA1 IP₃-рецептор активен, но при увеличении концентрации Ca^{2+} в просвете ЭР (> 100 мкМ) ANXA1 ингибирует IP₃-рецепторы (*Vais et al.*, 2020). Наши результаты показывают, что проницаемость ЭР для Ca^{2+} является самой высокой именно в клетках IP₃R2-HEK (Рис. 8 Б–Д, правые панели). Можно поэтому ожидать, что в клетках IP₃R2-HEK уровень люминального Ca^{2+} в состоянии покоя ниже, чем в клетках других линий, при условии, что активность SERCA одинакова во всех клеточных группах. В этом случае, IP₃-рецепторы в клетках IP₃R2-HEK в меньшей степени ингибированы белком ANXA1, и несмотря на более низкий

уровень люминального Ca^{2+} , обеспечивают более интенсивную утечку Ca^{2+} по сравнению с IP_3 -рецепторами в клетках $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$ и $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всем разнообразии внеклеточных сигналов, выброс Ca^{2+} из депо через IP_3 -рецепторы является одним из ключевых и универсальных внутриклеточных событий в трансдукции сигналов многих из них. В рамках данной работы мы описали функциональные различия трёх изоформ IP_3 -рецептора с использованием полученных ранее в нашей лаборатории линий, в клетках которых экспрессируется единственная изоформа IP_3 -рецептора ($\text{IP}_3\text{R1-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$, $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$), а также линии ТКО-НЕК, клетки которой лишены IP_3 -рецепторов.

Мы показали, что клетки ТКО-НЕК не генерируют Ca^{2+} -ответы при стимуляции агонистом, а клетки, экспрессирующие любую из трёх изоформ, как и клетки дикого типа, способны генерировать Ca^{2+} -ответы по механизму «всё или ничего». Иными словами, клетки либо не отвечали на агонисты при подпороговых концентрациях, либо генерировали Ca^{2+} -сигналы примерно равной амплитуды при дозах агониста выше пороговой. По отношению к моменту аппликации агониста Ca^{2+} -ответы генерировались с очевидной задержкой, которая градуально уменьшалась с увеличением дозы агониста. Вышеперечисленные факты свидетельствуют о том, что экспрессия хотя бы одной изоформы необходима и достаточна для генерации агонист-индуцированных Ca^{2+} -сигналов, и что все три изоформы способны поддерживать механизм Ca^{2+} -индуцированного выброса депонированного Ca^{2+} (CICR).

Мы оценили чувствительность клеток к ACh, которая описывается рядом $\text{WT-HEK} \approx \text{IP}_3\text{R2-HEK} > \text{IP}_3\text{R1-HEK} > \text{IP}_3\text{R3-HEK}$. Для клеток с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора ряд $\text{IP}_3\text{R2-HEK} > \text{IP}_3\text{R1-HEK} > \text{IP}_3\text{R3-HEK}$ идентичен ряду аффинностей IP_3 -рецептора к IP_3 : $\text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R1} > \text{IP}_3\text{R3}$. Так как мы предполагаем, что экспрессия участников фосфоинозитидного каскада одинакова в клетках всех линий (см. Приложение 1 диссертации), то аффинность к IP_3 той изоформы IP_3 -рецептора, которую экспрессируют клетки данной линии, является доминантным фактором, определяющим их чувствительность к агонистам.

С помощью разработанной методологии, мы также оценили относительную проницаемость мембран ЭР для ионов Ca^{2+} и показали, что по этому параметру клетки с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецепторов ранжируются как $\text{IP}_3\text{R2-HEK} > \text{IP}_3\text{R1-HEK} > \text{IP}_3\text{R3-HEK} \approx \text{ТКО-НЕК}$, что соответствует ряду для вероятностей открытого состояния

соответствующих типов IP_3 -рецептора в нестимулированных клетках: $IP_3R2 > IP_3R1 > IP_3R3$. Таким образом, спонтанная активность IP_3 -рецепторов, особенно IP_3R2 , может вносить заметный вклад в Ca^{2+} -утечку из ЭР в нестимулированных клетках.

Также с использованием генетически кодируемого сенсора R-CER1er мы оценили степень опустошения ЭР при стимуляции агонистом, которая, как оказалось, зависит от экспрессируемой в клетках изоформы IP_3 -рецептора.

Таким образом, клетки линий IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК и IP_3R3 -НЕК, а также их варианты, экспрессирующие генетически кодируемый сенсор ретикулярного Ca^{2+} , могут служить относительно простым и эффективным инструментом для поиска фармакологических средств воздействия на IP_3 -рецепторы, так как об их эффектах можно надёжно судить по клеточным ответам.

ВЫВОДЫ

1. При импульсной стимуляции ACh клетки WT-НЕК генерируют Ca^{2+} -сигналы, амплитудная дозо-зависимость которых носит характер «всё или ничего», тогда как их задержки градуально уменьшаются по мере роста концентрации агониста. Ключевой вклад в генерацию Ca^{2+} -сигналов вносит Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} (CICR) при участии IP_3 -рецепторов.

2. Для генерации ACh-индуцированных Ca^{2+} -сигналов по принципу «всё или ничего» необходимо и достаточно, чтобы в клетке функционировала хотя бы одна из трёх изоформ IP_3 -рецептора. Все три изоформы способны поддерживать механизм CICR.

3. По чувствительности к ACh клетки моноклональных линий ранжируются как IP_3R2 -НЕК $>$ IP_3R1 -НЕК $>$ IP_3R3 -НЕК, что коррелирует с аффинностями функционирующих IP_3 -рецепторов к IP_3 : $IP_3R2 > IP_3R1 > IP_3R3$.

4. Разработана методология оценки относительной Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР в нестимулированных клетках, позволившая показать, что базальная активность IP_3 -рецепторов вносит вклад в утечку депонированного Ca^{2+} и определяет его уровень в покое. Для клеток IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК и IP_3R3 -НЕК получен ряд: $P_{IP_3R1} : P_{IP_3R2} : P_{IP_3R3} = 1 : 1,75 : 0,45$, что соответствует активностям изоформ в нестимулированных клетках.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. **Kochkina E.N.**, Kopylova E.E., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Kabanova N.V., Kotova P.D., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Agonist-Induced Ca^{2+} Signaling in HEK-293-Derived Cells Expressing a Single IP3 Receptor Isoform. // Cells, Special Issue: Advances in Dissecting Calcium Signaling Pathways in Health and Diseases. 2024, 13(7), 562.
2. Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А., **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Коваленко Н.П., Колесников С.С. IP₃-рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках HEK-293. // Биологические мембраны. 2020. Т.37 (6). С.434-441.
3. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., **Kochkina E.N.**, Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. (2021) Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells BBA Advances 1, 100012.
4. **Кочкина Е.Н.**, Котова П.Д., Енукашвили Н.И., Колесников С.С. (2019) cGMP-зависимая протеинкиназа модулирует чувствительность мезенхимных стромальных клеток к пуринергическим агонистам. Биологические мембраны Т.36(4), 296-300.

Глава в книге

5. Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., **Kochkina E.N.**, Ivashin D.S., Kolesnikov S.S. Calcium signaling initiated by agonists in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. In: Calcium and Signal Transduction. Ed. Buchholz J.N., Intech Open, London, 2018, pp 139-163.

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

6. **Кочкина Е.Н.**, Кабанова Н.В., Коваленко Н.П. Анализ роли изоформ IP₃ рецепторов в генерации Ca^{2+} ответов на агонисты. // 24 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология — Наука XXI века». Пущино, Россия 2020. Сборник тезисов. С. 287.
7. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Рогачевская О.А. Анализ роли изоформ IP₃-рецепторов в агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в клетках HEK-293. // VII Съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021. Сборник тезисов докладов. Том 1. С. 55.
8. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Быстрова М.Ф., Колесников С.С. Агонист-индуцированная Ca^{2+} -сигнализация. Роль различных изоформ IP₃-рецептора. // VII Съезд физиологов СНГ. Сочи, 3-8 октября 2022. Сборник тезисов докладов. Том 3. С. 94.
9. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Колесников С.С. Роль различных изоформ IP₃-рецептора в агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации. // 26 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология — Наука XXI века». Пущино, Россия 2023. Сборник тезисов. С. 225.
10. Копылова Е.Е., **Кочкина Е.Н.**, Рогачевская О.А., Кабанова Н.В., Быстрова М.Ф., Колесников С.С. Моноклональные клеточные линии с двойным нокаутом генов IP₃-рецепторов. // XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 11–15 сентября 2023 г. Сборник тезисов. С. 109.
11. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Рогачевская О.А., Колесников С.С. Агонист-индуцированная Ca^{2+} -сигнализация в клетках с единственной изоформой IP₃-рецептора. // XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 11–15 сентября 2023 г. Сборник тезисов. С. 110.
12. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е., Рогачевская О.А. Агонист-индуцированные Ca^{2+} -сигналы в клетках HEK-293 с единственной изоформой IP₃-рецептора. Синхронный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca^{2+} . // 27 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология — Наука XXI века». Пущино, Россия 2024. Сборник тезисов. С. 288.
13. **Кочкина Е.Н.**, Копылова Е.Е. Оценка вклада IP₃-рецепторов в Ca^{2+} -утечку покоящихся клеток линии HEK-293. // 28 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология — Наука XXI века». Пущино, Россия 2025. Сборник тезисов. С. 422.